

Aus der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Kommissarischer Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. U. Maus

**Einfluss von proinflammatorischen Zytokinen auf das
osteogene Differenzierungspotenzial von humanen
adipogenen Stromazellen (ASCs)**

Dissertation

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

vorgelegt von
Neslihan Kula
2025

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

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

Zweitgutachter: PD Dr. rer. nat. Csaba Mahotka

Anne ve Baba'ma

- sonsuz sevgim ve minnetimle.

Zusammenfassung

Die Osteoporose ist eine systemische Erkrankung, welche das Knochensystem betrifft. Eine multifaktorielle Pathogenese führt zur Störung der feinregulierten Balance zwischen Knochenresorption und Knochenaufbau. Hierbei spielen vor allem bei Menschen fortgeschrittenen Alters entzündungsinduzierende (proinflammatorische) Zytokine eine entscheidende Rolle. Das Ziel dieser Arbeit war es, in einem *in vitro* Modell mit multipotenten Stromazellen des Fettgewebes (ASCs) die Rolle der proinflammatorischen Zytokine auf die Osteogenesekapazität der genannten Zellkulturen zu evaluieren.

Hierzu wurden Zellen verschiedener Spender zu Zell-Pools zusammengeführt und kultiviert. Die osteogene Differenzierung unter IL-1 β -, IL-6-, IL-8-, TNF α - und IFN- γ -Exposition wurde nach 21 Tagen mittels Alizarin-Rot-Färbung visualisiert. Quantifiziert wurde die Differenzierung mittels Messung der OD600 im Photometer. Des Weiteren wurden BrdU-Zell-Proliferationsassays und CellTiter-Blue Assays zur Charakterisierung der relativen Zellviabilität durchgeführt. Schließlich wurde mittels Western Blot unter IL-1 β -, TNF α - und IFN γ -Exposition nach 21 Tagen die Expression von Schlüsselproteinen der Osteogenese dargestellt.

Besonders unter IL-1 β - und TNF α -Exposition zeigte die Alizarin-Rot-Färbung eine statistisch signifikant verstärkte osteogene Differenzierung im Vergleich zur Kontrolle. Dagegen ließ sich unter IFN γ -Exposition eine verminderte Differenzierung feststellen. Unter Zytokinexposition bestand ein Anstieg der relativen Zellzahl, was sich jedoch im Vergleich zum enormen Anstieg der osteogenen Differenzierung als nicht relevant erwies. Im Western Blot zeigte sich keine statistisch signifikante Erhöhung der Expression der Alkalischen Phosphatase, BMP-2, Osteocalcin, Osteopontin und Runx2.

Interessanterweise ergab sich, dass die osteogene Differenzierung der ASCs durch proinflammatorische Zytokine verstärkt wurde. Die gewonnenen Erkenntnisse liefern einen weiteren Beitrag zum Verständnis der Pathogenese der Osteoporose. In der medikamentösen Therapie wird diese Erkenntnis jedoch eine untergeordnete Rolle spielen, weil man an Osteoporose erkrankten Menschen nicht vermehrt proinflammatorischen Zytokinen aussetzen kann. Entzündungsreaktionen bedürfen einer sorgfältigen Kontrolle, da sie in einer Gewebeschädigung oder einer systemischen Manifestation (*Systemic inflammatory response syndrome*, SIRS) resultieren können. Die gewonnenen Erkenntnisse lassen sich jedoch auf die regenerative Medizin oder das *Tissue Engineering* anwenden, etwa für die Entwicklung aufbauender Knochenpräparate oder osteokonduktiver Stützstrukturen.

Summary

Osteoporosis is a systemic disease that affects the skeletal system, stemming from a multifactorial pathogenesis that disrupts the finely regulated balance between bone resorption and bone formation. In individuals of advanced age, inflammation-inducing (pro-inflammatory) cytokines play a particularly crucial role in this process.

The aim of this study was to evaluate the impact of proinflammatory cytokines on the osteogenic potential of adipose-derived multipotent stromal cells (ASCs) in an in vitro mode. Cells from various donors were pooled and cultures for this purpose. Osteogenic differentiation under exposure to IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α , and IFN γ was visualized after 21 days using Alizarin Red staining. Differentiation was quantified by measuring OD600 with a photometer. Additionally, BrdU cell proliferation assays and CellTiter Blue assays were conducted to assess relative cell viability. Finally, Western blot analysis was performed after 21 days under IL-1 β , TNF α , and IFN γ exposure to examine the expression of key osteogenic proteins.

Notably, Alizarin Red staining revealed a statistically significant enhancement in osteogenic differentiation under IL-1 β and TNF α exposure compared to the control. In contrast, differentiation was reduced under IFN γ exposure. Cytokine exposure also led to an increase in the relative cell count, although this increase was not as significant as the marked rise in osteogenic differentiation. Western blot analysis showed no statistically significant increase in the expression of Alkaline Phosphatase, BMP-2, Osteocalcin, Osteopontin, and Runx2.

Interestingly, it turned out that the osteogenic differentiation of ASCs was enhanced by proinflammatory cytokines. The insights gained contribute to a better understanding of osteoporosis pathogenesis. However, this discovery will likely have limited impact on osteoporosis pharmacotherapy, as exposing patients to increased proinflammatory cytokines would be impractical. Inflammatory responses require careful regulation, as they can lead to tissue damage or systemic manifestations, such as systemic inflammatory response syndrome (SIRS). Nonetheless, these findings have potential applications in regenerative medicine and tissue engineering, such as developing bone-constructive therapies or osteoconductive support structures.

Abkürzungsverzeichnis

ALP	Alkalische Phosphatase
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
Aqua dest	<i>Aqua destillata</i>
ASC	<i>Adipose-derived stromal cells</i>
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
BMSC	<i>Bone marrow-derived stromal cells</i>
BrdU	Thymidin-Analogon 5-bromo-2'-deoxyuridine
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
C/EBP α	<i>CCAAT/enhancer-binding family of proteins</i>
CPC	Cetylpyridinium-Chlorid
CTB	CellTiter-Blue
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IFN γ	Interferon- γ
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8

KON	Kontrolle
M	Männlich
MAPK	<i>Mitogen-activated protein -Kinase</i>
M-CSF	<i>Macrophage colony stimulating factor</i>
MSC	<i>Mesenchymal stem cell</i>
mTOR	<i>Mechanistic target of rapamycin</i>
Myf5	<i>Myogenic factor 5</i>
MyoD	<i>Myoblast determination protein</i>
NFATc1	<i>Nuclear factor of activated T-cells 1</i>
NFκB	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
OD	Optische Dichte
OM	Osteogenes Differenzierungsmedium
OPG	Osteoprotegerin
Osx	Osterix
P	Passage
PAA	Polyacrylamid
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
PPARγ	<i>Peroxisome proliferator activated receptor γ</i>
POD	Peroxidase
RANK	<i>Receptor activator of NFκB</i>
RANKL	<i>Receptor activator of NFκB ligand</i>

Rpm	<i>Revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
Runx2	<i>Runt related transcription factor 2</i>
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-Page	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SOP	<i>Standard operating procedures</i>
Sox	<i>Sex determining region Y (SRY)-box</i>
STAT1	<i>Signal transducers and activators of transcription 1</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBS-T	<i>Tris buffered saline with tween</i>
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
U	Units
W	Weiblich
WR	<i>Working reagent</i>

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Einführung	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Pathogenese der Osteoporose	2
1.1.3 <i>Inflamm-Aging</i> : Grundlage für das <i>in vitro</i> -Modell	2
1.2 Osteogenese und Einfluss der Zytokine	3
1.2.1 Osteogenese und Osteoblastengnese	3
1.2.2 Osteoklastengnese	7
1.2.3 Einfluss proinflammatorischer Zytokine auf die Knochenhomöostase	8
1.3 <i>Adipose-derived stromal cells</i> und regenerative Medizinansätze	11
1.4 Zielsetzung	13
2. Material und Methoden	14
2.1 Materialien	14
2.1.1 Geräte	14
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	18
2.1.3 Substanzen	20
2.1.4 <i>Kits</i>	24
2.1.5 Zytokine	24
2.1.6 Antikörper	25
2.1.7 Medien, Puffer und Lösungen	26
2.1.8 <i>Software</i>	29
2.2 Methoden	30
2.2.1 Isolation von adipogenen Stromazellen aus Fettlappen	30
2.2.2 Kultivierung von adipogenen Stromazellen	32
2.2.3 Passagieren von adipogenen Stromazellen	32

2.2.4 Bestimmung der Zellzahl.....	34
2.2.5 Auftauen von Zellen	34
2.2.6 Kryokonservierung	35
2.2.7 Erstellung eines Zellpools aus adipogenen Stromazellen.....	35
2.2.8 Osteogene Differenzierung	36
2.2.10 Alizarin-Rot-Färbung und Rücklösung	37
2.2.12 CellTiter-Blue-Viabilitäts-Assay	39
2.2.13 BrdU-Zellproliferations-Assay.....	39
2.2.14 Alkalische Phosphatase-Assay	41
2.2.15 Aufarbeitung der Proben für die Proteinbestimmung und Proteinisolation.....	42
2.2.16 Proteinbestimmung	43
2.2.17 SDS-Page	45
2.2.18 Western-Blot-Analyse: Transfer, Immunmarkierung und Detektion der Chemiluminescence (Bio-Rad).....	47
2.2.20 Statistische Auswertung	48
2.2.21 Ethikvotum.....	48
3. Ergebnisse.....	49
3.1 Wachstumskinetik der adipogenen Stromazellen	49
3.2 Gesteigerte Osteogene Differenzierung adipogener Stromazellen unter proinflammatorischen Zytokinen	50
3.3 Makroskopische und mikroskopische Darstellung der osteogenen Differenzierung adipogener Stromazellen	52
3.4 Quantifizierung der osteogenen Differenzierung mittels Alizarin-Rot- Färbung und Rücklösung	58
3.5 Osteogene Differenzierung: <i>Non-Responder vs. Responder</i>	62
3.6 Osteogene Differenzierung: Responder.....	64

3.7 Zunahme der Zellzahl unter dem Einfluss proinflammatorischer Zytokine	68
3.8 Analyse der Alkalischen Phosphatase als Schlüsselprotein der osteogenen Differenzierung	71
3.9 Quantifizierung der osteogenen Differenzierungsmarker auf Proteinebene	73
4. Diskussion	80
4.1 Validierung des osteogenen Differenzierungspotenzials adipogener Stromazellen	81
4.2 Positiver Einfluss von IL-1 β und TNF α auf die osteogene Differenzierung adipogener Stromazellen	82
4.2.1 Einfluss von IL-1 β und TNF α auf die Proliferation adipogener Stromazellen	84
4.3 Hemmende Wirkung von IFN γ auf die osteogene Differenzierung adipogener Stromazellen	86
4.3.1 Einfluss von IFN γ auf die Proliferation adipogener Stromazellen ...	87
4.4 Einfluss von IL-6 und IL-8 auf die osteogene Differenzierung adipogener Stromazellen	88
4.5 Fazit der Experimente zur osteogenen Differenzierung.....	91
4.5.1 Unterschiede der Responder und Non-Responder	92
4.6 Expression der Schlüsselproteine der osteogenen Differenzierung	93
4.7 Stärken und Limitationen der Methodik	96
4.8 Schlussfolgerung und klinische Relevanz.....	99
4.8.1 Ausblick	100
5. Literatur- & Quellenverzeichnis	102
6. Anhang	109
6.1 Abbildungsverzeichnis	109
6.2 Tabellenverzeichnis	111

1. Einleitung

1.1 Einführung

Die Volkskrankheit Osteoporose führt dazu, dass das alltägliche Leben der vor allem älteren Bevölkerung in ein gefährliches Unterfangen verwandelt wird. Osteoporose ist eine weltweit verbreitete systemische Erkrankung des Skelettsystems. Aufgrund der erhöhten Knochenfragilität und der infolgedessen gesteigerten Anfälligkeit für Knochenbrüche, kann sie zu erheblichen gesundheitlichen Beeinträchtigungen führen. Die Folgen des gesteigerten Frakturrisikos wie der Hospitalisierung, operativer oder konservativer Sanierung und zeitintensiver Rehabilitationsmaßnahmen haben wiederum negative Auswirkungen auf die Lebensqualität von Betroffenen.

1.1.1 Epidemiologie

In den letzten Jahrzehnten hat das wissenschaftliche und medizinische Interesse für das Verständnis der Erkrankung Osteoporose und ihrer Prävention und Therapie erheblich zugenommen. In einem *Systematic Review* wurde die weltweite Prävalenz der Osteoporose mit 19,7 % beschrieben [1]. Die Prävalenz war in Entwicklungsländern mit durchschnittlich 22,1 % höher als in den Industrienationen mit durchschnittlich 14,5 %. Grundlage waren Studien aus dem Zeitraum von 1988 bis 2018. Aufgrund des demographischen Wandels mit einer Zunahme der älteren Bevölkerungsschicht steigt die Zahl der betroffenen Menschen stetig an, wobei vor allem Menschen weiblichen Geschlechts betroffen sind. Nach Schätzungen des Robert-Koch-Instituts aus dem Jahr 2017 leiden in Deutschland etwa 20 % der Frauen und 6 % der Männer ab 50 Jahren an Osteoporose [2]. Die Folgen der Erkrankung können nicht nur zu individuellen Leiden führen, sondern auch erhebliche wirtschaftliche Belastungen für das Gesundheitssystem verursachen. Für das Jahr 2019 wurden direkte Kosten der Osteoporose in Höhe von € 13,83 Billionen dokumentiert [3]. Insbesondere die Kosten durch Frakturen

infolge einer Osteoporose machten 3,7 % der deutschen Gesundheitsausgaben aus [3].

1.1.2 Pathogenese der Osteoporose

Die Pathogenese der Osteoporose umfasst mehrere wichtige Faktoren. Physiologisch werden alte Knochenzellen durch neue ersetzt, um die Knochenstruktur zu erhalten [4]. Der Knochenabbau erfolgt durch die Osteoklasten, während Osteoblasten neuen Knochen aufbauen. Bei der Osteoporose ist jedoch die feinregulierte Balance dieses Prozesses gestört. Der Knochenabbau überwiegt, wodurch die Knochenmasse abnimmt und die Mikroarchitektur des Knochens verschlechtert wird [5].

Der altersbedingte Knochenverlust ist zunächst ein natürlicher Prozess. Bei einigen Personen schreitet dieser jedoch schneller fort als bei anderen. Ein Grund dafür kann der Rückgang der Östrogenproduktion sein, welcher bei Frauen bedingt durch die hormonelle Umstellung im Klimakterium eintritt. Östrogen stimuliert die Aktivität der Osteoblasten und hemmt die Aktivität der Osteoklasten [6]. Bei Östrogenmangel fallen die stimulierenden und hemmenden Wirkungen des Hormons weg, sodass eine Reduktion der Knochenmasse resultiert.

Des Weiteren spielt auch der Calciumhaushalt eine Rolle in der Pathogenese der Osteoporose. Calcium ist ein wichtiger Baustein der Knochenstruktur. Die Aufnahme von Calcium aus dem Darm wird durch Vitamin D gefördert. Ein adäquater Vitamin D-Spiegel ist daher entscheidend für eine ausreichende Calciumaufnahme. Mangel- und Fehlernährungen mit Defiziten in der Aufnahme von den Nährstoffen Calcium und Vitamin D sind somit eine zusätzliche Ursache, die zur Entwicklung einer Osteoporose beitragen kann [7].

1.1.3 *Inflamm-Aging*: Grundlage für das *in vitro*-Modell

Weiterhin wird angenommen, dass sich mit zunehmendem Alter ein chronischer Entzündungszustand im Körper entwickelt, der die Entstehung einer Osteoporose begünstigt. Dieser Prozess wird auch als „*Inflamm-Aging*“ bezeichnet [8].

Der Begriff wurde erstmals im Jahr 2000 von Franceschie et al. beschrieben und verbindet die beiden Begriffe Entzündungsprozess (*Inflammation*) und Alterungsprozess (*Ageing*). Die Inflammation als komplexe Immunreaktion des Körpers auf Pathogene, wie Bakterien und Viren oder Gewebeschäden, führt zur Erkennung und Beseitigung dieser Reize [9]. Während der Entzündungsreaktion werden Entzündungsmediatoren, sogenannte proinflammatorische Zytokine, freigesetzt, die die Kommunikation zwischen den Immunzellen ermöglichen und die Inflammationsreaktion regulieren. Sie führen außerdem dazu, dass Immunzellen, wie neutrophile Granulozyten, Makrophagen, dendritische Zellen und Lymphozyten an den Entzündungsort gelangen, um Pathogene zu eliminieren und antimikrobielle Substanzen freizusetzen. Zu diesen antimikrobiellen Substanzen zählen reaktive Sauerstoff- sowie Stickoxidspezies (NO_x). Befindet sich der Körper jedoch in einem prolongierten Inflammationszustand, wirkt sich die Inflammation ungünstig auf physiologische Gewebe- und Organfunktionen aus. Betroffen können unter anderem das kardiovaskuläre System, das Nervensystem und das Skelettsystem sein. Langfristig wird so die Entwicklung von altersbedingten Erkrankungen begünstigt. Unter den vielfältigen Folgeerkrankungen findet man außer der Osteoporose auch Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie die Arteriosklerose [10] oder die altersbedingte Makuladegeneration des Auges [11].

1.2 Osteogenese und Einfluss der Zytokine

1.2.1 Osteogenese und Osteoblastengnese

Die Entstehung von Knochen (Osteogenese) umfasst komplexe Prozesse, die von vielen Faktoren und Interaktionen gesteuert werden. Es gibt zwei Formen der Osteogenese: die chondrale und die desmale Osteogenese.

Zu Beginn der Entwicklung in beide Richtungen stehen mesenchymale Stammzellen (*mesenchymal stem cell*, MSC). Sie zeichnen sich durch ihre Pluripotenz aus, was bedeutet, dass sie sich in verschiedene Zelltypen des Körpers differenzieren können [12]. Dies beinhaltet die Zellen aus dem Ektoderm, Mesoderm und

Endoderm der drei Keimblätter der Embryonalentwicklung. Beispiele für Zellarten, die aus MSCs entstehen können, sind Fibroblasten, Chondrozyten, Myozyten, Adipozyten und Osteoblasten [13]. Die Differenzierung in diese Zellreihen hängt von der Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren und Signalwege ab, welche beispielhaft in der folgenden Abbildung 1 dargestellt sind [14-19].

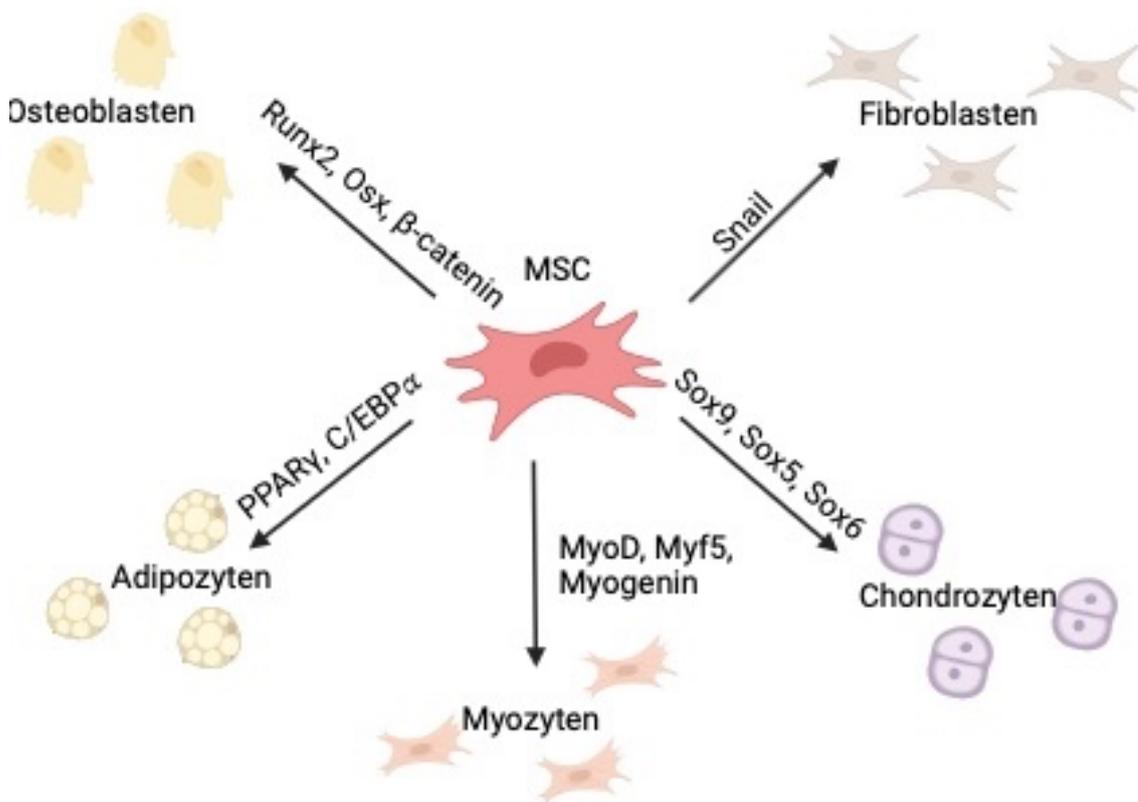


Abb. 1 Differenzierung von MSCs

Dargestellt ist die Differenzierung von MSCs in verschiedene Zellreihen mittels Transkriptionsfaktoren. C/EBP α = CCAAT/enhancer-binding family of proteins, Myf5 = myogenic factor 5, MyoD = myoblast determination protein, Osx = Osterix. PPAR γ = peroxisome proliferator activated receptor γ , RUNX2 = runt-related transcription factor 2, Sox = sex determining region Y (SRY)-box. Eigene Abbildung hergestellt mit BioRender.com.

Bei der chondralen Osteogenese entsteht zuerst Knorpelgewebe. Knorpelzellen (Chondroblasten) entwickeln sich anschließend durch die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Sox9, Sox5 und Sox6 weiter zu Osteoblastenvorläuferzellen.

Bei der direkten Knochenentwicklung, der desmalen Osteogenese, entwickeln sich Osteoblastenvorläuferzellen auf direktem Wege aus MSCs. Zu Beginn

differenzieren sich MSCs zu Präosteoblasten mit Hilfe des Transkriptionsfaktors *runx-related transcription factor 2* (Runx2). Präosteoblasten entwickeln sich anhand von β catenin, Osterix und Runx2 weiter zu unreifen Osteoblasten [19]. Diese produzieren verschiedene *bone morphogenic proteins* (BMP). Insbesondere BMP-2, -4 und -7 sind von Relevanz, da sie die chondrogene Differenzierung von unreifen Osteoblasten hemmen und die Differenzierung von MSCs zu Osteoblasten fördern [20-22]. Runx2 unterbindet außerdem im weiteren Verlauf die Reifung der Osteoblasten zu Osteozyten [18].

Zu den Aufgaben der Osteoblasten zählt der Knochenaufbau, die Synthese der Knochenmatrix und die Knochenmineralisierung. Osteoblasten synthetisieren unter anderem Kollagen Typ 1 - ein Protein, welches für die Knochenbildung essenziell ist. Es verleiht der Knochenmatrix als Grundgerüst seine Festigkeit, Flexibilität und Struktur. Kollagen findet sich mit anderen Proteinen zusammen und bildet als Einheit das Osteoid. Dieses stellt eine nicht mineralisierte Form der Knochenmatrix dar. Osteocalcin wird von Osteoblasten synthetisiert und reguliert die Knochenmineralisierung, indem es Calcium bindet und die Bildung von Hydroxylapatitkristallen fördert [22]. Mit Hilfe von Vitamin D werden Calcium und Phosphat im Darm aufgenommen. Durch die Einlagerung von anorganischem Calciumphosphat, in Form von Hydroxylapatitkristallen in die Knochenmatrix, wird dem Osteoid Härte und Festigkeit verliehen. Nachdem die Knochenbildung abgeschlossen ist, durchlaufen die Osteoblasten entweder den programmierten Zelltod (Apoptose) oder werden in die Knochenmatrix eingebettet [23]. Dadurch entwickeln sie sich weiter zu Osteozyten, dessen Funktionen die Aufrechterhaltung der Knochenmatrix und die Vermittlung der Kommunikation zwischen den Knochenzellen umfasst.

Weitere Markerproteine, die während der Osteogenese und der osteogenen Differenzierung eine Funktion haben und für die vorliegende Arbeit von Bedeutung sind, sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Markerprotein	Funktion
Alkalische Phosphatase	<ul style="list-style-type: none"> • Spaltung anorganischer Phosphate → Baustein für Calciumphosphat [24-27] • Verringerung der Pyrophosphatkonzentration, welches die Knochenmineralisierung hemmt [25, 27]
BMP-2	<ul style="list-style-type: none"> + Differenzierung von MSCs zu Osteoblasten [20-22, 28] + Expression von Runx2 und Osterix [23, 28, 29] + ALP, Osteocalcin, Osteopontin und Typ 1 Kollagen Synthese [21, 22, 25] + Angiogenese [30, 31]
Osteocalcin	<ul style="list-style-type: none"> • Expression durch Osteoblasten in der post-proliferativen Phase [22] • Bildung durch u.a. 1,25 (OH)₂D₃ gefördert und Glucocorticoide gehemmt [21, 22, 32] • Bindung von Calcium und Hydroxylapatit [22, 33] – Knochenmineralisierung [33]
Osteopontin	<ul style="list-style-type: none"> • Hohe Expression durch Osteoblasten während der proliferativen Phase und Knochenmineralisierung [22] • Produktion durch Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten [34-36] • <i>Down-regulation</i> durch Osteoklastenaktivität [34] • Transkription durch u.a. Retinolsäure, Glucocorticoide, 1,25 (OH)₂D₃ und proinflammatorische Zytokine (TNF α, IL-1β) gefördert [34, 35]

	<ul style="list-style-type: none"> • Regulation der Osteoklastenbildung [34] + Adhäsion und Migration von Osteoblasten und Osteoklasten [34-36]
RUNX2	<ul style="list-style-type: none"> • hohe Expression in früher Phase der Osteoblasten-Reifung [22] + Differenzierung von MSCs zu Präosteoblasten [18, 19] + Differenzierung von Präosteoblasten zu unreifen Osteoblasten [18, 19] + Expression von BMPs, Kollagen Typ 1, Osteopontin und Osteocalcin [18, 22] - Reifung der Osteoblasten zu Osteozyten [18] - Differenzierung von MSCs zu Adipozyten und Chondrozyten [19]

Tabelle 1 Markerproteine der Osteogenese

„+“ = fördernd, „-“ = hemmend

1.2.2 Osteoklastengnese

Im Knochenmark entstehen Zellen, die sich zwei verschiedenen Zellreihen zuordnen lassen: die myeloische und lymphatische Zellreihe. Beide entwickeln sich aus Knochenmarkstammzellen. Durch die Verschmelzung von Zellen der myeloischen Reihe im Knochenmark entstehen Osteoklasten [37].

Vorläuferzellen der Osteoklastengnese können sich zu Osteoklasten entwickeln. Sie tragen einen Rezeptor, der durch die Bindung mit *macrophage colony stimulating factor* (M-CSF) aktiviert wird und die Proliferation vorantreibt [37]. Während der Osteoklastengnese bindet *Receptor Activator of NFκB* (RANK) an seinen Liganden RANKL und aktiviert somit den Transkriptionsfaktor *nuclear factor kappa B* (NFκB) [22, 38]. Infolgedessen werden Signalwege stimuliert, die zur Osteoklastengnese führen.

Die Gegenspieler der Osteoklasten, die Osteoblasten, exprimieren RANKL und Osteoprotegerin (OPG) [39]. OPG unterbindet die Interaktion von RANK mit RANKL, woraus eine verminderte Osteoklastengenese resultiert [38, 40, 41].

1.2.3 Einfluss proinflammatorischer Zytokine auf die Knochenhomöostase

Proinflammatorische Zytokine sind einige unter den vielen Mediatoren, die an der Dynamik zwischen Knochenresorption und -bildung beteiligt sind. Sie beeinflussen das Gleichgewicht von OPG und RANKL zugunsten von RANKL [38]. Dadurch können RANKL und RANK verstärkt interagieren und zu einer gesteigerten Osteoklastengenese führen. Durch diesen Vorgang kommt es zu einer vermehrten Knochenresorption.

Hinsichtlich des negativen Knochenumsatzes ist die Aktivierung von Osteoklasten durch proinflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor α ($\text{TNF}\alpha$), Interleukin (IL)- 1β und IL-6 von Bedeutung [42-44]. Des Weiteren stimuliert $\text{TNF}\alpha$ die Produktion von Monozyten und Makrophagen, was wiederum zur Entstehung von knochenresorbierenden Zellen führt [45]. Auch IL-8 fördert die Entwicklung von Osteoklasten, indem es die RANK-induzierte *nuclear factor of activated T-cells1* (NFATc1) Bildung aktiviert [46-48].

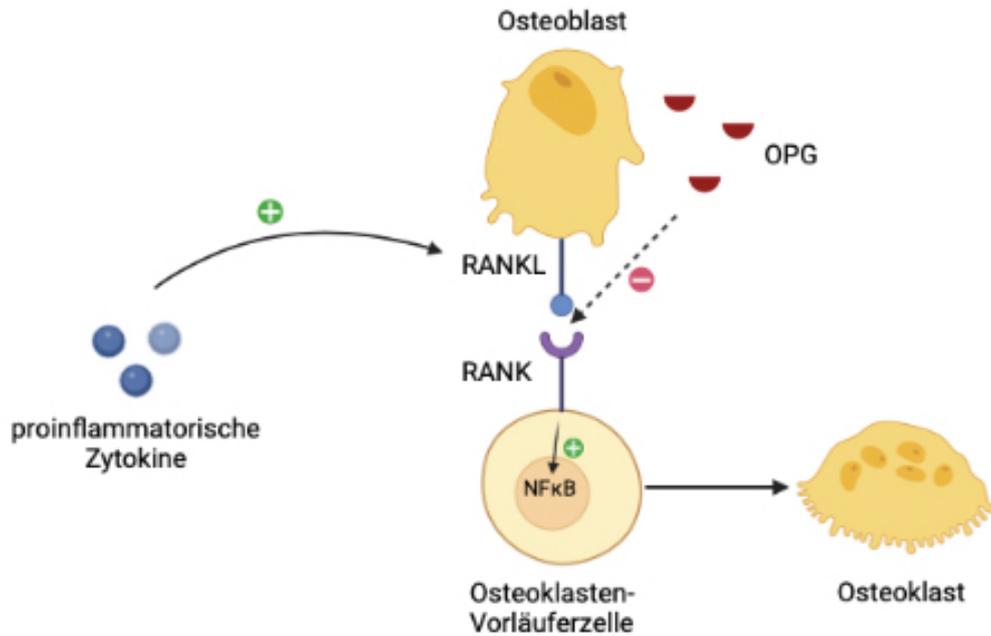


Abb. 2 Regulation der Osteoklastengnese

Dargestellt ist der Einfluss von proinflammatorischen Zytokinen auf die Osteoklastengnese. Durch die Bindung von RANK und RANKL wird NFκB aktiviert. OPG wird von Osteoblasten sezerniert und hemmt die Interaktion von RANKL und RANK. Durch proinflammatorische Zytokine wird das Verhältnis von OPG und RANKL zugunsten RANKL beeinflusst, was die Osteoklastengnese ankurbelt. Modifiziert nach Abbildung 1 auf Seite 28 in [49]. Abbildung hergestellt mit BioRender.com.

Die Zytokin-vermittelte Knochenresorption wird durch Interferon γ (IFN γ) gehemmt, was den Verlust von Knochengewebe verhindert [44]. IFN γ hemmt darüber hinaus die Entstehung von Osteoklasten, indem es die Expression von RANK verringert, wodurch wiederum die Wechselwirkung mit RANKL nachteilig betroffen wird. Zusätzlich initiiert es die Apoptose von Osteoklasten durch eine begünstigende Wirkung auf die Fas-FasL-Interaktion [46, 50].

Die Aktivität von Osteoblasten wird ebenfalls durch das Vorkommen von proinflammatorischen Zytokinen beeinflusst. Vor allem durch IL-1 β , IL-6 und TNF α werden Osteoblasten gehemmt, was zur Störung der Knochenbildung führt. Zum einen wird besonders die Differenzierung von Osteoblasten durch TNF α negativ beeinflusst, wobei die Auswirkungen abhängig von der Zeit und der Menge der TNF α Exposition sind [45, 51]. Zum anderen wird die Mineralisierung des Knochens beeinträchtigt, indem die Aktivität von Enzymen, die für die Mineralisierung

notwendig sind, wie der Alkalischen Phosphatase (ALP), reduziert wird. Vor allem $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$ inhibieren die Expression der ALP [45, 52].

Die Freisetzung von Calcium durch Osteoblasten wird durch IL-6 supprimiert [52]. Infolgedessen beeinträchtigt IL-6 die Osteogenese nachteilig, da Calcium normalerweise als essenzieller Baustein in die extrazelluläre Matrix integriert wird. Zytokine können auch nachteilige Auswirkungen auf andere Bausteine oder Marker der Osteogenese ausüben, wie Typ-1-Kollagen oder Osteocalcin [45, 51, 52]. $\text{IL-1}\beta$ intensiviert die Synthese von Kollagenasen - Enzyme, die für den Abbau von Kollagen verantwortlich sind [52]. Demzufolge steht weniger Kollagen als wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix zur Verfügung.

NO ist ein freies Radikal, das im L-Arginin/NO-Synthase- (NOS) Signalweg gebildet wird. Es wurde festgestellt, dass NO einen zytotoxischen Effekt auf Osteoblasten ausübt [44, 53]. $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ und $\text{IFN}\gamma$ stimulieren die NO-Produktion, was schließlich zur Knochenresorption führt [53].

Die lokale Präsenz von IL-8 wird ebenfalls mit einem Verlust an Knochengewebe in Verbindung gebracht, da sie eine hemmende Wirkung auf Osteoblasten ausübt [54].

Ein Zytokin, welches die Osteogenese positiv beeinflusst ist $\text{IFN}\gamma$. Es steigert die Aktivität von ALP in *Osteoblast-like-cells*. Dadurch wird die Bildung von Osteoblasten unterstützt, indem die Expression von Runx2, Osterix, ALP und Osteocalcin hochreguliert wird [55]. Humane MSCs produzieren $\text{IFN}\gamma$, um ihre Entwicklung in Richtung der Osteogenese zu fördern. $\text{IFN}\gamma$ beeinflusst diesen Prozess positiv, indem es PPAR γ herunterreguliert und Runx2 hochreguliert. Somit wird die Differenzierung von MSCs zu Adipozyten gehemmt.

Unter bestimmten Bedingungen können Zytokine jedoch osteoanabole Effekte auslösen, indem sie Signalwege aktivieren, die die Osteoblastendifferenzierung fördern. Die positiven Effekte von $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$ auf die Osteogenese könnten durch die Aktivierung von Signaltransduktionswegen wie NF- κ B und MAPK (*mitogen-activated protein* -Kinase) vermittelt werden, die bekanntermaßen in die Regulation der Osteoblastenfunktion und -differenzierung involviert sind.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Zytokine sowohl hemmende als auch fördernde Effekte auf die Knochenhomöostase haben. Während proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF α die Knochenbildung überwiegend negativ beeinflussen, wirkt IFN γ protektiv. Neben den vielfältigen Einflüssen von Zytokinen auf die Knochenhomöostase spielt auch die regenerative Medizin eine bedeutende Rolle bei der Behandlung von Knochengewebeschäden.

1.3 *Adipose-derived stromal cells* und regenerative Medizinansätze

In der regenerativen Medizin haben Stromazellen aus dem Fettgewebe (*adipose-derived stromal cells*; ASC) aufgrund ihres Potenzials zur Geweberegeneration und Differenzierungspotenzials einen besonderen Stellenwert [56]. Die Gewinnung von ASCs erfolgt aus dem Fettgewebe, das eine reichhaltige Quelle für diese multipotenten Zellen darstellt. Da die Fettzellen in Form von Abdominoplastiken oder in Form von Liposuktionsfett leicht zugänglich sind, stellen sie eine interessante Quelle zur Gewinnung von Stammzellen dar.

Durch gezielte Differenzierungsfaktoren kann die adipogene Stammzellpopulation dazu angeregt werden, sich in Richtung Osteogenese zu entwickeln. Dieser Pfad führt zur Bildung von Osteoblasten. Ein umfassendes Verständnis der Signalwege und molekularer Mechanismen ist von entscheidender Bedeutung für das Potenzial zur Entwicklung innovativer therapeutischer Ansätze. Die gezielte Nutzung dieser Fähigkeit von adipogenen Stromazellen eröffnet vielversprechende Perspektiven für die Behandlung von Knochengewebsdefekten und unterstützt die Fortschritte in der regenerativen Medizin.

Regenerative Medizinansätze repräsentieren einen bahnbrechenden Bereich in der modernen Medizin, der das Potenzial hat, traditionelle Behandlungsparadigmen zu revolutionieren. Im Kern zielen diese Ansätze darauf ab, geschädigte oder degenerierte Gewebe und Organe durch die Aktivierung des körpereigenen Regenerationspotenzials oder durch den Einsatz von biologischen Materialien

und Zellen zu reparieren oder zu ersetzen. Ein zentrales Element ist die Verwendung von Stammzellen, die das Potenzial besitzen, sich in verschiedene Zelltypen zu differenzieren und somit die Regeneration von Geweben wie Knochen, Knorpel, Haut und sogar Organgewebe zu fördern. Die Anwendung von Stammzellen eröffnet neue Horizonte für die personalisierte Medizin und die Entwicklung von maßgeschneiderten Therapieansätzen. Darüber hinaus haben Fortschritte in der Biomaterialforschung zur Entwicklung von *scaffolds* (Gerüststrukturen) geführt, die als Träger für Zellen dienen können und die Gewebeheilung und -regeneration unterstützen [57]. *Tissue engineering* ermöglicht die Erstellung funktionseller Ersatzgewebe im Labor, während die gezielte Modulation von Signalwegen die natürlichen Regenerationsprozesse stimulieren kann.

Diese Ansätze bieten nicht nur Hoffnung für die Behandlung von degenerativen Erkrankungen, sondern eröffnen auch ein weites Feld für weiterführende Forschung und klinische Innovationen auf dem Weg zu verbesserten regenerativen Therapien.

1.4 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Dissertation lag in der Erforschung des Einflusses von proinflammatorischen Zytokinen auf das osteogene Differenzierungspotenzial von Stromazellen aus dem Fettgewebe. Hierbei wurde ein *in vitro*-Modell verwendet, um den Entzündungszustand älterer Menschen im Kontext des Konzepts „*Inflamm-Aging*“ zu simulieren.

In welchem Maße beeinflussen unterschiedliche Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine das osteogene Differenzierungspotenzial von adipogenen Stromazellen? Welche Markerproteine werden dabei aktiviert und beeinflussen die Regulation der Knochenhomöostase?

Diese Forschung zielte darauf ab, ein vertieftes Verständnis für die Pathomechanismen zu gewinnen, die die Knochenhomöostase in Verbindung mit Entzündungen und altersbedingten Veränderungen beeinflussen. Dies sollte nicht nur zur Identifikation innovativer therapeutischer Ansätze beitragen, sondern auch ein umfassenderes Verständnis der Pathogenese der Osteoporose ermöglichen.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Geräte	Hersteller
Abzug	MC 6, Waldner Laboreinrichtungen GmbH & Co. KG; Wangen; Deutschland
Autoklav	DX-90, Systec GmbH; Linden; Deutschland
<i>Blotter</i>	Bio-Rad Mini-PROTEAN [®] Tetra Cell; München; Deutschland
Brutschrank	HERAcell 150i; Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich; Deutschland
Gefrierschrank -80 °C	Revco Ultima; Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich; Deutschland
Geldokumentationsanlage	ChemiDoc [™] MP Imaging System; Bio-Rad Laboratories GmbH; München; Deutschland

Geltransferapparatur	Trans-Blot [®] Turbo [™] ; Bio-Rad-Laboratories GmbH; München; Deutschland
Heizbad	Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreireich; Deutschland
Heizblock	Fisher Scientific dry bath FB15101; Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreireich; Deutschland
Kryo-Einfrierbehälter	Schmidt Laborgeräte GJM Handel und Service GmbH; Wien; Österreich
Kreisschüttler	KM-2; Edmund Bühler GmbH; Bodelshausen; Deutschland
Kühlschrank	Nalge Nunc International; Rochester (NY); USA
Magnetrührer	IKARET [®] control/t IKAMAG [®] safety control; IKA [®] -Werke GmbH & Co. KG; Staufen; Deutschland
Mikroskop	Zeiss Axiovert 40; Carl Zeiss AG; Oberkochen, Deutschland
	Zeiss Axiovert 200; Carl Zeiss AG; Oberkochen, Deutschland
Mikroskopkamera	Axiocam MRC; Carl Zeiss AG; Oberkochen; Deutschland

Multipipette	Multipipette [®] plus; Eppendorf AG; Hamburg; Deutschland
Multiplattenlesegerät	Perkin Elmer VICTORX3 [™] V Multilabel Counter model 1420; Waltham; USA
Neubauer Zählkammer	BRAND GmbH & Co. KG; Wertheim; Deutschland
Photometer	Eppendorf Bio Photometer
<i>Pipettboy</i>	Accujet [®] pro; BRAND GmbH & Co. KG; Wertheim; Deutschland
Pipetten	Eppendorf Research [®] fix 0,5 – 10 µl
	Eppendorf Research [®] fix 2 – 20 µl
	Eppendorf Research [®] fix 10 – 100 µl
	Eppendorf Research [®] fix 20 – 200 µl
	Eppendorf Research [®] fix 100 – 1000 µl
Saugpumpe	KNF Neuberger GmbH; Freiburg, Deutschland
Sonifiziergerät	Ultraschallprozessor UP50H; Hielscher Ultrasonics GmbH; Berlin; Deutschland

Sterilwerkbank	HERAsafe [®] ; Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreireich; Deutschland
Taumelrollenmischer	RM5-V 1750; RM5-V80 1752; Labor-technik Fröbel GmbH; Lindau; Deutschland
Vortexer	Art. No. 444-1372; VWR International GmbH; Darmstadt; Deutschland
Waage	Kern ABJ-N; Kern & Sohn GmbH; Balingen; Deutschland
	Kern 440-45; Kern & Sohn GmbH; Balingen; Deutschland
Wärmedrehschrank	Biometra OV3
Wasserbad	Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreireich; Deutschland
Zentrifuge (groß)	Heraeus Megafuge 16R; Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreireich; Deutschland
Zentrifuge (klein)	Heraeus Pico 17 Mikrozentrifuge; Fisher Scientific GmbH; Dreireich; Deutschland
	Heraeus Fresco 17 Mikrozentrifuge; Fisher Scientific GmbH; Dreireich; Deutschland

Tabelle 2: Verwendete Geräte mit Herstellerangaben

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
0,5 ml Reaktionsgefäße	Safe-Lock Tubes™; Eppendorf AG; Hamburg; Deutschland
1,5 ml Reaktionsgefäße	
2 ml Reaktionsgefäße	
6-Well Platten	GREINER CELLSTAR® Tissue Cul- ture Plates; Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Österreich
24-Well Platten	
48-Well Platten	
96-Well Platten	GREINER bio-one microplate 96-well; Greiner Bio-One GmbH; Kremsmün- ster; Österreich
15 ml Falcons	bio-one Art.-Nr.: 188171; Greiner Bio- One GmbH; Kremsmünster; Öster- reich
50 ml Falcons	bio-one Art.-Nr.: 227261; Greiner Bio- One GmbH; Kremsmünster; Öster- reich
Blotting-Filterpapier	Bio-Rad Laboratories GmbH; München; Deutschland
Einfrierröhrchen	Cryo.s™ Einfrierröhrchen 2 ml™; Greiner Bio-One GmbH; Kremsmün- ster; Österreich

Einweghandschuhe	Micro-Touch® Nitra- Tex®; Ansell GmbH; München; Deutschland
Filter (steril)	0,22 µM; MERCK Millipore; Darmstadt; Deutschland
Flaschen	1000 ml, 500 ml, 250 ml; Schott AG; Mainz; Deutschland
Gele	4 - 15 %; Mini-Protean® TGX Stain-Free™; Bio-Rad-Laboratories GmbH; München; Deutschland
	4 - 20 %; Mini-Protean® TGX Stain-Free™; Bio-Rad-Laboratories GmbH; München; Deutschland
Nitrozellulosemembran	Porengröße 0,2 µm; Biotechnologie GmbH; Erlangen; Deutschland
Pasteurpipetten aus Glas	ISO 7712; BRAND GmbH & Co KG; Wertheim; Deutschland
Pipettenspitze, 10 µl	STARLAB INTERNATIONAL GmbH; Hamburg; Deutschland
Pipettenspitze, 20 µl	
Pipettenspitze, 200 µl	
Pipettenspitze, 1000 µl	
Stripette, 2 ml	Costar® Shorty Stripette® Serological Pipets; Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
Stripette, 5 ml	
Stripette, 10 ml	

Stripette, 25 ml	
Stripette, 50 ml	
Zellkulturflasche, T-75	CELLSTAR® Cell Culture Flasks 75 cm ² red filter cap; Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Österreich
Zellkulturflasche, T-175	CELLSTAR® Cell Culture Flasks 175 cm ² red filter cap; Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Österreich
Zellschaber	blau, 40 cm; Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Österreich

Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangaben

2.1.3 Substanzen

Substanzen	Hersteller
1-Cetylpyridiniumchlorid Monohydrat	22608.180; VWR® 1-Cetylpyridiniumchlorid Monohydrat TECHNICAL; Belgien
2-Mercaptoethanol	M7154; Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
4-Nitrophenol 10mM	SIGMA 4-Nitrophenol Solution, 10mM N7660; Deutschland

Alizarin-Rot-S	Merck KGaA 106278 Alizarin red S mono sodiumsalt (C.I. 58005); MERCK Millipore; Darmstadt; Deutschland
Aqua dest (<i>Aqua destillata</i> ; steril)	1000 ml; B. Braun Melsungen AG; Melsungen, Deutschland
BSA (<i>Bovine Serum Albumine</i>)	PAA Laboratories GmbH; Cölbe; Deutschland
<i>CellTiter-Blue</i> (CTB)	Promega CellTiter-Blue® Cell Viability Assay; Wisconsin; USA
Dexamethason D1756 - ≥ 98 %	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle's edium</i> (4,5 g/l Glucose))	Gibco DMEM (1x) 500ml (+4,5g/l D-Glucose, L-Glutamin; L- Pyruvat)
DMSO (Dimethylsulfoxid D2650 - $\geq 99,7$ %)	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
Entwicklerlösung	Immobilon® Forte Western HRP Substrate; 100 ml, Cat No. WBLUF0100; MERCK Millipore; Darmstadt; Deutschland
Ethanol zur Desinfektion	MERCK Millipore; Darmstadt; Deutschland
FBS (<i>Fetal Bovine Serum</i>)	PAA Laboratories GmbH; Cölbe; Deutschland

Glycin	MERCK Millipore; Darmstadt, Deutschland
HEPES (H3375 - $\geq 99,5$ % 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure")	H3375 - $\geq 99,5$ %; Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
Kollagenase Typ I	Biochrom AG Kollagenase Typ I, CLS I
L-Ascorbinsäure-2- Phosphat	SIGMA-ALDRICH® L-Ascorbic acid 2 – phosphate sesquimagnesium salt hydrate; Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
Methanol	Merck KGaA 106009 Methanol zur Analyse EMSURE® ACS, ISO, Reag. Ph Eur
NaCl	VWR® Chemicals; Radnor, USA
Paraformaldehyd 4 %	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
PBS (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)	PAN Biotech Phosphate Buffered Saline (Dulbecco) PBS- Lösung mit Ca^{2+} , Mg^{2+}
Penicillin / Streptomycin	10000 U / ml Penicillin – 10 mg / ml Streptomycin; PAN-Biotech GmbH; Aidenbach; Deutschland
Schwefelsäure 1 mol/l	VWR® Chemicals; Radnor, USA
SDS (Natriumdodecylsulfat)	VWR® Chemicals; Radnor, USA

Tris - ≥ 99,3 %	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Deutschland
Tris-Base	MERCK Millipore; Darmstadt; Deutschland
Tris-HCL	MERCK Millipore; Darmstadt; Deutschland
Trypanblaulösung	SIGMA-ALDRICH®; Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
Trypsin/EDTA	(0,05 % / 0,02 %) in PBS, ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺ ; Biochrom GmbH; Berlin; Deutschland
Tween	SIGMA-ALDRICH® Tween®20; Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
β-Glycerophosphat	SIGMA-ALDRICH® β-Glycerophosphate disodium salt hydrate G9422 BioUltra, suitable for cell culture, suitable for plant cell culture, ≥99.0 % titration

Tabelle 4: Verwendete Substanzen mit Herstellerangaben

2.1.4 Kits

Kits	Hersteller
<i>Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)</i>	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim; Deutschland
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich; Deutschland

Tabelle 5: Verwendete Kits mit Herstellerangaben

2.1.5 Zytokine

Zytokine	Hersteller
<i>Recombinant Human IL-1β</i>	PeproTech; USA
<i>Recombinant Human IL-6</i>	
<i>Recombinant Human IL-8</i>	
<i>Recombinant Human IFNγ</i>	
<i>Recombinant Human TNFα</i>	

Tabelle 6: Verwendete Zytokine mit Herstellerangaben

2.1.6 Antikörper

Primärantikörper	Hersteller	Verdünnung
Alkalische Phosphatase	sc-271431; Santa Cruz Biotechnology; Dallas, TX; USA	1:1000 in 5 % BSA TBS-T
BMP-2	NBP1-19751; Novus Biologicals; USA	1:1000 in 5 % BSA TBS-T
Osteocalcin	sc-390877; Santa Cruz Biotechnology; Dallas, TX; USA	1:1000 in 5 % BSA TBS-T
Osteopontin	2F10, invitrogen; Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich; Deutschland	1:1000 in 5 % BSA TBS-T
RUNX2	sc-10758; Santa Cruz Biotechnology; Dallas, TX; USA	1:1000 in 5 % BSA TBS-T

Tabelle 7: Verwendete Primärantikörper mit Herstellerangaben und Verdünnung

Sekundärantikörper	Hersteller	Verdünnung
<i>Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunglobulins/HRP</i>	Dako, Dänemark, A/S	1:1000 in TBS-T
<i>Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunglobulins/HRP</i>	Dako, Dänemark, A/S	1:1000 in TBS-T

Tabelle 8: Verwendete Sekundärantikörper mit Herstellerangaben und Verdünnung

2.1.7 Medien, Puffer und Lösungen

Blotting-Puffer (2 Minigele)	40 ml Transferpuffer 50 ml Methanol ad 500 ml H ₂ O
Einfriermedium	FBS 10 % DMSO
Kollagenase-Lösung	0,001 M CaCl 0,005 M Glucose 0,1 M HEPES 0,12 M NaCl 0,05 M KCl 1,5 % BSA 0,2 % Kollagenase Typ I

<p>Laemmli-Puffer (4x)</p>	<p>252 mM Tris-HCL; pH 6,8 (2,5 ml 1 M)</p> <p>40 % Glycerol (Vol.-%, 4 ml)</p> <p>8% SDS (Gew.-%, 0,8 g)</p> <p>0,01% Bromphenolblau (eine Spatelspitze)</p> <p>ad 10 ml H₂O</p> <p>Vor Gebrauch: 20 % 2-Mercaptoethanol zusetzen (z.B. 80 µl Laemmli + 20 µl 2-Mercaptoethanol)</p>
<p>Laufpuffer bzw. Elektrophorese-Puffer</p> <p>(1:10 in Aqua dest. verdünnen)</p>	<p>30,3 g Tris (pH 8,3 – 8,8) (Einwaage, Endkonzentration in 1 x Puffer: 25 mM)</p> <p>144,2 g Glycin (Endkonzentration in 1 x Puffer: 192mM)</p> <p>10 g SDS (Endkonzentration in 1 x Puffer: 0,1 %)</p> <p>ad 1000 ml H₂O</p>
<p>Osteogenes Differenzierungsmedium</p>	<p>DMEM (+4,5 g/L D-Glucose, L-Glutamin; - Pyruvat)</p> <p>10 % FBS</p> <p>1 % Penicillin / Streptomycin</p> <p>500 nM Dexamethason</p> <p>50 µM L-Ascorbinsäure-2-Phosphat</p> <p>10 mM β-Glycerophosphat</p>

Proliferationsmedium	<p>DMEM (+4,5 g/L D-Glucose, L-Glutamin; - Pyruvat)</p> <p>10 % FBS</p> <p>1 % Penicillin / Streptomycin</p> <p>1 % HEPES</p>
RIPA-Puffer	<p>50 mM Tris (pH 8)</p> <p>150 mM NaCl</p> <p>1 % NP-40</p> <p>0,5 % Na-Deoxycholat</p> <p>0,1 % SDS</p>
TBS (<i>Tris buffered Saline</i>)	<p>7,7 mM Tris; pH 7,5 (für 10 x Puffer: 12,1 g)</p> <p>150 mM NaCl (für 10 x Puffer: 87,7 g)</p> <p>ad 1000 ml H₂O</p>
TBS-T (<i>Tris buffered Saline with Tween</i>)	<p>TBS</p> <p>1% Tween 20</p>
Tris-Glycin Transfer-Puffer	<p>18,2 g Tris-Base (Endkonzentration in 1 x Puffer: 12 mM)</p> <p>90 g Glycin (Endkonzentration in 1 x Puffer: 96 mM)</p> <p>ad 500 ml H₂O</p>

Tabelle 9: Verwendete Medien, Puffer und Lösungen mit Zusammensetzung

2.1.8 Software

Datensammlung und Datenprozessierung	Microsoft Excel 16.52, 2021
Erstellung von Abbildungen	www.BioRender.com
Literaturverwaltung	EndNote 20
Mikroskopsoftware	Axiovision Rel. 4.8
Präsentationen	Microsoft PowerPoint 16.52, 2021
Quantitative Auswertung Western Blot	BioRad Image Lab 6.1
Statistik und graphische Darstellung	Graphpad Prism 8
Textverarbeitung	Microsoft Word 16.52, 2021; 16.89.1 2024

Tabelle 10: Verwendete Software

2.2 Methoden

2.2.1 Isolation von adipogenen Stromazellen aus Fettlappen

ASCs können unter anderem aus Fettlappen von Abdominoplastiken oder Liposuktionsfett isoliert werden. Die Fettlappen für alle folgenden Versuche stammen aus der Klinik für Plastische und Ästhetische Chirurgie in Köln-Merheim.



Abb. 3 Isolation von ASCs aus Fettlappen.

Steriles Arbeiten unter der Labor-Bench, die die Isolation der ASCs aus Fettlappen ermöglicht. ASC = Adipose-derived Stromal Cells. Persönliches Foto aus dem Labor der Unfallchirurgie und Orthopädie, Life Science Center Düsseldorf, vom 15.06.2021.

Zu Beginn wurden die Fettläppchen vom Bindegewebe mittels eines sterilen Skalpell freipräpariert und Blutgefäße vollständig entfernt. Danach wurde das Fett in kleinste Stückchen zerkleinert, um 50 ml Falcons bis zur Hälfte damit zu füllen. Die Kollagenase-Lösung, bestehend aus *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (DPBS) + 1,5 % bovines Serumalbumin (BSA) + 0,2 % Kollagenase CLS

Typ 1, wurde mittels 0,2 µm Filter steril filtriert und im Verhältnis 1:1 zum Fettgewebe ins Falcon gegeben. Es folgte eine Inkubationszeit von 45 Minuten bei 37 °C auf dem Taumelrollenmischer. Im nächsten Schritt wurden autoklavierte Glas-trichter auf sterile 50er Falcons gestellt. Mit Hilfe zweier steriler Pinzetten legte man autoklavierte Filter in die Glastrichter hinein. Nach der Inkubationszeit wurde das angedaute Fettgewebe durch den Filter gegossen. Um die Filtration zu beschleunigen, entfernte man in regelmäßigen Abständen mithilfe steriler Pinzetten das Bindegewebe vom Filter. Um den Durchfluss zu beschleunigen, wurde mit den Pinzetten Druck ausgeübt. Die Falcons zentrifugierte man im Anschluss bei 300 x g für 10 Minuten. Auf den Boden des Falcons setzten sich die Zellen als Pellet ab. Darüber befand sich eine flüssige Phase, gefolgt von der oberen Phase, aus festem, gelbem Fett. Die obere Phase wurde mit Hilfe einer 25 ml Pipette abgenommen und verworfen. Die mittlere, flüssige Phase wurde bis zum Zellpellet mittels Pasteur-Pipette, welche an den Sauger angeschlossen wurde, abgesaugt. Nachdem das Zellpellet in ca. 30 ml PBS re-suspendiert wurde, folgte die Zentrifugation bei 300 x g für 10 Minuten.

In der Zwischenzeit legte man in beschriftete T75-er oder in T175-er Flaschen Proliferationsmedium vor. Die Flaschen wurden nach folgender Art und Weise beschriftet: ASC - Jahr - Monat - Tag - P (= Passage) 0 - Geschlecht - Alter. In den zentrifugierten Falcons befand sich am Boden das Zellpellet. Die Flüssigkeit darüber wurde mittels Pasteur-Pipette abgesaugt und das Pellet in 10 ml Proliferationsmedium sorgfältig re-suspendiert. Die Zellsuspension gab man in die beschrifteten Kulturflaschen, welche folglich im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert wurden.

Am Folgetag wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend erneut mit Proliferationsmedium zur weiterfolgenden Kultivierung versorgt.

2.2.2 Kultivierung von adipogenen Stromazellen

ASCs sind adhärenente Zellen und wurden in Zellkulturflaschen kultiviert. Die Zellkulturflaschen wurden im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 95% gelagert.

Es wurde zweimal die Woche das Medium gewechselt. Nach Erreichen eines sehr engen Zellkontakts, der Konfluenz der Zellen, konnten die Zellen mit Absicht der Vermehrung auf weitere Kulturflaschen aufgeteilt (gesplittet) oder für einen Versuchsstart ausplattiert werden.

Alle Versuche, an deren Anschluss die Zellen weiter kultiviert wurden, sollten unter sterilen Bedingungen unter der Sterilwerkbank durchgeführt werden.

Kulturgefäß	Volumen
T75-Flasche	Kultur: 15 ml PBS / Trypsin: 7 ml
T175-Flasche	Kultur: 30 ml PBS / Trypsin: 10 ml

Tabelle 11: Volumen je Kulturgefäß bei adhärenenten Zellen

2.2.3 Passagieren von adipogenen Stromazellen

Um die an den Zellkulturflaschen haftenden ASCs zu lösen, muss man sie mittels Trypsin-EDTA-Lösung behandeln. Das Trypsin spaltet Proteine an bestimmten Aminosäuren-Stellen. Es gehört somit zu den Endopeptidasen. Das EDTA bindet zweiwertige Kationen, wie in diesem Fall Ca²⁺. Es dient hier als Chelatbildner. Durch die Lösung werden also Adhäsionsproteine und die der Verbindung dienenden Brücken der Zellen gebrochen [58].

Das Trypsinieren dient dazu, den in Kulturflaschen enthaltenen konfluenten Zellrasen zu lösen und die Zellen auszuzählen. Zum einen kann man sie daraufhin auf mehrere Kulturflaschen aufteilen, um ihnen die Möglichkeit der weiteren Vermehrung zu gewähren. Zum anderen können die Zellen für einen Versuchsstart ausplattiert werden. Bei beiden Vorgängen erhöht sich die Passagenzahl um 1. Die Passagenzahl gibt also die Anzahl der Subkultivierungen an.

Zu Beginn wurde das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Das verwendete Volumen richtete sich hierbei und bei dem nächsten Schritt an die Größe des Kulturgefäßes (siehe Tabelle 11). Daraufhin wurde Trypsin-EDTA Lösung (1:10 mit PBS verdünnt) hinzugefügt und die Kulturflasche für 3-5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit klopfte man mit der Handinnenfläche leicht an die Kulturflasche, um die Ablösung der Zellen zu unterstützen. Dieser Vorgang wird auch als *Shake-Off-Verfahren* bezeichnet. Mit bloßem Auge erkannte man bereits die Trübung der Lösung durch die abgelösten Zellen. Anschließend kontrollierte man die abgelösten Zellen mit Hilfe des Zeiss Axiovert 40 Mikroskops. Sollten hierbei noch Zellen an der Kulturflasche haften, konnten diese mittels eines sterilen Zellschabers gelöst werden.

Um die Schädigung der Zellen zu vermeiden, wurde im nächsten Schritt mindestens die gleiche Menge (1:1) an Proliferationsmedium zu der Lösung in den jeweiligen Zellkulturflaschen hinzugefügt, welches dies unterbindet. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml-Behälter (Falcon) überführt. Das Falcon wurde bei 300 x g, Raumtemperatur (RT) und für 5 Minuten zentrifugiert. Danach wurde vorsichtig der Überstand über dem Zellpellet entnommen und verworfen. Als letztes wurde das Zellpellet in Proliferationsmedium resuspendiert und entweder in einer Neubauer-Zählkammer (siehe 2.2.4) ausgezählt oder in neue Kulturflaschen mit Proliferationsmedium ausplattiert.

2.2.4 Bestimmung der Zellzahl

Nach dem Trypsinieren und Zentrifugieren der Zellen wurde der Überstand mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 1 ml Proliferationsmedium sorgfältig resuspendiert. Bei der Zellzählung mit Trypanblau färben sich die Proteine der toten Zellen aufgrund von Membranläsionen blau an, während vitale Zellen ungefärbt bleiben. Hierzu wurden 10 µl Trypanblaulösung zu 10 µl der Zellsuspension hinzugegeben (1:2 Verdünnung). Die Lösung pipettierte man in eine Neubauer-Zählkammer und zählte die äußeren Großquadrate meanderförmig aus. Danach wurde der Mittelwert gebildet. Die Zellkonzentration / ml entspricht der gezählten Zellzahl $\times 2 \times 10^4$. Die Gesamtzellzahl errechnet sich aus dem Produkt der Zellzahl / ml und dem Suspensionsvolumen. Nachdem die Zellen gezählt wurden, konnte die Zellsuspension für den weiteren Versuchsablauf ausplattiert oder erneut in Zellkulturflaschen kultiviert werden.

2.2.5 Auftauen von Zellen

Nachdem das Proliferationsmedium auf Raumtemperatur vorgewärmt wurde, legte man es in entsprechende Kulturflaschen (hier T-75) vor. Hierbei galt für die Aussaat: ca. 5000 Zellen / cm². Sobald die Zellen aufgetaut waren, nahm man sofort die Zellsuspension mittels Pipette auf und überführte diese in die beschrifteten Kulturflaschen. Am darauffolgenden Tag erfolgte ein Mediumwechsel. Wenn dies nicht erfolgen konnte, wurde die aufgetaute Zellsuspension in ein Medium enthaltendes Falcon überführt und resuspendiert. Nach dem Zentrifugieren bei 300 x g, RT, für 5 Minuten wurde der Überstand über dem Zellpellet abgesaugt. Nach diesem Schritt konnte die Bestimmung der Zellzahl erfolgen. Letztlich wurde das Zellpellet in 1 ml Proliferationsmedium resuspendiert und in die vorbereiteten Kulturflaschen überführt.

2.2.6 Kryokonservierung

Für das Einfrieren von Zellen wurde zu Beginn das Einfriermedium angesetzt. Im ersten Schritt saugte man das Medium der Zellen mit einer Pasteur-Pipette ab. Die Zellen wurden anschließend einmal mit PBS gewaschen. Daraufhin folgten das Trypsinieren und Zentrifugieren (siehe 2.2.3). Im nächsten Schritt wurde der Überstand über dem Zellpellet abgesaugt und die Zellzahl bestimmt. Nach erneutem Zentrifugieren und Absaugen des Überstands, nahm man maximal 2×10^6 Zellen in 1 ml Einfriermedium auf und überführte dies in ein vorher beschriftetes Kryoröhrchen. Die Kryoröhrchen wurden nach folgender Art und Weise beschriftet: Art der Zellen, ID-Nummer, Geschlecht, Alter, Passage (wird nicht erhöht) und Datum der Kryokonservierung. Im letzten Schritt wurden die Kryoröhrchen sofort in einem vorgekühlten Kryo-Einfrierbehälter bei -80 °C gelagert. Frühestens nach 24 Stunden und spätestens nach 14 Tagen wurden für längere Zeit konservierte Zellen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

2.2.7 Erstellung eines Zellpools aus adipogenen Stromazellen

Die verwendeten ASCs stammten von Spendern verschiedenen Alters und Geschlechts. In dieser Arbeit wurden die Vorerkrankungen nicht berücksichtigt. Um eine für die Gesamtpopulation repräsentative Aussage der Versuche zu erhalten, bediente man sich der Zusammenführung der einzelnen ASC-Spender zu einem Zell-Pool. Hierbei fusionierte man sechs bis acht verschiedene Spender.

Zunächst wurden die einzelnen Zellen der jeweiligen Spender geerntet und ausgezählt (siehe 2.2.3). Folglich führte man die Zellen in der gleichen Zellzahl zusammen und überführte die Suspension in Kulturflaschen mit Proliferationsmedium. Im Folgenden ist die Aufteilung der Spender in die Zell-Pools aufgelistet.

Pool 1 (2×10^6 Zellen / Spender gepoolt)	Pool 2 ($1,4 \times 10^6$ Zellen / Spender gepoolt)
170927 - m - P2	200707 – m – 53 J. – P4

170831 - w - P2	170831 – w – P3
171114 - w - P2	180606 – P3
170917 - P2	170821 – w – 57 J. – P2
170912 - w – 31 J. - P2	201005 – w – 39 J. – P3
171107 - w - P2	181113 – P6
170830 - P2	
171010 - w - P2	

Tabelle 12: Auflistung der ASC-Pools

m = männlich, w = weiblich, P = Passage

2.2.8 Osteogene Differenzierung

Für die osteogene Differenzierung der ASCs über 21 Tage und unter Exposition von proinflammatorischen Zytokinen wurden Pool 1 und Pool 2 vorerst bis zu einer hinreichenden Zellzahl in Proliferationsmedium kultiviert. Jeder Zellpool sollte diesen Versuch mindestens viermal durchlaufen. Der Versuch wurde mittels 24-Well-Platten ausgeführt. Nach dem Trypsinieren und Auszählen der Zellen wurden 2×10^4 Zellen / Well ausplattiert. Bei einer Konfluenz von $> 80 \%$ konnte der Versuchsansatz begonnen werden. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Kontrolle, in der die Zellen mit Proliferationsmedium ausplattiert wurden (Tag 0), mittels Alizarin-Rot-Färbung gestoppt und photometrisch ausgewertet. Der Wert diente später dem Vergleich der osteogenen Differenzierung nach 21 Tagen. Die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α und IFN γ wurden dem osteogenen Differenzierungsmedium jeweils in sieben verschiedenen Konzentrationen hinzugefügt (siehe Abbildung 4). Man fügte dem Differenzierungsmedium IL-1 β , IL-6, TNF α und IFN γ jeweils in einer Konzentration von 250 U/ml, 100 U/ml,

50 U/ml, 20 U/ml, 10 U/ml, 5 U/ml und 2,5 U/ml hinzu. Für IL-8 wurden Konzentrationen von 50 U/ml, 20 U/ml, 10 U/ml, 5 U/ml, 2,5 U/ml, 1,25 U/ml und 0,625 U/ml verwendet. Daraus ergaben sich zwei 24-Well-Platten / Zytokin.

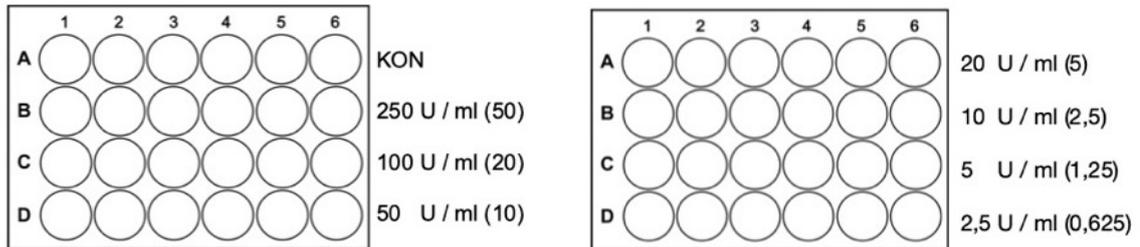


Abb. 4 Versuchsaufbau der osteogenen Differenzierung je Zytokin.

Dargestellt sind die verschiedenen Konzentrationen in Units / ml. KON = Kontrollreihe mit Differenzierungsmedium ohne Zytokin. In Klammern befinden sich die Konzentrationen in U/ml für IL-8.

Das Differenzierungsmedium mit Zytokinzusätzen wurde in 50 ml Falcons bei 4 °C, steril und lichtgeschützt aufbewahrt. Es erfolgte zweimal die Woche ein Austausch des Mediums mit vorheriger Vitalitätskontrolle und Beurteilung der Zellen mittels Mikroskops. Nach 21 Tagen wurde der Versuch der osteogenen Differenzierung unter proinflammatorischen Zytokinen mittels Alizarin-Rot-Färbung gestoppt und mittels Photometer ausgewertet.

2.2.10 Alizarin-Rot-Färbung und Rücklösung

Zur Vorbereitung der Alizarin-Rot-Färbung und Rücklösung wurden 0,5 % Alizarin-Rot-S in *Aqua dest.* und 10 % Cetylpyridinium-Chlorid (CPC) in *Aqua dest.* gelöst. Die Lösungen wurden in 50er Falcons angesetzt und konnten zur gleichmäßigen Durchmischung für 1-2 Stunden auf den Taumelrollenmischer gelegt werden.

Bei diesem Versuch war das sterile Arbeiten nicht mehr notwendig, da die Zellen im Anschluss nicht mehr weiter kultiviert wurden. Wichtig war aber, dass alle Vorgänge mit potenziell schädlichen Substanzen unter dem Abzug durchgeführt wurden.

Zu Beginn wurde das im Gefrierschrank gelagerte Paraformaldehyd (PFA) im Wasserbad aufgetaut. Nachdem das Medium der Zellen abgesaugt wurde, wurden diese einmal mit 0,5 ml PBS/Well gewaschen. Das PBS wurde abgesaugt und man gab 0,5 ml/Well PFA-Lösung (4 %) hinzu, um die Zellen für 15 Minuten bei RT zu fixieren. Im Anschluss daran wurde einmal mit *Aqua dest.* gewaschen und die Alizarin-Rot-Lösung (0,5 ml/Well) hinzugegeben. Es folgte eine 20-minütige Inkubation bei 37 °C. Nach der Inkubationszeit wurde die Färbelösung durch *tapping* abgekippt und die Zellen vorsichtig mit *Aqua dest.*, bis der Überstand farblos war, gewaschen. Als letztes überschichtete man die Zellen mit PBS. Somit konnten die Zellen ohne die Gefahr des Austrocknens mittels eines Mikroskops fotografiert werden. Dabei wurde die angefärbte Kalzifizierung der osteogenen Matrix ersichtlich.

Für die Rücklösung der Alizarin-Rot-Färbung [59] und quantitative Auswertung der osteogenen Differenzierung wurde nach dem Fotografieren der Zellen zuerst das PBS abgenommen. Die CPC-Lösung wurde auf die Zellen gegeben (0,5 ml/Well) und es folgte eine 1-2-stündige Inkubation bei RT. Bei intensiver Färbung gab man zusätzlich 1 ml/Well der CPC-Lösung hinzu und berücksichtigte diesen Faktor (1:2) für die spätere Berechnung der Werte.

Als letztes pipettierte man 0,5 ml der Zellsuspension/Küvette. Wenn die Färbung für die photometrische Messung zu dicht war, konnte man 1:10 mit *Aqua dest.* verdünnen. Der Verdünnungsfaktor wurde für die Auswertungen berücksichtigt. Letztendlich konnten die Zellsuspensionen in den Küvetten einzeln im Photometer bei OD_{600} gemessen werden, wobei man im Sinne der Kalibrierung als *Blank* 0,5 ml der reinen CPC-Lösung verwendete. Dieser Wert wurde in der Auswertung von den übrigen subtrahiert.

2.2.12 CellTiter-Blue-Viabilitäts-Assay

Bei dem CellTiter-Blue-Viabilitäts-Assay werden lebende Zellen dargelegt. Der blaue Farbstoff CellTiter-Blue, welcher Resazurin enthält, wird von vitalen Zellen in einen violetten Farbstoff mit Resorufin umgewandelt [60].

Für den Versuchsansatz wurde zuerst eine Lösung mit CellTiter-Blue im Verhältnis 1:20 mit Proliferationsmedium angesetzt. Das Medium der Zellen wurde abgesaugt und die CellTiter-Blue Lösung (250 µl/Well/48-Well-Platte) wurde hinzugegeben. Als *Blank* wurde die Lösung in zwei zellfreien Wells mitgeführt. Dieser Wert wurde in der Auswertung von den Übrigen abgezogen. Während der Inkubationszeit von einer Stunde bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank durfte dieser nicht geöffnet werden. Daraufhin folgte die Überführung in 96-Well-Platten. Hierzu pipettierte man in Dubletten 100 µl/Well des Überstands und des *Blanks*. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich nach dem Pipetieren keine Luftbläschen in den Wells befanden, um die Messung nicht zu beeinflussen. Im Multiplattenlesegerät erfolgte die Messung des Fluoreszenzmaximums von Resorufin bei 590 nm. Zur Auswertung wurde von allen Werten der Mittelwert des Blanks subtrahiert.

Falls die Zellen im Anschluss daran weiter kultiviert werden sollten, mussten sie einmal mit PBS gewaschen und mit frischem Proliferationsmedium versorgt werden.

2.2.13 BrdU-Zellproliferations-Assay

Das BrdU-Zellproliferations-Assay stellt eine Alternative zur Bestimmung der Zellproliferation dar, die sich auf die DNA-Synthese von proliferierenden Zellen bezieht. Das Thymidin-Analogon 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) bindet an die denaturierte DNA [61]. Der an das BrdU bindende Antikörper kann mittels einer Substrat-Reaktion im Spectrophotometer quantifiziert werden. Die Absorptionsrate bei der Wellenlänge 540 nm korreliert schließlich mit der Menge der DNA-Synthese von proliferierenden Zellen.

Zu Beginn wurden die ASCs trypsiniert, ausgezählt und mit einer Zellzahl von 1×10^4 Zellen/100 μ l/Well auf 96-Well-Mikrotiterplatten ausplattiert. Nach 24 Stunden wurde das Medium, nachdem die Zellen angewachsen waren, abgenommen und Differenzierungsmedium mit definierten Zytokinkonzentrationen wurde hinzugegeben. Die folgenden Zytokinkonzentrationen ergaben sich aus dem Versuch der osteogenen Differenzierung unter proinflammatorischen Zytokinen über 21 Tage (siehe 3.4):

OM + 100 U/ml IL-1 β

OM + 50 U/ml IL-6

OM + 10 U/ml IL-8

OM + 100 U/ml TNF α

OM + 20 U/ml IFN γ

Dabei handelte es sich um die Konzentrationen, bei denen das größte bzw. geringste Ausmaß an osteogener Differenzierung detektiert wurde. Als Kontrolle diente das osteogene Differenzierungsmedium (OM) ohne Zytokinzusätze.

Die Platten wurden für 3 bzw. 7 Tage bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert. Um den Tag 3-Versuch bzw. Tag 7-Versuch zu stoppen, wurde zuerst 10 μ l/Well des *BrdU-Labeling* hinzugegeben, welches vorerst in einer 1:100 Lösung mit sterilem Proliferationsmedium verdünnt wurde. Danach folgte eine 24-stündige Inkubationszeit im Brutschrank. Am folgenden Tag, nachdem das Medium abgesaugt wurde, gab man 200 μ l/Well des FixDenat hinzu. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei RT entfernte man die Lösung, indem man die Platte ausklopfte. Nach diesem Versuchsschritt konnte man den Versuch stoppen, um ihn zu einem späteren Zeitpunkt fortzusetzen. Die Mikrotiter-Platten mit den trockenen Zellen konnten hierzu für bis zu einer Woche bei RT gelagert werden.

Zur weiteren Durchführung setzte man vorerst die Arbeitslösung an. Da man dafür die Stocklösung benötigte, wurde zuerst das *Anti-BrdU-POD* (Peroxidase) mit 1,1 ml *Aqua dest.* für 10 Minuten gelöst. Diese Stocklösung wurde zur Lagerung zu jeweils 100 μ l aliquotiert. Für die Herstellung der Arbeitslösung wurden 100 μ l

Stocklösung mit 10 ml der *Antibody Dilution Solution* verdünnt. Es wurden 100 µl/Well der Arbeitslösung pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 90 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Versuchsplatte auf Zellstoff ausgeklopft. Daraufhin spülte man die Platte dreimal mit jeweils 300 µl Waschpuffer je Well und klopfte diese erneut aus. Bevor die Platten für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurden, pipettierte man 100 µl/Well des Substrats. Für die Stopplösung verwendete man 1 M Schwefelsäure, indem 1 ml H₂SO₄ in 10 ml *Aqua dest.* gelöst wurden. Im letzten Schritt wurden 25 µl der Stopplösung je Well hinzugegeben, bevor die Messung bei 450 nm im Multiplattenlesegerät erfolgte.

2.2.14 Alkalische Phosphatase-Assay

Für den Nachweis der Alkalischen Phosphatase wurden die ASCs trypsiniert, ausgezählt und mit einer Zellzahl von 1×10^4 Zellen/500 µl/Well auf 48-Well-Platten ausplattiert. Nach 24 Stunden wurde das Medium verworfen und Differenzierungsmedium mit definierten Zytokinkonzentrationen (siehe 2.2.13) hinzugegeben:

OM als Kontrolle

OM + 100 U/ml IL-1 β

OM + 50 U/ml IL-6

OM + 10 U/ml IL-8

OM + 100 U/ml TNF α

OM + 20 U/ml IFN γ

Die Platten wurden für 3, 7, 14 und 21 Tage bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert.

Zu Beginn wurde das Medium abgenommen und die Zellen wurden einmal mit PBS (500 µl/Well/24-Well-Platte bzw. 250 µl/Well/48-Well-Platte) gewaschen. Nachdem das PBS abgesaugt wurde, pipettierte man 200 µl der *4-Nitrophenol-*

Solution in jedes Well. Hierbei wurden zwei Wells nur mit der Lösung als *Blank* mitgeführt. Dieser Wert sollte bei der Auswertung von den übrigen Werten abgezogen werden. Die Platte inkubierte für 10 Minuten im Dunkeln. Anschließend pipettierte man 100 µl/Well des Überstands und des mitgeführten *Blanks* in Duplikaten in eine 96-Well-Platte. Bei einer sehr intensiven Gelbfärbung oder zu hohen Messwerten von OD > 1,5 musste man im Verhältnis von 1:11 mit *Aqua dest.* verdünnen (10 µl vom Überstand + 100 µl *Aqua dest.*). Die Gelbfärbung entsprach der Aktivität der Alkalischen Phosphatase. Die alkalische Phosphatase setzt das Substrat p-Nitrophenolphosphat zu Nitrophenol und einem anorganischen Phosphatmolekül um. Das Nitrophenol sorgt für die Gelbfärbung und kann kolorimetrisch gemessen werden.

Schlussendlich erfolgte die Messung mit Hilfe des Multiplattenlesegeräts bei einer Wellenlänge von 405 nm.

2.2.15 Aufarbeitung der Proben für die Proteinbestimmung und Proteinisolation

An Tag 7, 14 und 21 wurden die Zellen für die Proteinbestimmung und den anschließenden Western-Blot gewonnen. Hierzu plattierte man Zellen aus Pool 1 und 2 auf 6-Well-Platten aus und kultivierte diese in osteogenem Differenzierungsmedium und folgenden Zytokinkonzentrationen:

OM als Kontrolle

OM + 100 U/ml IL-1 β

OM + 100 U/ml TNF α

OM + 20 U/ml IFN γ

Für das Gewinnen der Zellen wurde das Medium abgesaugt und 500 µl Trypsin-EDTA Lösung (1:10 mit PBS verdünnt) je Well pipettiert. Nach einer 2-3-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur, löste man die Zellen mit einem Zellschaber ab. Danach gab man 500 µl Proliferationsmedium je Well hinzu. Die Zelllösung

wurde mittels Pipette resuspendiert und in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt. Diese zentrifugierte man bei 10.000 x g für eine Minute. Der Überstand wurde verworfen, ohne das Zellpellet an der Basis der Reaktionsgefäße zu gefährden. Im Anschluss daran wurden 30 µl des RIPA-Puffers je Reaktionsgefäß pipettiert. Die Proben konnten bei Bedarf für längere Zeit bei -80 °C aufbewahrt werden.

Bezüglich der Proteinsolation musste man die Proben nach dem Ernten und Hinzugeben des RIPA-Puffers oder nach dem Auftauen der fertigen Proben zur Zelllyse sonifizieren. Dies wurde bei einer Amplitude von 80 und Cycle von 0,5 je Reaktionsgefäß für 10 Stöße durchgeführt.

2.2.16 Proteinbestimmung

Das BCA-Proteinassay kombiniert die bekannte Reaktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} durch Proteine in einem alkalischen Medium mit dem hochempfindlichen und selektiven kolorimetrischen Nachweis des Kupferkations durch Bicinchoninsäure [62]. Der erste Schritt, auch Biuret-Reaktion genannt, beinhaltet die Chelatierung von Kupfer mit Proteinen in einer alkalischen Umgebung, um einen hellblauen Komplex zu bilden. Dies beruht darauf, dass Peptide mit mindestens drei Aminosäureresten in Anwesenheit von Kalium-Natrium-Tartrat-Tetrahydrat einen farbigen Chelatkomplex mit Kupferionen bilden. Im zweiten Schritt der Farbentwicklungsreaktion reagiert Bicinchoninsäure (BCA) mit dem reduzierten Kupferkation, das im ersten Schritt gebildet wurde. Das intensive lilafarbene Reaktionsprodukt resultiert aus der Chelatierung von zwei BCA-Molekülen mit einem Kupferion. Der wasserlösliche BCA-Kupfer-Komplex weist bei 562 nm eine lineare Absorption in Abhängigkeit von steigenden Proteinkonzentrationen auf.

Nachdem die Proben im Rahmen der Proteinisolation sonifiziert wurden, stellte man diese in einem Reaktionsgefäßständer aus Metall auf Eis. Die Proben verdünnte man im Verhältnis 1:6 mit PBS, indem man in 1,5 ml Eppendorfer Reaktionsgefäße 4 µl der Probe vorlegte und 20 µl PBS hinzugab. Diese wurden nach dem Vortexen in aufsteigender Zahl nach der Anzahl der Proben nummeriert.

Zur Herstellung des BSA-Standards folgende Tabelle:

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

Tabelle 13: BSA-Standard-Verdünnung (Proteinbestimmung)

Jeweils 10 μl des Standards in aufsteigender Konzentration und jeweils 10 μl der Proben wurden als Dubletten im Sinne einer Doppelbestimmung in eine 96-Well-Platte pipettiert.

Zur Herstellung des BCA *Working Reagent* (WR) verwendete man folgende Formel, um das benötigte Volumen zu errechnen:

Volumen WR = (# Standard + # Proben) x (# Anzahl Replikate) x (Volumen WR pro Probe = 200 μl)

Nachdem man das benötigte Volumen errechnete, setzte man in einem 50 ml Falcon das WR in einer 50:1 Verdünnung von Reagent A und B des Protein Assay Kit von Thermofisher Scientific an (50 Teile Reagent A + 1 Teil Reagent B, z.B. für 5 ml WR = 5 ml A + 100 µl B). Das WR konnte bei Bedarf für mehrere Tage im geschlossenen Zustand bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

Es wurden 200 µl WR/Well in die Mikrotiterplatte pipettiert. Die Platte wurde mit einer Folie abgeklebt und anschließend für 30 Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Inkubationszeit konnte auf bis zu zwei Stunden verlängert werden.

Vor der Durchführung der Messung mittels Multiplattenlesegerät, musste die Platte auf Raumtemperatur herunterkühlen. Die Messung der Absorption erfolgte dann bei einer Wellenlänge von 562 nm. Anhand der gewonnenen Werte konnten im letzten Schritt die Proben und *Aqua dest.* in Eppendorfer Reaktionsgefäßen zusammengefügt werden. Dadurch wurde garantiert, dass jede 12 µl Probe 10 µg Protein enthielt. Die Proben konnten nun zur Verwendung zu einem späteren Zeitpunkt im Gefrierschrank weggefroren werden oder im nächsten Schritt weiterverwendet werden.

2.2.17 SDS-Page

Die *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-Page) ermöglicht die Auftrennung von Proteinen bezüglich ihres Molekulargewichts in einem Polyacrylamid (PAA)-Gel. Bei der Auftrennung der Proteine im elektrischen Feld durch die Gelmatrix wandern kleinere Proteine aufgrund des geringeren Widerstands der Gelmatrix schneller. Weitere Einflüsse auf die Migrationsgeschwindigkeit sind Struktur und Ladung der Proteine. Bei der SDS-Page werden die Proteine jedoch ausschließlich basierend auf ihrer Polypeptidkettenlänge getrennt. Durch die Verwendung von SDS und PAA wird der Einfluss von Struktur und Ladung weitgehend eliminiert.

Zunächst wurden die Proben nach der Proteinbestimmung, wenn sie in einem Zwischenschritt eingefroren wurden, aufgetaut und anschließend auf Eis gelagert. Der Laemmli-Puffer (siehe Tabelle 8) wurde im Verhältnis von 4:1 mit β-

Mercaptoethanol (siehe Tabelle 13) unter dem Abzug angesetzt. Dabei wurde berücksichtigt, dass man 5 µl/Probe benötigte.

Anzahl der Gele	Laemmli-Puffer + β -Mercaptoethanol in μ l
2	160 + 40
4	320 + 80
5	400 + 100
6	480 + 120

Tabelle 14: Gele und Menge von Laemmli-Puffer + β -Mercaptoethanol

Die Proben wurden mit jeweils 5 µl Laemmli-Puffer + β -Mercaptoethanol versetzt und bei 10.000 x g für eine Minute bei Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben für 5 Minuten bei 95 °C erhitzt. SDS weist eine denaturierende Wirkung auf und bindet in konstantem Molverhältnis an das Proteinerückgrat. In Gegenwart von SDS und β -Mercaptoethanol einem Reduktionsmittel, das Disulfidbindungen spaltet, entfalten sich Proteine zu linearen, negativ geladenen Ketten. In der Zwischenzeit wurde die Proteinleiter aufgetaut und auf Eis gelagert. Die bereits fertigen Gele (4 - 15 % bzw. 4 - 20 %) wurden in das duale Elektrophorese-System eingesetzt und die Gelkämme wurden vorsichtig entfernt. Je nach Konzentration des Trenngels wandern die Proteine unterschiedlich schnell. Das Gel besteht aus einer *stacking* (im oberen Bereich, pH 6,8) und *running* (darunter, pH 8,8) Schicht. Die Schichten unterscheiden sich im Hinblick auf den prozentualen Anteil von Acrylamid. Die Verwendung einer höheren Acrylamidkonzentration erzeugt ein Gel mit einer kleineren Porengröße, sodass dies für die Trennung kleiner Proteine geeignet ist. Deshalb muss man eine geeignete Gelkonzentration für das Zielprotein verwenden, um eine angemessene Aufteilung der Proteine zu ermöglichen.

Nachdem die Proben bei 95 °C erhitzt wurden, lagerte man sie sofort auf Eis. Die Gele wurden mit jeweils 6 µl der Proteinleiter in der ersten Geltasche beladen. In die restlichen Geltaschen pipettierte man 13 µl der Proben. Als nächstes wurde die Kammer der Laufapparatur mit Laufpuffer (siehe Tabelle 8) aufgefüllt und das System wurde mit 60 V gestartet. Während der Gelelektrophorese wandern die negativ geladenen Proteine zur positiv geladenen Anode. Durch die Beladung im Sammelgel können die Proteine in einer Reihe konzentriert werden, bevor sie in das Trenngel gelangen und weiter zur Anode wandern. Nachdem die Proteine durch das Sammelgel gewandert waren, wurde mit 110-130 V für 20 Minuten fortgesetzt. Die elektrische Spannung konnte bis zu 160-190 V erhöht werden. Man stoppte die Gelelektrophorese, sobald der Marker anfang auszulaufen. Somit wurden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

2.2.18 Western-Blot-Analyse: Transfer, Immunmarkierung und Detektion der Chemiluminescence (Bio-Rad)

Nach dem Gellauf erfolgte die Aufnahme des Gels mit dem ChemiDoc MP. Danach wurden sie kurz in Blotting-Puffer äquilibriert. Für den Transfer wurden zunächst Blotting-Papier und Membran in Blotting-Puffer (siehe Tabelle 8) befeuchtet. Dabei wurde darauf geachtet, dass mögliche Luftblasen entfernt wurden. Der Transfer war von der Anode zur Kathode wie folgt aufgebaut: 1 x 2,5 mm Blotting-Papier, Nitrocellulose-Membran, Gel, und 1 x 2,5 mm Blotting-Papier. Die Transferzeit betrug 10 Minuten. Im Anschluss daran wurde für die folgenden Schritte die Membran in ein 50 ml Falcon gelegt. Während der Einwirkzeiten gab man sie für die vollständige Erfassung jeder Stelle der Membran auf den Taumelrollenmischer. Zunächst wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 10 ml der Lösung aus 5% BSA in TBS-T (siehe Tabelle 8) geblockt. Daraufhin folgte die Inkubation über Nacht bei 4 °C mit dem ersten Antikörper. Als Primäantikörper wurden Alkalische Phosphatase, BMP-2, Osteocalcin, Osteopontin und RUNX-2 verwendet. Hierfür wurde in einem Verhältnis von 1:1000 verdünnt. Es wurden also 3 µl des Antikörpers zu den 3 ml BSA + TBS-T hinzugefügt. Am Folgetag wurde die Membran zunächst dreimal für 5 Minuten mit TBS-T

gewaschen. Nach dem Waschvorgang wurde der Zweitantikörper im Verhältnis von 1:1000 mit Waschpuffer verdünnt. Dafür gab man 4 µl Goat-Anti-Mouse-oder Goat-Anti-Rabbit-Antikörper in 4 ml TBS-T. Die Membran wurde anschließend für eine Stunde, bei Raumtemperatur und im Dunkeln inkubiert. Vor der Detektion mit ChemiDoc MP wurde die Membran erneut dreimal in TBS-T gewaschen.

Für die Chemiluminescence Detektion mittels Geldokumentationsanlage (siehe Tabelle 1) wurde die Membran mit einer Luminal-haltigen Entwicklerlösung benetzt. Zuletzt folgte die Auswertung der Banden mit Hilfe des *Image-Lab* Programms.

2.2.20 Statistische Auswertung

In Anbetracht der korrekten Auswertung der Ergebnisse erfolgte die Absprache mit Punkt05 Statistikberatung. Zur graphischen Darstellung und Analyse der Daten verwendete man die Statistik Software *Prism*. Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte mit oder ohne Standardabweichung (SD) dargestellt. Das Signifikanzniveau α wurde zuvor als $\alpha = 0,05$ ausgewählt. Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert kleiner als das Signifikanzniveau α , also $p < 0,05$ bewertet. Zunächst ermittelte man die Normalverteilung der ausgewerteten Daten mittels Shapiro-Wilk Test. Für die Analyse von Werten, die große Abweichungen untereinander aufwiesen, nutzte man den non-parametrischen Kruskal-Wallis-Test. Hierbei wurde die Relation der Werte zueinander betrachtet und nicht die Abstände voneinander. Bei normalverteilten Daten setzte man die Varianzanalyse nach one-way-ANOVA (*analysis of variance*) ein.

2.2.21 Ethikvotum

Die Ethikkommission äußerte keine ethischen oder rechtlichen Bedenken zur Etablierung einer nicht personenbezogenen Sammlung von Körpergeweben und Blutproben zur Erstellung einer Gewebe- und Zellbank für wissenschaftliche Zwecke. Es liegt ein Ethikvotum vom 03.11.2016 mit dem Aktenzeichen 3634 vor.

3. Ergebnisse

3.1 Wachstumskinetik der adipogenen Stromazellen

Um eine effektive Zellzahl mit einem linearen Wachstum für den Beginn des osteogenen Differenzierungsversuchs von ASCs zu bestimmen, wurden Zellen aus Pool 1 in unterschiedlichen Mengen auf Zellkulturplatten ausgesät. Hierbei verwendete man 4 Ansätze mit jeweils 5×10^3 , 10^4 , 2×10^4 und 4×10^4 Zellen / Well / 24-Well-Platte. Der Versuch wurde mithilfe des CellTiter-Blue-Assays am dritten, fünften und siebten Tag analysiert. Das Ziel war es, eine Zellzahl zu wählen, bei der innerhalb kurzer Zeit eine zusammenhängende Zellschicht im Sinne eines konfluenten Zellrasens entsteht. Daher durfte die Zellanzahl weder zu niedrig noch im Sinne der Kontaktinhibition zu hoch sein.

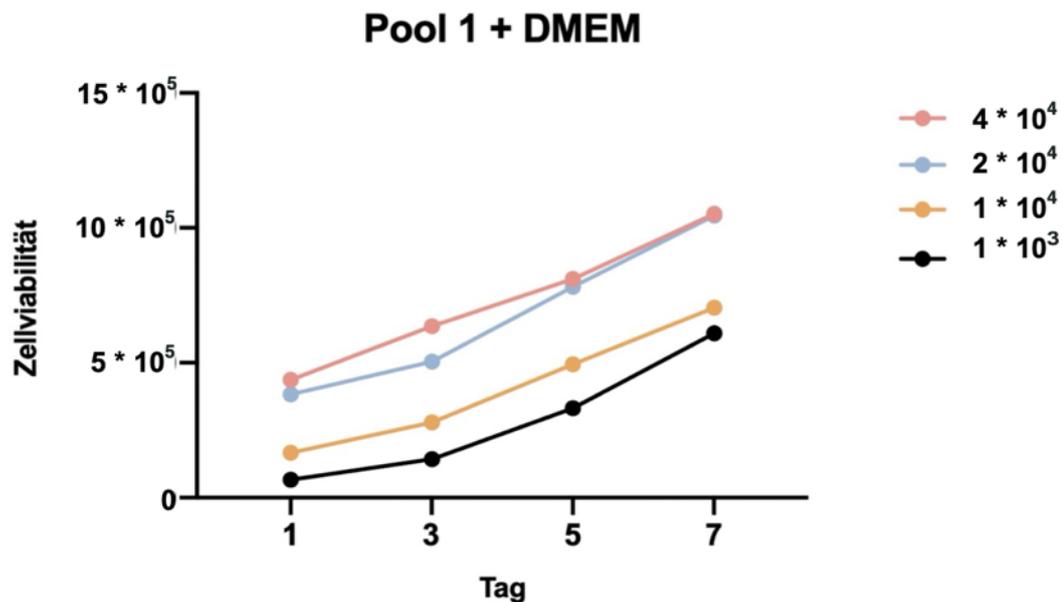


Abb. 5 Wachstumskinetik im zeitlichen Verlauf mittels CTB, Pool 1 + DMEM.

Dargestellt sind vier Versuchsansätze mit verschiedenen Zellzahlen zu Beginn. Hierbei wurden ASCs aus Pool 1 in DMEM kultiviert. An Tag 3, 5 und 7 wurde die Zellviabilität mittels CellTiter-Blue-Assay in absoluten Zellzahlen ermittelt, um Rückschlüsse auf die in den Folgeversuchen zu verwendende Zellzahl zu ziehen.

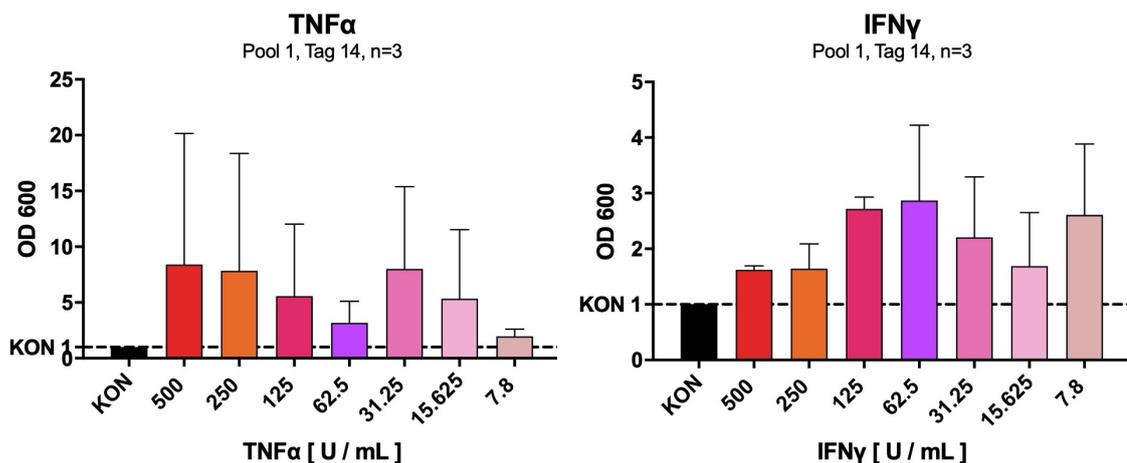
In Abbildung 5 wird die Wachstumskinetik der vier Versuchsansätze mit unterschiedlichen Zellzahlen über einen Zeitraum von sieben Tagen dargestellt. Bei

den Ansätzen mit ursprünglich 10^3 Zellen und 10^4 Zellen zeigte sich im Vergleich zu den anderen Ansätzen, dass nach sieben Tagen keine ausreichend hohe Zellzahl erreicht wurde. Der Vergleich zwischen Tag 1 und Tag 7 der Ansätze mit ursprünglich 2×10^4 bzw. 4×10^4 Zellen zeigte, dass an Tag 7 eine annähernd gleiche Zellzahl erreicht wurde.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Aussaat von 2×10^4 Zellen pro Well die optimale Wahl für den Beginn der osteogenen Differenzierung war, da sie eine ausreichende Zellkonfluenz innerhalb eines angemessenen Zeitrahmens ermöglichte und gleichzeitig wirtschaftlich sinnvoll war.

3.2 Gesteigerte Osteogene Differenzierung adipogener Stromazellen unter proinflammatorischen Zytokinen

Um im Vorversuch die geeigneten Konzentrationen der Zytokine für die folgenden Versuche zu bestimmen, wurden ASCs in drei Ansätzen über einen Zeitraum von 14 Tagen mit osteogenem Differenzierungsmedium inkubiert. Jeder Ansatz wurde dabei mit $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$ und IL-6 behandelt.



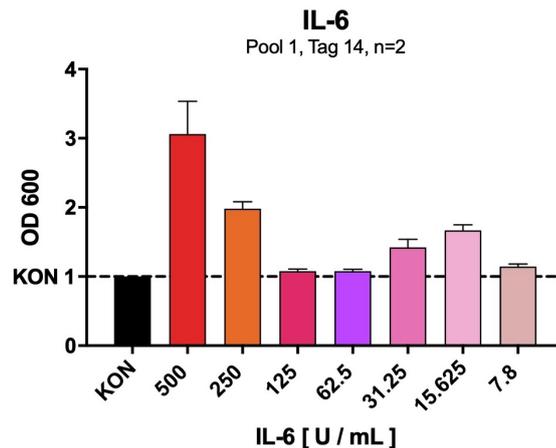


Abb. 6 Alizarin-Rot-Färbung Tag 14, OM + $TNF\alpha$, $IFN\gamma$ und IL-6.

Dargestellt ist die quantitative Auswertung der Alizarin-Rot-Färbung nach einer 14-tägigen Kultivierung mit osteogenem Differenzierungsmedium und verschiedenen Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine in U / ml. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardfehler. KON = Kontrolle mit osteogenem Differenzierungsmedium ohne Zytokin. OM = osteogenes Differenzierungsmedium. OD = optische Dichte. Messung der OD bei 600 nm. n=3, bzw. n=2 für IL-6.

In Abbildung 6 wird die quantitative Auswertung der osteogenen Differenzierung von ASCs nach 14 Tagen mittels Photometer präsentiert. Hier konnte man bereits feststellen, dass die Behandlung der ASCs mit dem Zusatz von proinflammatorischen Zytokinen im osteogenen Differenzierungsmedium (OM) im Vergleich zur Kontrolle ohne proinflammatorische Zytokine im OM eine verstärkte osteogene Differenzierung bewirkt hat.

Die Anwendung von $TNF\alpha$ führte in jeder Konzentration zu einer Steigerung der osteogenen Differenzierung um mindestens das Doppelte im Vergleich zur Kontrolle. Insbesondere bei Konzentrationen von 500 U/ml, 250 U/ml und 31,25 U/ml wurden Werte von durchschnittlich bis zu einer optischen Dichte (OD) von 8 gemessen.

Auch die Behandlung mit $IFN\gamma$ zeigte eine Steigerung der osteogenen Differenzierung in jeder Konzentration. Mit abnehmender Konzentration wurde eine Zunahme von bis zu durchschnittlich 2,87 bei 62,5 U/ml erreicht. Nachfolgend sanken die Werte der OD mit weiterer Reduktion der $IFN\gamma$ -Konzentration. Eine Verringerung der Konzentration auf 7,8 U/ml führte schließlich zu einem erneuten Anstieg der osteogenen Differenzierung bis zu einer OD von durchschnittlich 2,61.

Für die Behandlung mit IL-6 verzeichnete man für die Konzentrationen 125 U/ml, 62,5 U/ml und 7,8 U/ml einen nahezu ähnlich schwachen Anstieg der osteogenen Differenzierung im Vergleich zur Kontrolle mit einer OD von durchschnittlich 1,1. Die höchsten Anstiege der OD wurden für 500 U/ml und 250 U/ml mit durchschnittlichen Werten von 3,06 bzw. 1,98 dokumentiert.

In diesem Versuch bewirkte die Zugabe von proinflammatorischen Zytokinen zum OM eine Steigerung der osteogenen Differenzierung. Um zu untersuchen, ob eine längere Kultivierung eine Auswirkung auf die Differenzierung der Kontrolle hat, wurde in den Folgeversuchen die Kultivierung für den Zeitraum von 21 Tagen gewählt. Außerdem sollten in den folgenden Versuchen niedrigere Zytokinkonzentrationen untersucht werden. Dies diene dazu, eine potenzielle Hemmung der osteogenen Differenzierung unter proinflammatorischen Zytokinen niedriger Konzentrationen zu verzeichnen.

3.3 Makroskopische und mikroskopische Darstellung der osteogenen Differenzierung adipogener Stromazellen

Um die osteogene Differenzierung von ASCs nach 21-tägiger Exposition gegenüber proinflammatorischen Zytokinen sowohl visuell als auch quantitativ zu dokumentieren, wurden die Alizarin-Rot-Färbung und Rücklösung durchgeführt. Dabei wurde untersucht, ob die Behandlung mit proinflammatorischen Zytokinen für 21 Tage einen fördernden oder hemmenden Einfluss auf die osteogene Differenzierung von ASCs ausübt.

Im nachfolgenden Abschnitt werden exemplarisch bildliche Darstellungen, sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch, der Behandlung mit $\text{TNF}\alpha$ präsentiert.

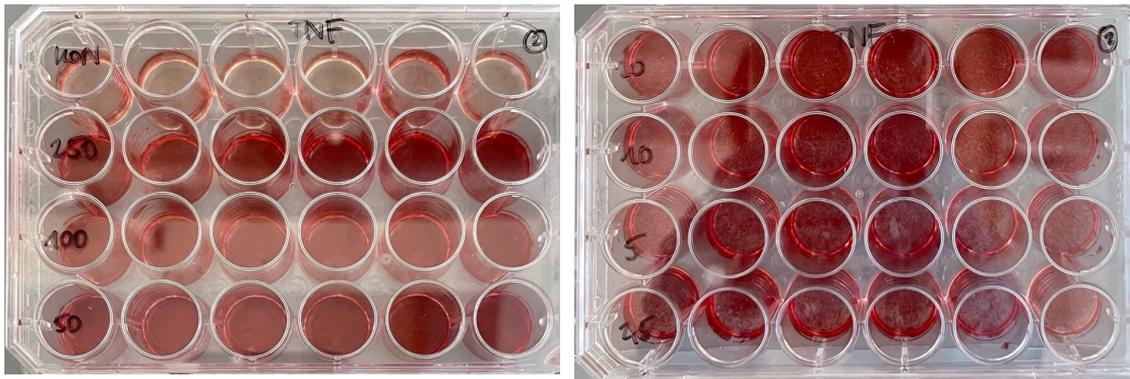


Abb. 7 Alizarin-Rot-Färbung nach 21 Tagen OM + TNF α .

Dargestellt ist die Alizarin-Rot-Färbung von ASCs nach Kultivierung für 21 Tage in osteogenem Differenzierungsmedium und TNF α . Jede Reihe zeigt in absteigender Reihenfolge eine unterschiedliche Konzentration des Zytokins in U / ml (siehe Abb. 4). OM = osteogenes Differenzierungsmedium. KON = Kontrolle mit osteogenem Differenzierungsmedium ohne Zytokin.

In Abbildung 7 ist ein vollständiger Versuchsansatz der Behandlung von ASCs mit osteogenem Differenzierungsmedium und TNF α nach 21 Tagen dargestellt. Die Aufnahme erfolgte nach der Anfärbung des Ca²⁺ in der Extrazellulärmatrix mittels Alizarin-Rot und vor der Rücklösung mittels CPC. Auf der linken 24-Well-Platte ist in der obersten Reihe eine schwächere Anfärbung der Kontrollreihe ohne TNF α erkennbar. Dies lässt darauf schließen, dass TNF α einen positiven Einfluss auf die osteogene Differenzierung haben könnte.

Zur weiteren Veranschaulichung wurden die folgenden Aufnahmen der Abbildungen 8-15 mittels Zeiss Axiovert Mikroskops in 5-facher Vergrößerung durchgeführt. Es zeigte sich durchweg ein konfluenter Zellrasen. Durch die Anfärbung des Ca²⁺ in der Extrazellulärmatrix mittels Alizarin-Rot konnte die osteogene Differenzierung visualisiert werden. Die Intensität der osteogenen Differenzierung korreliert mit den Ergebnissen aus Kapitel 3.4.

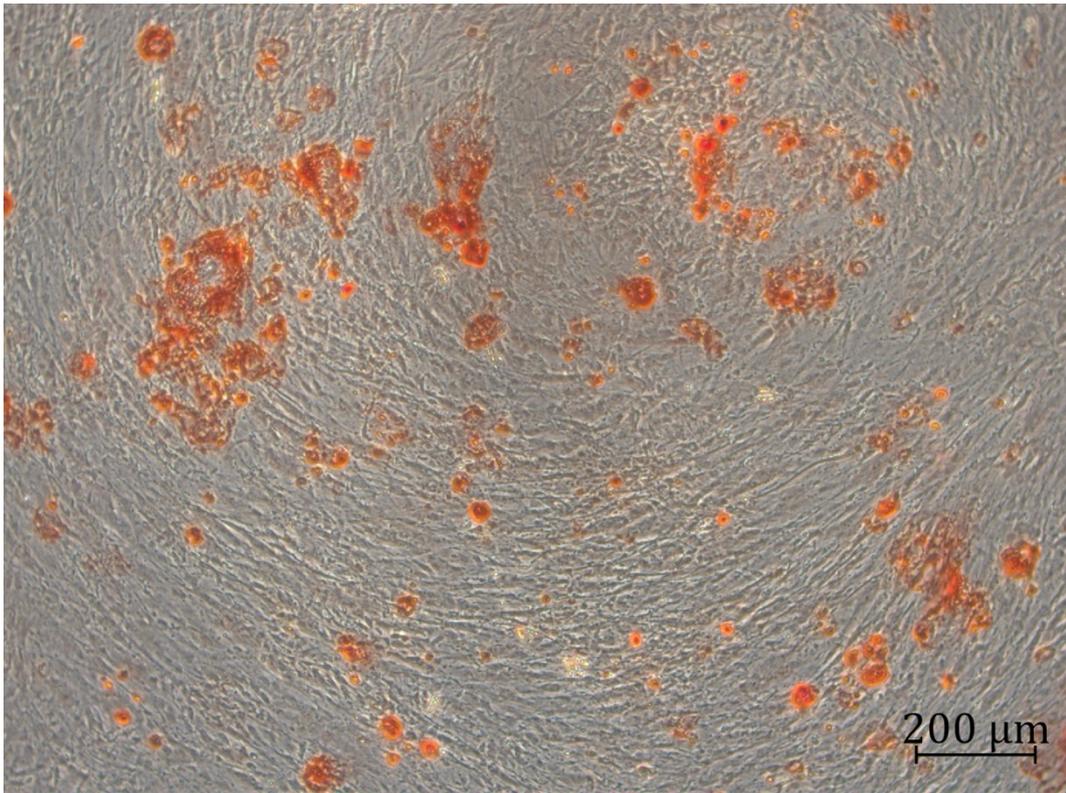


Abb. 8 Alizarin-Rot-Färbung ASC KON = OM ohne Zytokin, Tag 21, 5-fache Vergrößerung.

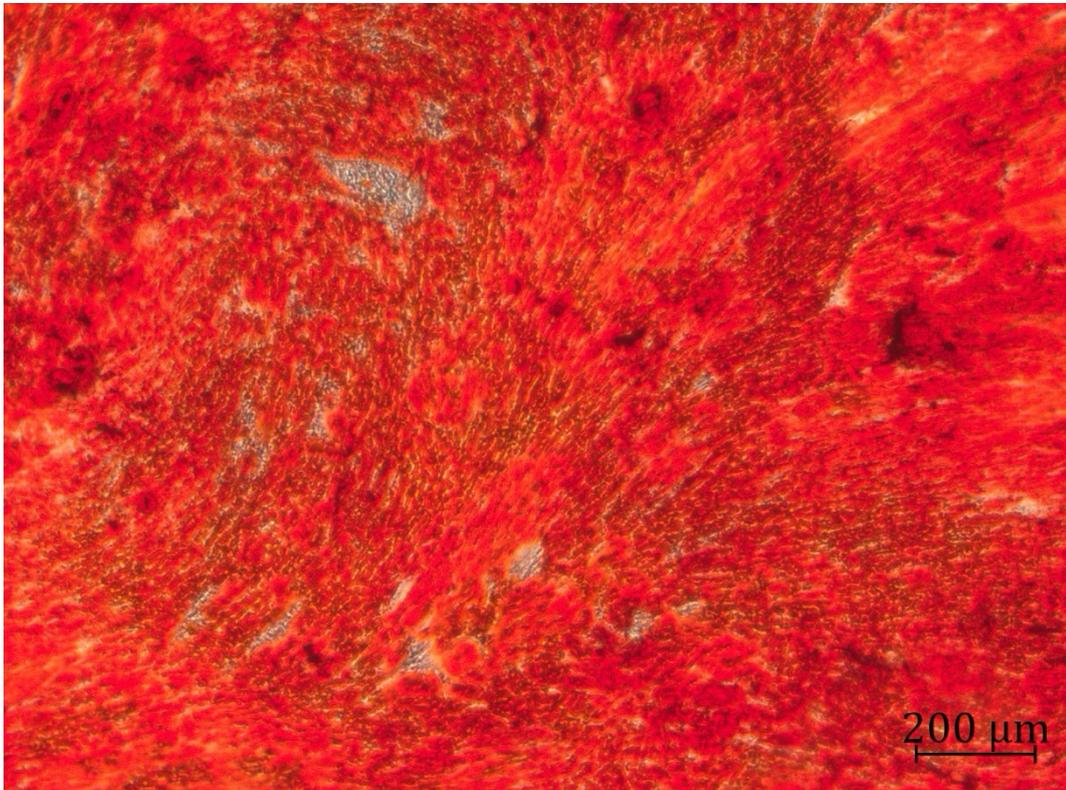


Abb. 9 Alizarin-Rot-Färbung ASC OM + 250 U/ml TNF α , Tag 21, 5-fache Vergrößerung.

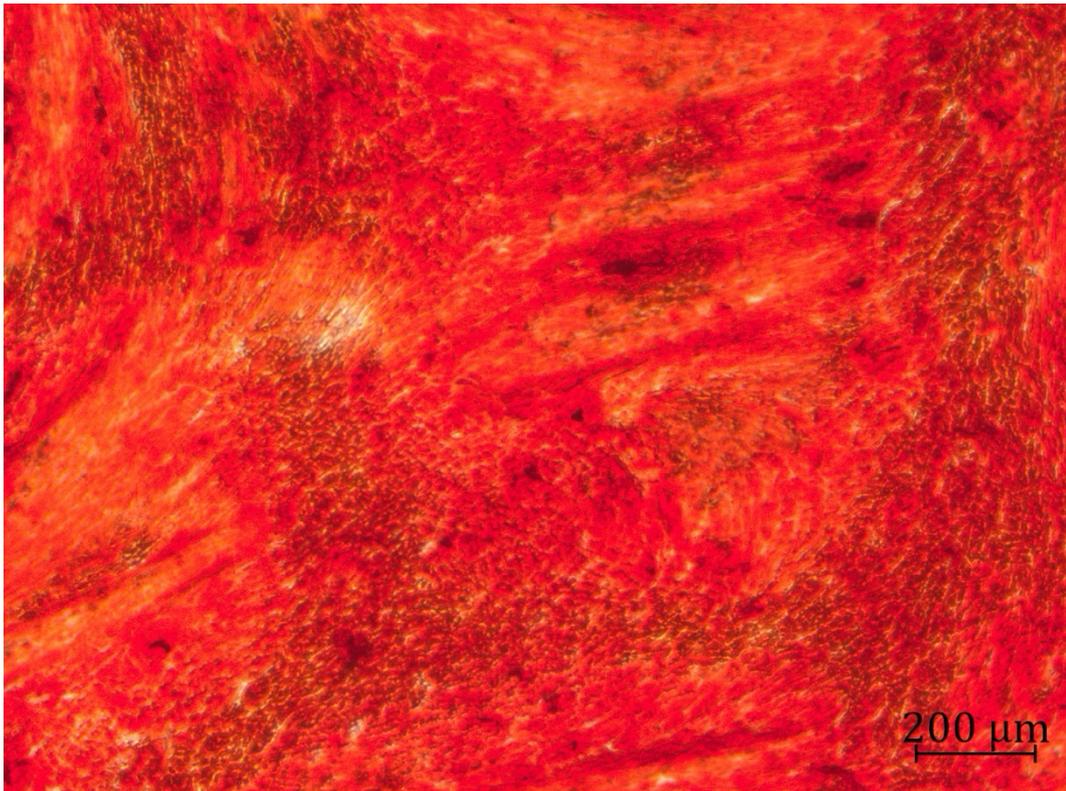


Abb. 10 Alizarin-Rot-Färbung ASC OM + 100 U/ml TNF α , Tag 21, 5-fache Vergrößerung.

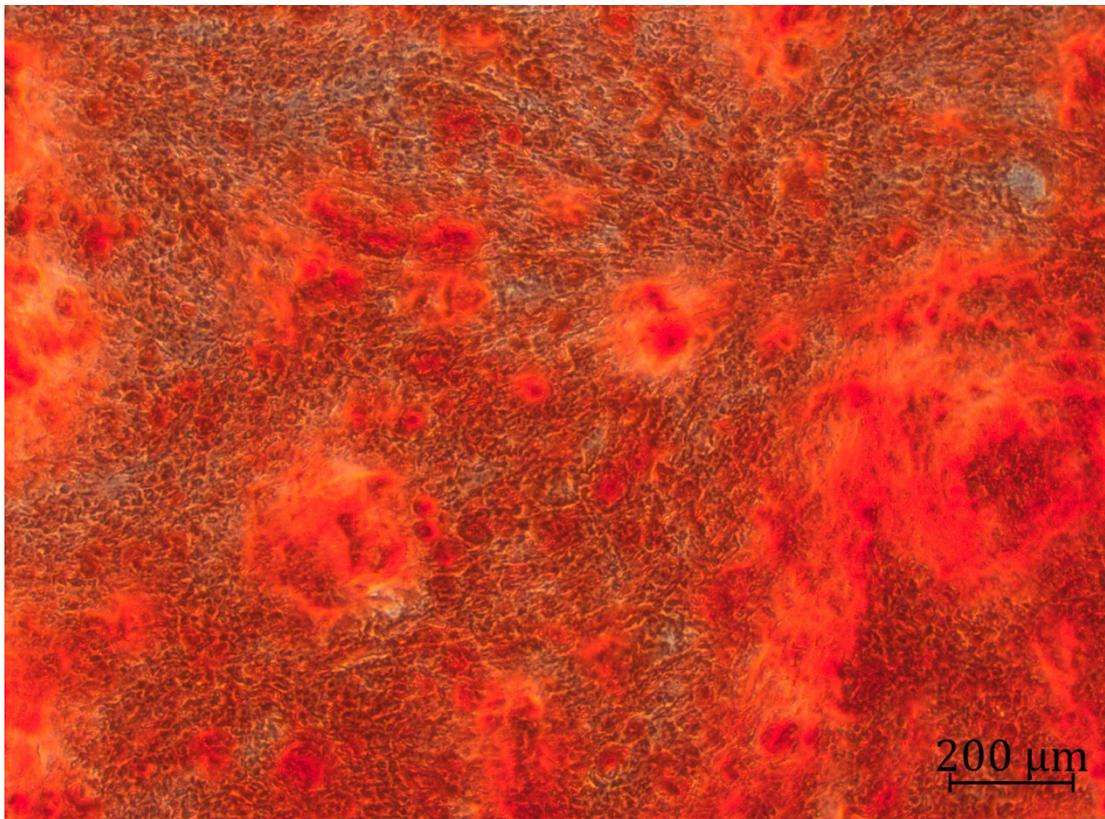


Abb. 11 Alizarin-Rot-Färbung ASC OM + 50 U/ml TNF α , Tag 21, 5-fache Vergrößerung.

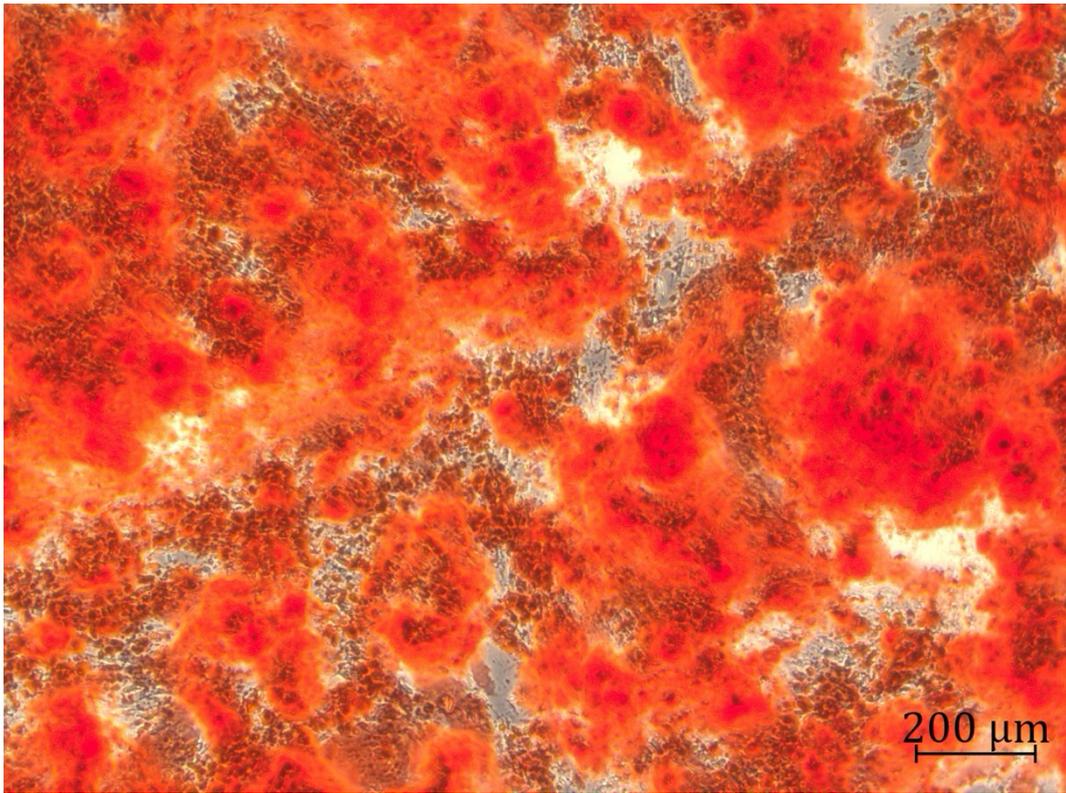


Abb. 12 Alizarin-Rot-Färbung ASC OM + 20 U/ml TNF α , Tag 21, 5-fache Vergrößerung.

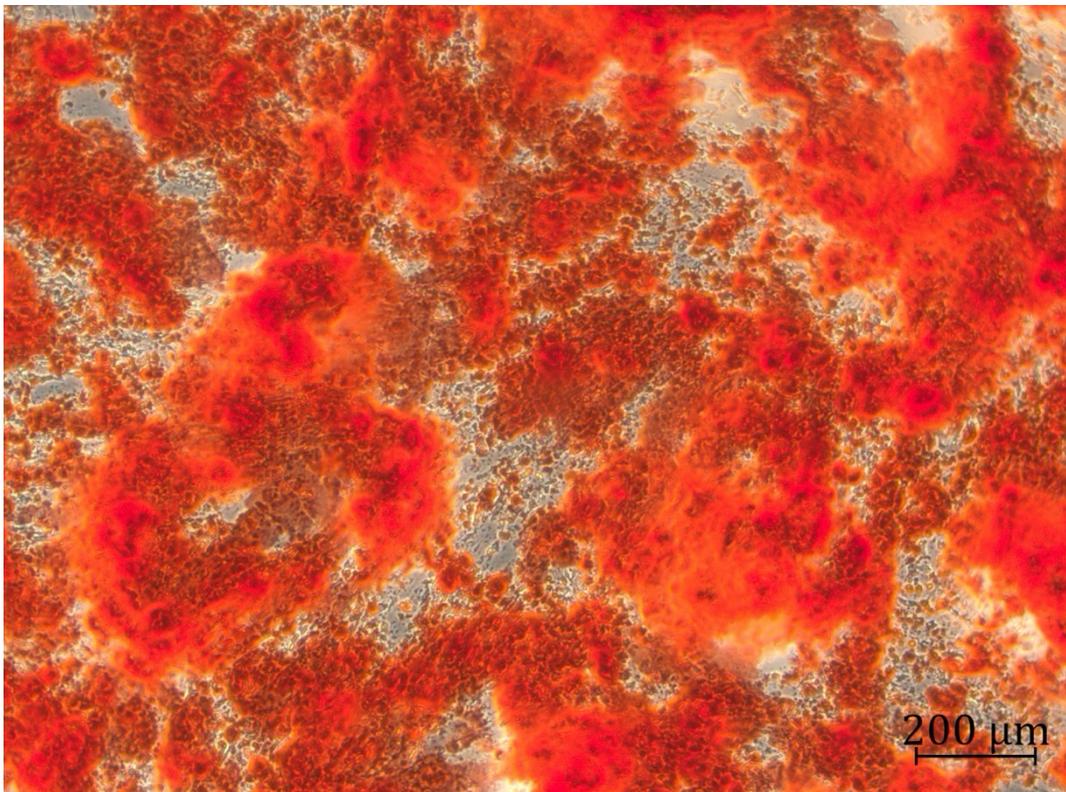


Abb. 13 Alizarin-Rot-Färbung ASC OM + 10 U/ml TNF α , Tag 21, 5-fache Vergrößerung.

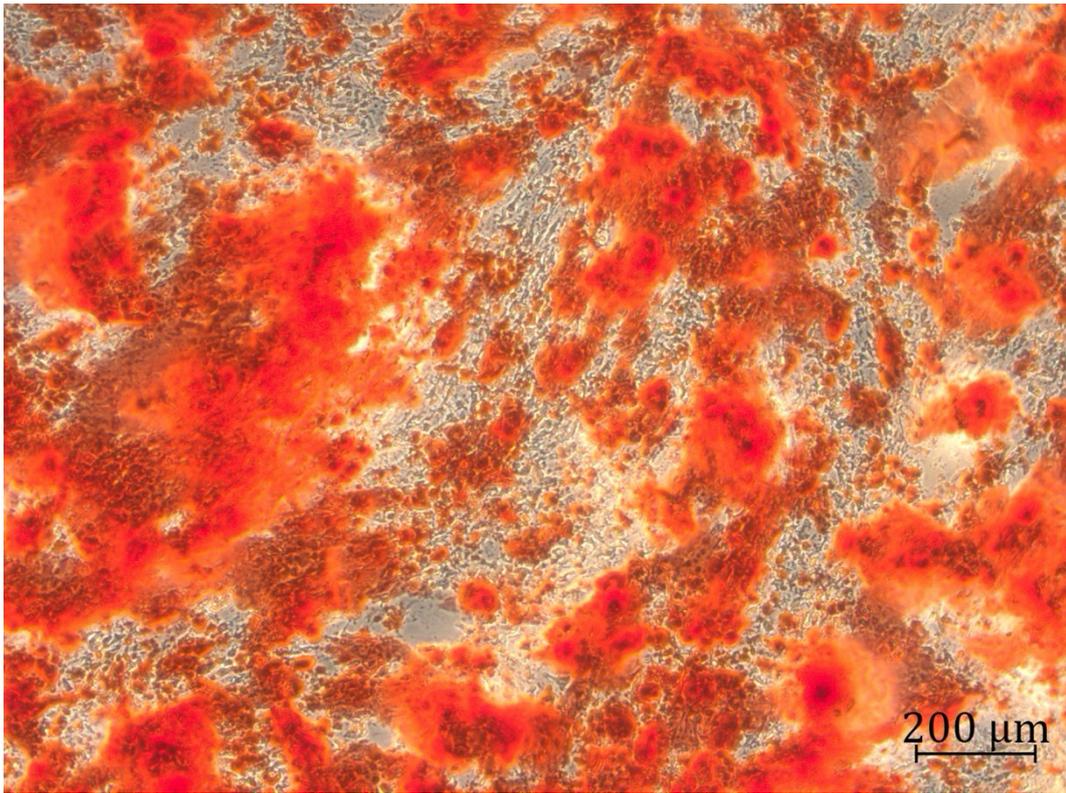


Abb. 14 Alizarin-Rot-Färbung ASC OM + 5 U/ml TNF α , Tag 21, 5-fache Vergrößerung.

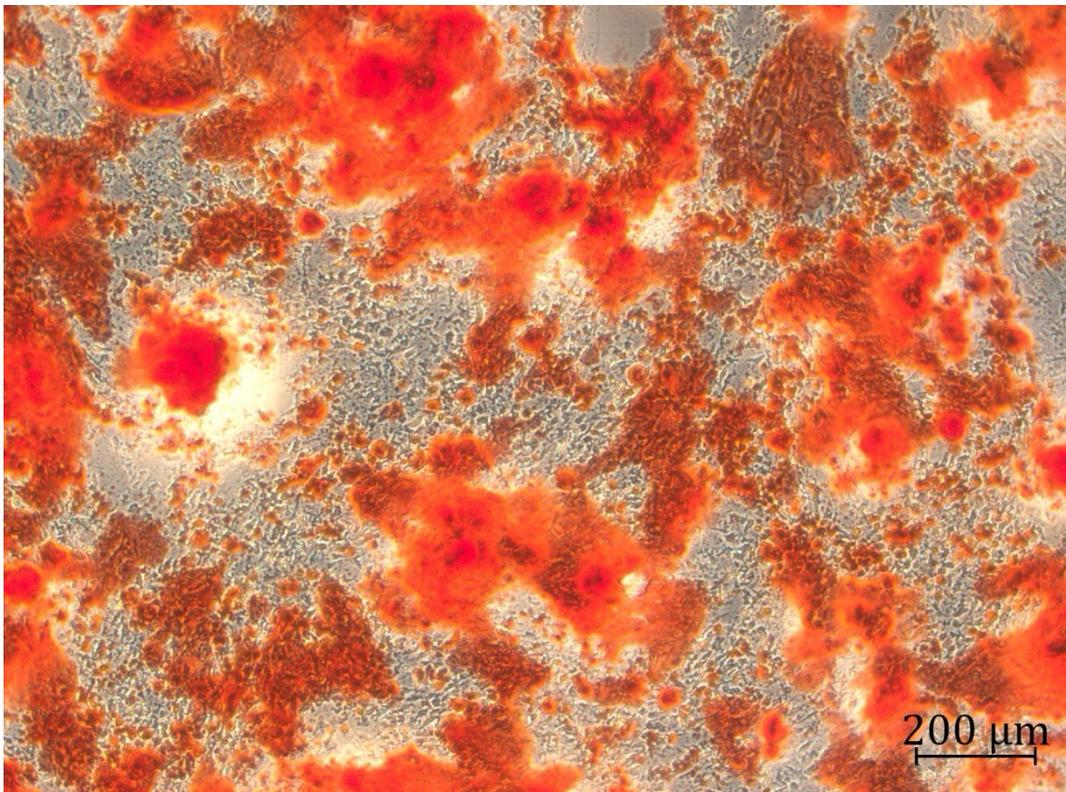


Abb. 15 Alizarin-Rot-Färbung ASC OM + 2,5 U/ml TNF α , Tag 21, 5-fache Vergrößerung.

Abb. 8-15: Dargestellt ist die Alizarin-Rot-Färbung auf mikroskopischer Zellebene an Tag 21 mit Kontrolle ohne Zytokinzusatz, sowie Proben mit Zugabe von $TNF\alpha$ in abnehmender Konzentration. Maßstab der Abbildungen jeweils 200 μm .

Die mikroskopische Analyse der Alizarin-Rot-Färbung zeigte eine deutliche Zunahme der Calciumablagerungen in den Zellen, die mit $TNF\alpha$ behandelt wurden, was die Ergebnisse der quantitativen Analyse unterstützt. Auch in der Kontrollgruppe sind bereits rote Bereiche erkennbar, was darauf hindeutet, dass nach 21 Tagen auch ohne Zytokin eine gewisse Knochenbildung stattgefunden hat.

3.4 Quantifizierung der osteogenen Differenzierung mittels Alizarin-Rot-Färbung und Rücklösung

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, den Einfluss proinflammatorischer Zytokine auf die osteogene Differenzierung von ASCs zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden ASCs aus Pool 1 und Pool 2 (siehe Tabelle 12) für einen Zeitraum von 21 Tagen in osteogenem Differenzierungsmedium mit Zugabe von jeweils einem spezifischen Zytokin kultiviert. Die Zellen in den Versuchsansätzen wurden dabei mit unterschiedlichen Konzentrationen der Zytokine behandelt (siehe Abbildung 4). Die Kontrollgruppe erhielt eine Behandlung mit osteogenem Differenzierungsmedium, jedoch ohne Zugabe von Zytokinen.

Die Abbildungen 16 A-E präsentieren die quantitative Auswertung der osteogenen Differenzierung mittels Photometer. Alle Werte wurden im Verhältnis zur Kontrollgruppe normiert. In diesen Versuchen wurde durch die Zugabe von Zytokinen eine erhöhte osteogene Differenzierung im Vergleich zur Kontrollgruppe dokumentiert. Insbesondere $IL-1\beta$ und $TNF\alpha$ zeigten statistisch signifikante Unterschiede zur Kontrolle.

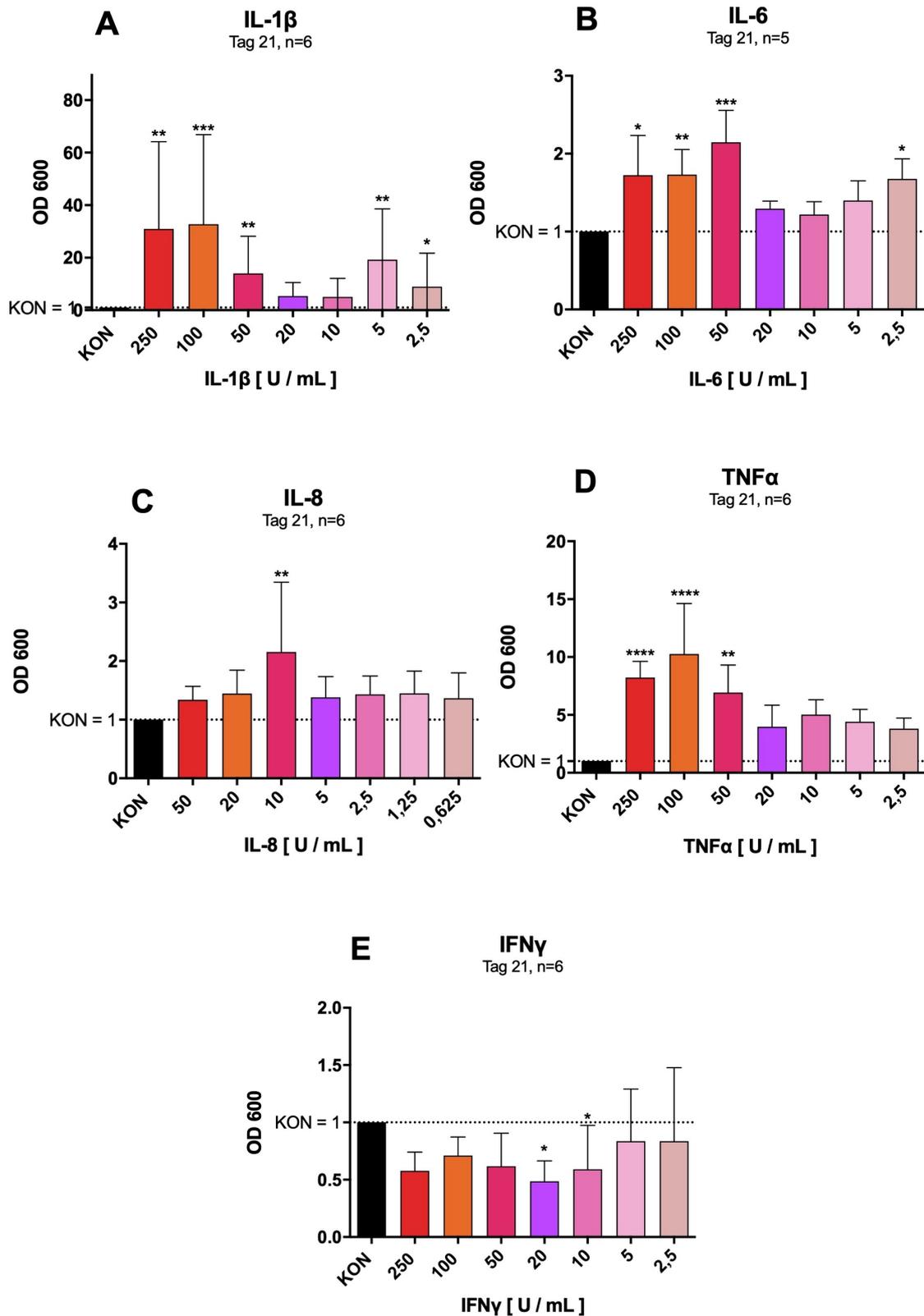


Abb. 16 A-E Einfluss von proinflammatorischen Zytokinen auf die osteogene Differenzierung.

Dargestellt sind die quantitativen Auswertungen der Alizarin-Rot-Färbung nach Kultivierung für 21 Tage in osteogenem Differenzierungsmedium und unterschiedlichen Konzentrationen der

*proinflammatorischen Zytokine in U/ml. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardfehler. KON = Kontrolle mit osteogenem Differenzierungsmedium ohne Zytokin. OD = optische Dichte. Messung der OD bei 600 nm. Die Signifikanzniveaus beziehen sich auf KON. * ($P \leq 0,05$); ** ($P \leq 0,01$); *** ($P \leq 0,001$); **** ($P \leq 0,0001$). $n=6$, bzw. $n=5$ für IL-6.*

In Abbildung 16 A ist unter Behandlung mit IL-1 β eine gesteigerte osteogene Differenzierung im Vergleich zur Kontrolle dargestellt. Bei einer Konzentration von 250 U/ml wurde eine statistisch signifikant erhöhte osteogene Differenzierung mit einer durchschnittlichen OD von 30,92 ($P \leq 0,01$) erreicht. Die Behandlung mit 100 U/ml führte zu einem gesteigerten Wert von durchschnittlich 32,74 ($P \leq 0,001$). Mit abnehmender Konzentration reduzierte sich die Differenzierung, wobei für 50 U/ml immer noch eine durchschnittliche OD von 13,96 ($P \leq 0,01$) erzielt wurde. Bei 20 U/ml und 10 U/ml konnten eine OD von durchschnittlich 5 verzeichnet werden. Anschließend wurde mit weiter abnehmender Zytokinkonzentration eine erneute Zunahme der osteogenen Differenzierung festgestellt. Durch den Zusatz von 5 U/ml IL-1 β konnte eine OD von durchschnittlich 19,21 ($P \leq 0,01$) gemessen werden. Abschließend sank die durchschnittliche OD bei der Behandlung mit 2,5 U/ml auf 8,96 ($P \leq 0,05$). Die Behandlung von ASCs mit IL-1 β führte im Vergleich zu den anderen verwendeten Zytokinen zu einer stärkeren osteogenen Differenzierung. Besonders eine Konzentration von 100 U/ml IL-1 β zeigte eine maximal positive Wirkung auf die osteogene Differenzierung von ASCs.

In Abbildung 16 B ist die osteogene Differenzierung unter der Behandlung mit IL-6 visualisiert. Im Vergleich zum vorherigen Versuch wurden dabei deutlich geringere Werte der OD erzielt. Lediglich die höchsten drei Konzentrationen (250 U/ml, 100 U/ml, 50 U/ml) und die geringste Konzentration (2,5 U/ml) führten im Durchschnitt zu einer Verdopplung der osteogenen Differenzierung im Vergleich zur Kontrolle. Insbesondere bei einer Konzentration von 50 U/ml konnte ein durchschnittlicher Wert der OD von 2,15 ($P \leq 0,001$) verzeichnet werden. Die Behandlung mit 20 U/ml bzw. 10 U/ml führte im Vergleich dazu zu keiner wesentlichen Steigerung der osteogenen Differenzierung (\emptyset OD = 1,29 bzw. \emptyset OD = 1,22). Demzufolge ließ sich feststellen, dass die osteogene Differenzierung durch IL-6 nur in geringem Maße gesteigert werden konnte. Zusammenfassend zeigte die Konzentration von 50 U/ml IL-6 die stärkste Auswirkung auf die osteogene Differenzierung von ASCs.

Die Visualisierung der osteogenen Differenzierung unter Behandlung mit IL-8 ist in Abbildung 16 C zu finden. Eine statistisch signifikante Verdopplung der osteogenen Differenzierung konnte bei der Behandlung mit 10 U/ml erzielt werden ($P \leq 0,01$). Ähnlich wie bei der Behandlung mit IL-6 war die positive Beeinflussung der osteogenen Differenzierung durch IL-8 geringer im Vergleich zu den Behandlungen mit IL-1 β oder auch TNF α . Dennoch bewirkten IL-6 und IL-8 im Vergleich zur Kontrolle eine Zunahme der osteogenen Differenzierung. Zusammenfassend zeigte in Abbildung 16 C die Konzentration von 10 U/ml IL-8 die stärkste Auswirkung auf die osteogene Differenzierung von ASCs.

In Abbildung 16 D wird unter der Behandlung mit TNF α eine gesteigerte osteogene Differenzierung im Vergleich zur Kontrolle dargestellt. Insbesondere bei der Behandlung mit 250 U/ml (\emptyset OD = 8,22) und 100 U/ml (\emptyset OD = 10,25) ($P \leq 0,0001$) wurde eine statistisch signifikante Steigerung der osteogenen Differenzierung festgestellt. Bei Zugabe von 50 U/ml TNF α nahm die osteogene Differenzierung auf nahezu die Hälfte ab, erreicht aber immer noch eine durchschnittliche OD von 6,92 ($P \leq 0,01$). Für die weiter abnehmenden Konzentrationen TNF α wurden ähnliche Werte von durchschnittlich 4,3 erreicht. Zusammenfassend zeigte Abbildung 16 D, dass die Konzentration von 100 U/ml TNF α die stärkste Auswirkung auf die osteogene Differenzierung von ASCs hatte.

Die Behandlung mit IFN γ im Versuch der osteogenen Differenzierung ist in Abbildung 16 E dargestellt. Im Gegensatz zu den vorherigen Ansätzen zeigte sich hierbei eine Reduktion der osteogenen Differenzierung. Bei einer Konzentration von 20 U/ml IFN γ halbierte sich die OD statistisch signifikant auf einen durchschnittlichen Wert von 0,49 ($P \leq 0,05$). Auch unter 10 U/ml IFN γ war ein statistisch signifikanter Unterschied feststellbar, wobei ein durchschnittlicher Wert von 0,59 ($P \leq 0,05$) erreicht wurde. Für die übrigen Konzentrationen wurden nahezu ähnliche Ergebnisse mit einer durchschnittlichen osteogenen Differenzierung von 0,718 erzielt. Zusammenfassend zeigte in Abbildung 16 E die Konzentration von 20 U/ml IFN γ die stärkste Auswirkung auf die osteogene Differenzierung von ASCs.

Anhand der Abbildungen 16 A-E lässt sich ableiten, dass IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF α einen förderlichen Effekt auf die osteogene Differenzierung von ASCs

haben, während $\text{IFN}\gamma$ einen hemmenden Einfluss zeigt. Die Behandlungen mit $\text{IL-1}\beta$ und $\text{TNF}\alpha$ führten zu den signifikantesten Steigerungen der osteogenen Differenzierung. In diesem Versuchsansatz wurden die Konzentrationen jedes Zytokins identifiziert, die die stärkste Auswirkung auf die osteogene Differenzierung hatte. Diese Konzentrationen wurden in den nachfolgenden Experimenten verwendet, um weitere Aspekte zu untersuchen.

3.5 Osteogene Differenzierung: *Non-Responder* vs. *Responder*

Bezüglich der osteogenen Differenzierung können die Zellen in *Respondern* und *Non-Respondern* unterteilt werden. Als *Responder* werden die Zellen bezeichnet, die eine hohe osteogenen Differenzierung aufweisen, während *Non-Responder* wenig bis gar nicht differenzieren. Im Versuch der osteogenen Differenzierung unter Einwirkung von Zytokinen wurden Zellpools verwendet, die beide Arten von Zellen enthalten. Die Zellpools repräsentieren somit eine durchschnittliche Spenderqualität. Um die Vielfalt der Spenderreaktionen der Zellpools aus dem Experiment in Abschnitt 3.4 genauer zu untersuchen, kultivierte man acht unterschiedliche Spender aus unter anderem Pool 1 und 2 mit osteogenem Differenzierungsmedium (OM) für 14 und 21 Tage.

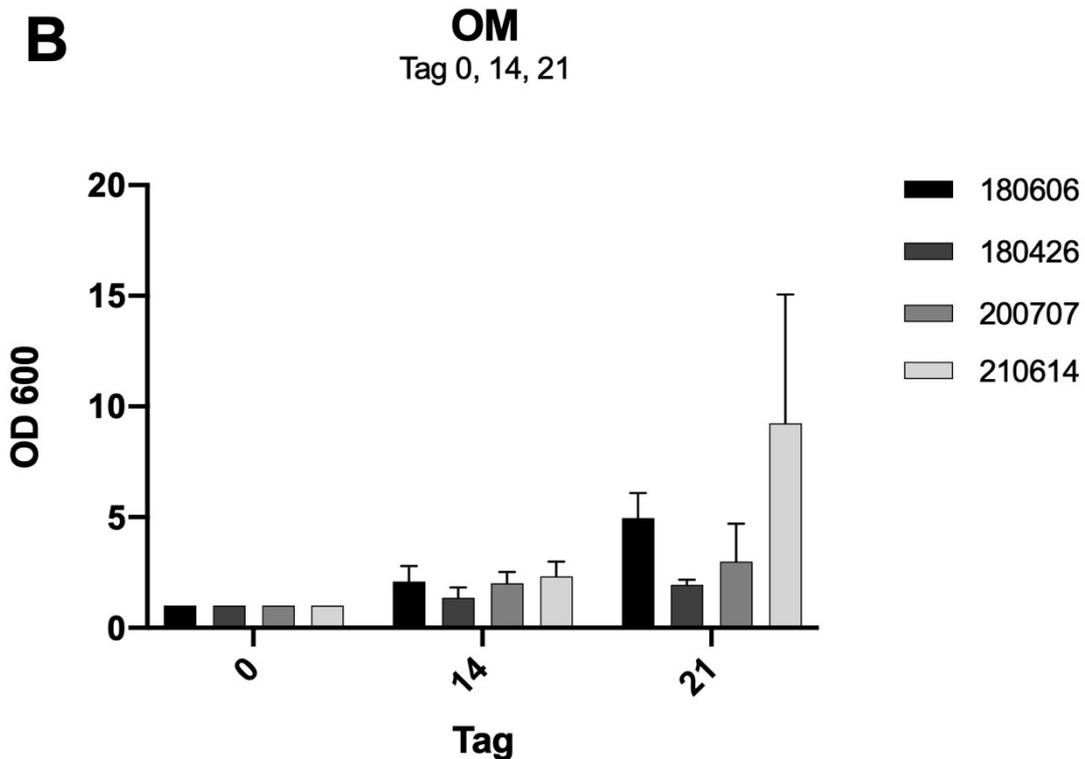
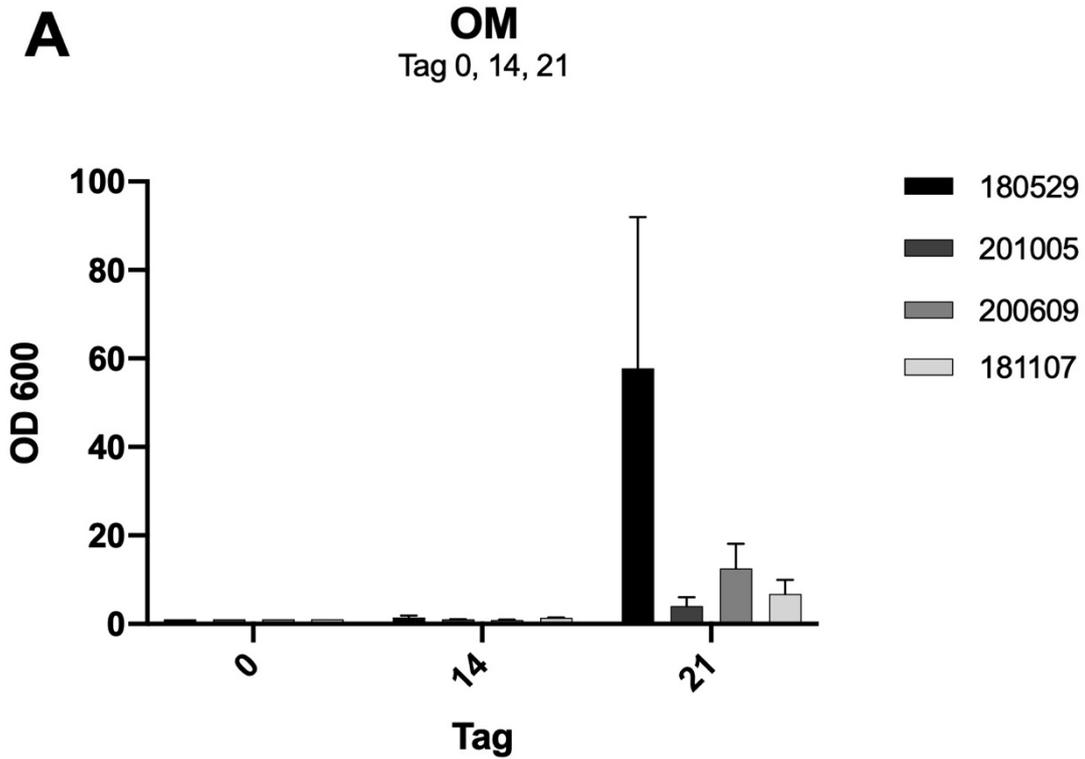


Abb. 17 A & B Osteogene Differenzierung Responder vs. Non-Responder

Dargestellt ist die quantitative Auswertung der Alizarin-Rot-Färbung nach 0, 14 und 21 Tagen Kultivierung von ASCs verschiedener Spender in osteogenem Differenzierungsmedium (OM). Die Spendernummern sind in der Legende aufgeführt. Angegeben sind die Mittelwerte und

Standardfehler normiert auf die Kontrolle an Tag 0. OD = optische Dichte. Messung der OD bei 600 nm. n=6.

In den Abbildungen 17 A und B ist die Alizarin-Rot-Färbung nach 0, 14 und 21 Tagen von vier verschiedenen Spendern dargestellt. Die Werte für Tag 14 und 21 jedes Spenders sind auf den jeweiligen Tag 0 normiert. Die Präsentation der Versuchsergebnisse wurde auf zwei Abbildungen aufgeteilt, um eine bessere Übersicht zu ermöglichen. Beim Betrachten der Abbildungen fällt bereits ein tendenzieller Anstieg der osteogenen Differenzierung bei allen Spendern von Tag 14 auf Tag 21 auf.

In Abbildung 17 A zeigt sich insbesondere bei Spender 180529 eine Steigerung der osteogenen Differenzierung an Tag 21 mit einer durchschnittlichen OD von 57,79. Ebenso stieg die durchschnittliche OD bei Spender 200609 auf 12,53 an.

In Abbildung 17 B erzielte Spender 180606 an Tag 21 Werte von durchschnittlich 4,96. Für Spender 210614 konnte sogar eine Steigerung an Tag 21 auf durchschnittlich 9,24 gemessen werden.

Durch diesen Versuchsansatz konnten die Unterschiede zwischen den Spendern hinsichtlich ihrer Reaktion auf das osteogene Differenzierungsmedium verdeutlicht werden. Die vier näher beschriebenen Spender wurden im weiteren Verlauf für einen Versuchsansatz mit osteogenem Differenzierungsmedium und Zytokin-zusatz verwendet.

3.6 Osteogene Differenzierung: Responder

Nachdem im Experiment aus dem Abschnitt 3.5 festgestellt wurde, dass vier Spender aus Pool 1 und 2 eine deutliche Reaktion auf das osteogene Differenzierungsmedium zeigten, wurde der Versuch der osteogenen Differenzierung unter dem Einfluss von proinflammatorischen Zytokinen gezielt mit diesen *Respondern* wiederholt. In dieser Versuchsreihe wurde spezifisch mit diesen identifizierten Zellen gearbeitet, um ihre Reaktion auf das osteogene Differenzierungsmedium sowie die in Abschnitt 3.4 identifizierten Zytokinkonzentrationen genauer zu untersuchen.

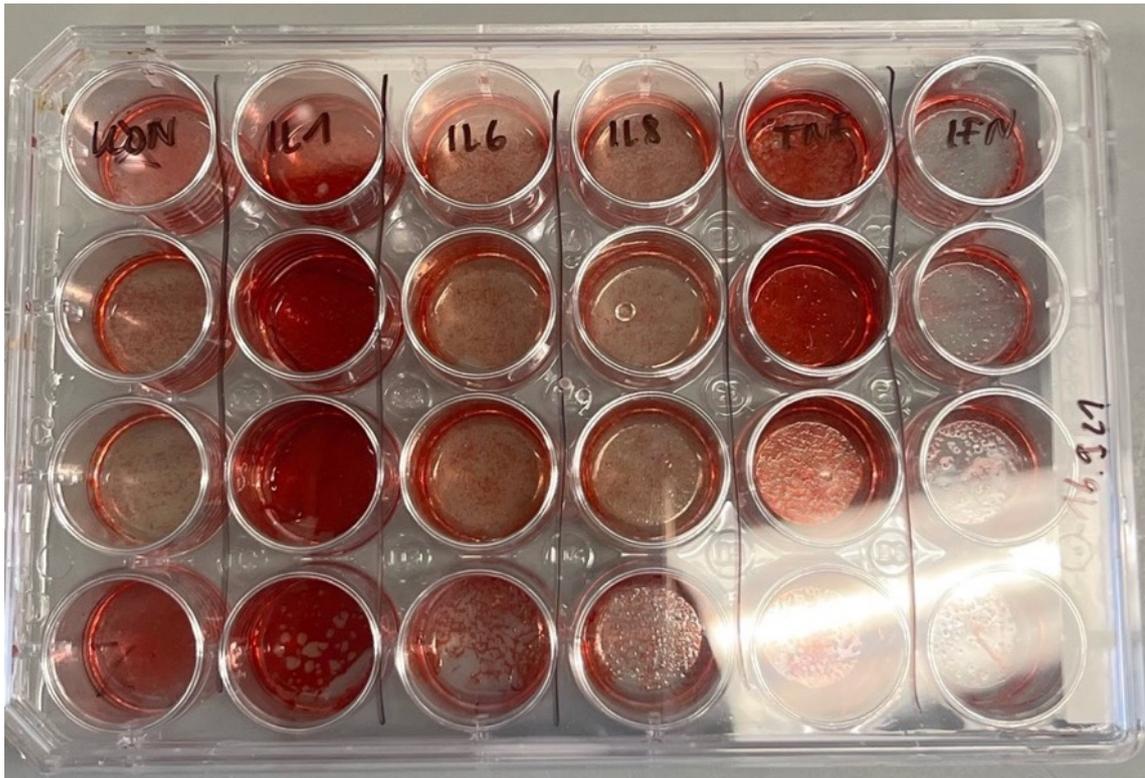


Abb. 18 Alizarin-Rot-Färbung eines Spenders nach 21 Tagen OM + Zytokine.

Dargestellt ist makroskopisch die Alizarin-Rot-Färbung eines Spenders bzw. Responders auf einer 24-Well-Platte. Jede Spalte präsentiert eine unterschiedliche Behandlung. OM = osteogenes Differenzierungsmedium. KON = Kontrolle ohne Zytokin. IL-1 β : 100 U/ml; IL-6: 50 U/ml; IL-8: 10 U/ml; TNF α : 100 U/ml; IFN γ : 20 U/ml.

OM + Zytokin

Tag 21, n=4

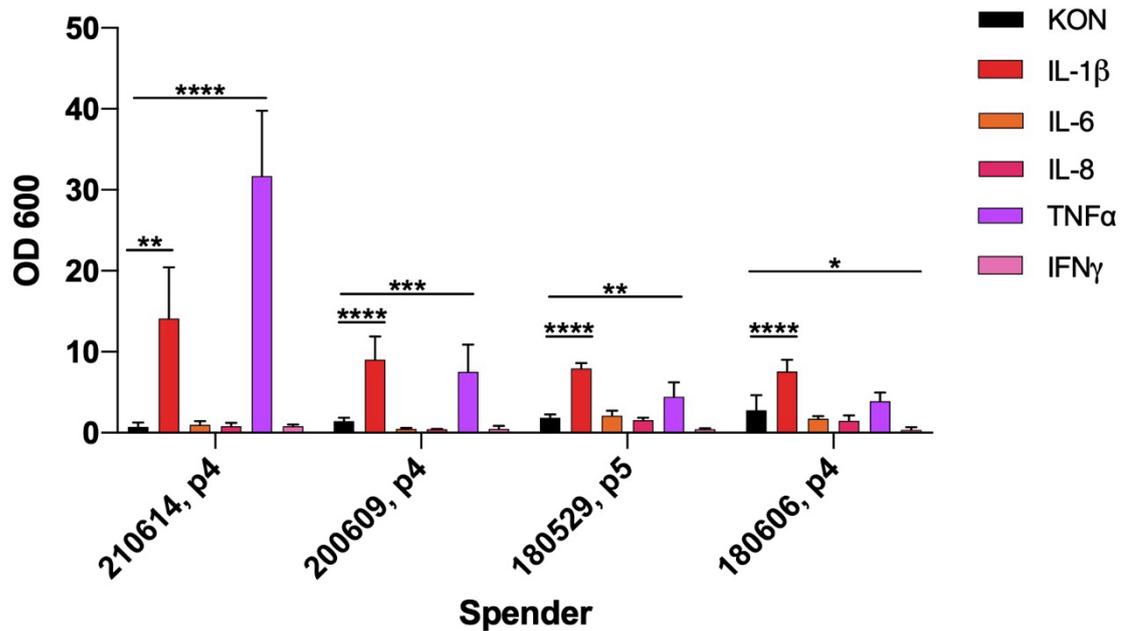


Abb. 19 Einfluss von proinflammatorischen Zytokinen auf die osteogene Differenzierung von Respondern

Dargestellt ist die quantitative Auswertung der Alizarin-Rot-Färbung nach 21 Tagen Kultivierung mit osteogenem Differenzierungsmedium und proinflammatorischen Zytokinen. Angegeben sind die absoluten Mittelwerte und Standardfehler. KON = Kontrolle mit osteogenem Differenzierungsmedium ohne Zytokin. IL-1 β : 100 U/ml; IL-6: 50 U/ml; IL-8: 10 U/ml; TNF α : 100 U/ml; IFN γ : 20 U/ml. OD = optische Dichte. Messung der OD bei 600 nm. p = Passage. Die Signifikanzniveaus beziehen sich auf KON. * ($P \leq 0,05$); ** ($P \leq 0,01$); *** ($P \leq 0,001$); **** ($P \leq 0,0001$). n=4.

In den Abbildungen 18 und 19 wird der Einfluss der in Abschnitt in 3.4 identifizierten Zytokinkonzentrationen auf die osteogene Differenzierung von vier Spendern dargestellt. Die Ergebnisse ähneln denen des Versuchs 3.4. Alle Werte der jeweiligen Spender in Abbildung 19 beziehen sich auf die Kontrolle ohne Zytokine. Insbesondere unter der Behandlung mit IL-1 β und TNF α zeigten sich signifikante Steigerungen der osteogenen Differenzierung. Für Spender 210614 wurden unter IL-1 β und TNF α durchschnittliche Werte der OD von 14,09 ($P \leq 0,01$) bzw. 31,67 ($P \leq 0,0001$) erreicht. Ähnlich dazu präsentierten sich bei Spender 200609 für IL-1 β und TNF α durchschnittliche Werte von 9,04 ($P \leq 0,0001$) bzw. 7,53 ($P \leq 0,001$). Spender 180529 erreichte durchschnittliche Werte von 7,95 ($P \leq 0,0001$) für IL-1 β und 4,42 ($P \leq 0,01$) für TNF α . Bei Spender 180606 zeigt sich, ähnlich wie bei den Vorgängern, eine Steigerung unter IL-1 β und TNF α , wobei nur für IL-1 β eine signifikante Zunahme der osteogenen Differenzierung mit

einem durchschnittlichen Wert von 7,56 ($P \leq 0,0001$) erzielt wurde. Des Weiteren wurde unter der Behandlung mit $\text{IFN}\gamma$ eine signifikante Verminderung der osteogenen Differenzierung im Vergleich zur Kontrolle festgestellt, mit einem durchschnittlichen Wert der OD von 0,36 ($P \leq 0,05$).

Zudem ist zu erkennen, dass im Rahmen dieses Experiments die Kontrolle jedes einzelnen Spenders eine höhere osteogene Entwicklung im Vergleich zu Pool 1 und 2 (vgl. 3.4) aufwies. Für Spender 210614 erreichten die Kontrolle (\emptyset OD = 0,71), IL-6 (\emptyset OD = 0,98), IL-8 (\emptyset OD = 0,81) und $\text{IFN}\gamma$ (\emptyset OD = 0,8) nahezu ähnliche durchschnittliche Werte der OD. Bei Spender 200609 erzielten IL-6 (\emptyset OD = 0,49), IL8 (\emptyset OD = 0,42) und $\text{IFN}\gamma$ (\emptyset OD = 0,48) nahezu ähnliche durchschnittliche Werte der OD. Die Kontrolle präsentierte sich mit einem durchschnittlichen Wert von 1,43 höher als die Behandlung mit Zytokinen. Im Fall von Spender 180529 zeigten sich für die Kontrolle (\emptyset OD = 1,87), IL-6 (\emptyset OD = 2,11) und IL-8 (\emptyset OD = 1,57) nahezu ähnliche Steigerungen der osteogenen Differenzierung. Für die Behandlung mit $\text{IFN}\gamma$ verzeichnete man bei einem durchschnittlichen Wert von 0,45 eine Verminderung. Spender 180606 erzielte einen durchschnittlichen Wert von 2,78 für die Kontrolle. IL-6 (\emptyset OD = 1,74) und IL-8 (\emptyset OD = 1,48) erreichten ähnliche Werte der osteogenen Differenzierung, die jedoch im Vergleich zur Kontrolle moderater ausfielen. Die Behandlung mit $\text{IFN}\gamma$ (\emptyset OD = 0,36) führte zu einer Reduktion der osteogenen Differenzierung.

Zusammenfassend konnte eine Steigerung der osteogenen Differenzierung der Kontrolle bei Spenderzellen im Vergleich zu Zellen aus Pool 1 und 2 beobachtet werden. Dennoch zeigte sich eine ähnliche Reaktion auf proinflammatorische Zytokine in Bezug auf die Differenzierung von Spenderzellen im Vergleich zu den Pools.

3.7 Zunahme der Zellzahl unter dem Einfluss proinflammatorischer Zytokine

Um zu untersuchen, ob die erhöhte osteogene Differenzierung unter dem Einfluss von proinflammatorischen Zytokinen auf eine gesteigerte Zellproliferation zurückzuführen ist, wurde eine Untersuchung mittels BrdU- und CellTiter-Blue-Assay durchgeführt. Hierbei ermittelte man die relative Zellproliferation und die absolute Zellzahl über einen Zeitraum von sieben Tagen.

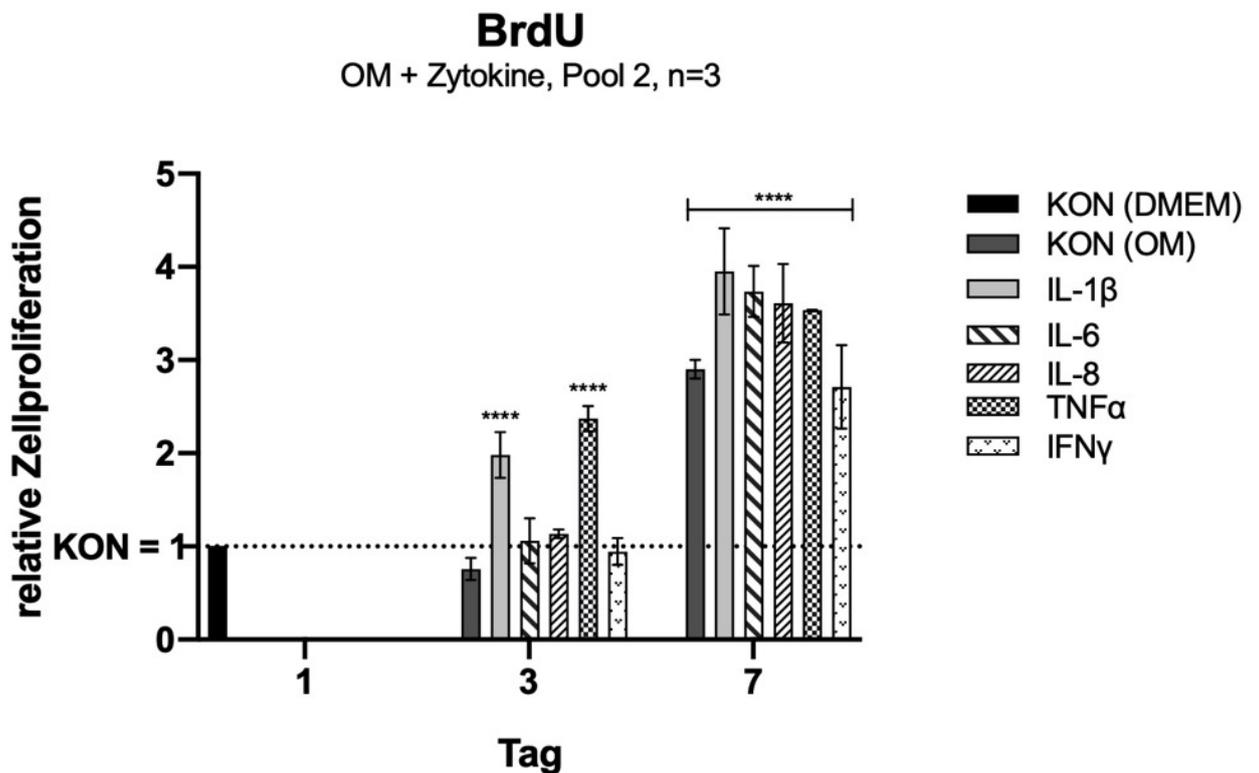


Abb. 20 Relative Zellproliferation unter dem Einfluss von proinflammatorischen Zytokinen

Dargestellt ist die relative Zellproliferation an Tag 1, 3 und 7 nach Kultivierung der ASCs aus Pool 2 mit Proliferationsmedium, osteogenem Differenzierungsmedium und proinflammatorischen Zytokinen. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardfehler. IL-1 β : 100 U/ml; IL-6: 50 U/ml; IL-8: 10 U/ml; TNF α : 100 U/ml; IFN γ : 20 U/ml. BrdU = Bromdesoxyuridin. KON = Kontrolle. DMEM = Proliferationsmedium. OM = osteogenes Differenzierungsmedium. OD = optische Dichte. Messung der OD bei 600 nm. Die Signifikanzniveaus beziehen sich auf KON (DMEM). **** ($P \leq 0,0001$). n=3.

In Abbildung 20 ist die relative Zellproliferation, gemessen mittels BrdU-Assay, am ersten, dritten und siebten Tag dargestellt. Die Kontrolle mit Proliferationsmedium am ersten Tag diente als Vergleich. Den Zellen wurde osteogenes

Differenzierungsmedium sowie proinflammatorische Zytokine mit den zuvor ermittelten Konzentrationen aus Abschnitt 3.4 hinzugefügt.

Bereits am dritten Tag zeigte sich für IL-1 β und TNF α eine statistisch signifikante Verdopplung der Zellzahl ($P \leq 0,0001$) im Vergleich zur Kontrolle am ersten Tag. Bei IL-6, IL-8 und IFN γ ließ sich hingegen entweder kein Anstieg oder ein sehr geringer Anstieg der relativen Zellproliferation verzeichnen. Verglichen mit der Kontrolle am dritten Tag zeigte sich, dass das osteogene Differenzierungsmedium eine Abnahme der Zellzahl bewirkte.

Am siebten Tag wurde für jede Behandlung im Vergleich zur Kontrolle eine statistisch signifikante Steigerung der Zellzahl verzeichnet ($P \leq 0,0001$). Dabei wurde die Zellzahl unter der Behandlung mit osteogenem Differenzierungsmedium und unter der mit IFN γ nahezu verdreifacht. Unter der Behandlung mit IL-1 β , IL-6 und TNF α erreichte man sogar nahezu eine Vervielfachung.

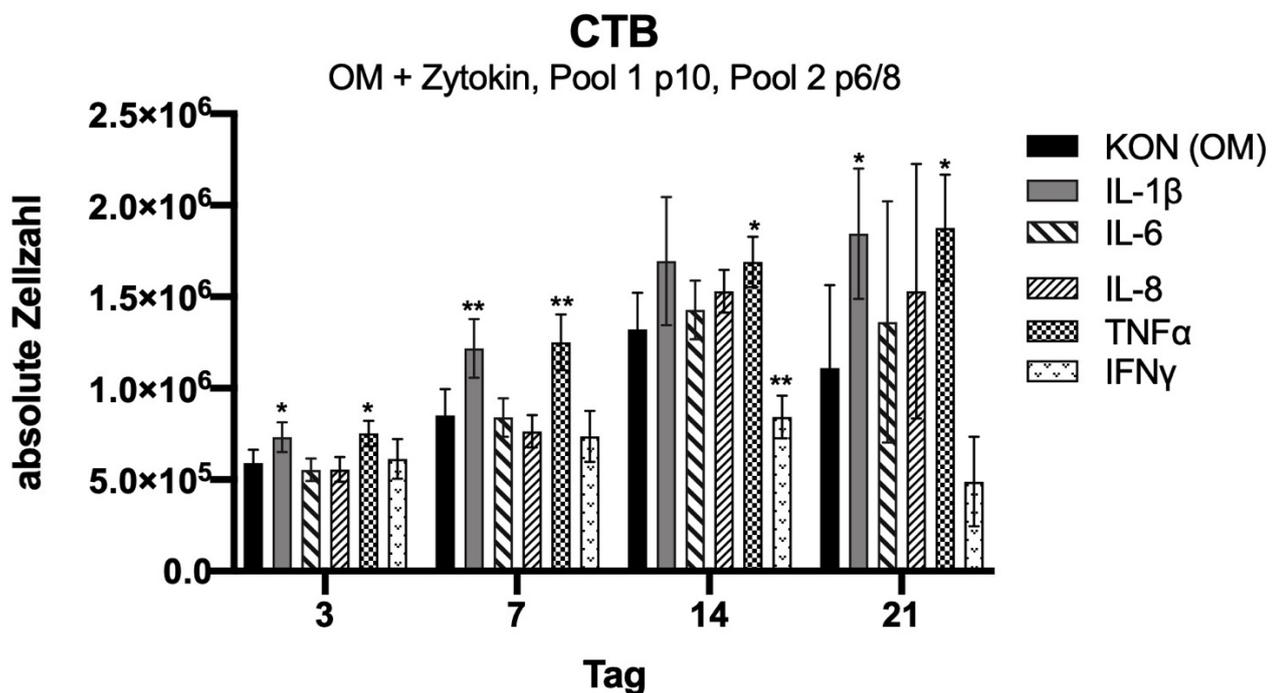


Abb. 21 Absolute Zellzahl der ASCs über 3 Wochen osteogener Differenzierung unter Zytokinen

Dargestellt ist die absolute Zellzahl der ASCs aus Pool 1 und 2 an Tag 3, 7, 14 und 21 nach Kultivierung mit osteogenem Differenzierungsmedium und proinflammatorischen Zytokinen. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardfehler. IL-1 β : 100 U/ml; IL-6: 50 U/ml; IL-8: 10 U/ml;

*TNF α : 100 U/ml; IFN γ : 20 U/ml. CTB = CellTiter-Blue. KON = Kontrolle. OM = osteogenes Differenzierungsmedium. Die Signifikanzniveaus beziehen sich auf die Kontrolle des jeweiligen Tages. * ($P \leq 0,05$); ** ($P \leq 0,01$). n=6.*

In Abbildung 21 ist ein CellTiter-Blue-Assay zur Dokumentation der absoluten Zellzahl über einen Zeitraum von 21 Tagen dargestellt. Unter der Behandlung mit osteogenem Differenzierungsmedium und proinflammatorischen Zytokinen war ein tendenzieller Anstieg der durchschnittlichen Zellzahl im Verlauf der Zeit feststellbar. Davon ausgeschlossen war die Behandlung mit IFN γ , bei der im Durchschnitt, nach einem geringen Anstieg bis Tag 14, an Tag 21 eine Abnahme der absoluten Zellzahl dokumentiert wurde. Auch die Kontrolle, die mit osteogenem Differenzierungsmedium behandelt wurde, sowie die Behandlungen mit IL-6 und IL-8 zeigten durchschnittlich bis zum 14. Tag einen Anstieg und anschließend bis zum 21. Tag einen Abfall der absoluten Zellzahl.

Am dritten Tag führten die Behandlungen mit IL-1 β und TNF α im Vergleich zur Kontrolle zu einer statistisch signifikanten Steigerung der absoluten Zellzahl, wobei der durchschnittliche Anstieg für IL-1 β bei 124 % ($P \leq 0,05$) und für TNF α bei 127 % ($P \leq 0,05$) lag. Diese statistisch signifikante Beobachtung wiederholte sich am siebten Tag, wobei der durchschnittliche Anstieg für IL-1 β auf 143 % ($P \leq 0,01$) und für TNF α auf 147 % ($P \leq 0,01$) gemessen wurde. An Tag 14 wurde für TNF α eine statistisch signifikante Steigerung auf 128% ($P \leq 0,05$) verzeichnet. Gleichzeitig wurde eine statistisch signifikante Abnahme der durchschnittlichen Zellzahl unter der Behandlung mit IFN γ auf 63 % ($P \leq 0,01$) beobachtet. An Tag 21 führten erneut die Behandlungen mit IL-1 β und TNF α zu einer statistisch signifikanten Erhöhung der absoluten Zellzahl, wobei der durchschnittliche Anstieg für IL-1 β bei 166 % ($P \leq 0,05$) und für TNF α bei 169 % ($P \leq 0,05$) lag.

Zusammenfassend lässt sich aus diesen Versuchen ableiten, dass vor allem unter der Einwirkung von IL-1 β und TNF α eine Zunahme der absoluten Zellzahl am 21. Tag festgestellt wurde, während unter IFN γ eine Abnahme beobachtet wurde. Trotz dieser Veränderungen in der Zellzahl konnte die gesteigerte osteogene Differenzierung unter dem Einfluss proinflammatorischer Zytokine nicht eindeutig auf die Zellproliferation zurückgeführt werden. Es fiel auf, dass die Werte der osteogenen Differenzierung insbesondere unter IL-1 β und TNF α deutlich höher

waren im Vergleich zur Proliferation der Zellen. Die genauen Faktoren, die diesen Unterschied und die verstärkte osteogene Differenzierung erklären könnten, sollten in den folgenden Experimenten näher untersucht werden.

3.8 Analyse der Alkalischen Phosphatase als Schlüsselprotein der osteogenen Differenzierung

Im Rahmen des Alkalische Phosphatase-Assays wurde das Hauptaugenmerk darauf gelegt, die Rolle dieses Schlüsselproteins in der osteogenen Differenzierung zu untersuchen. Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase dient als Indikator für die fortgeschrittene Osteogenese von adipogenen Stromazellen, wobei insbesondere der Einfluss proinflammatorischer Zytokine auf diesen Differenzierungsprozess beleuchtet wurde.

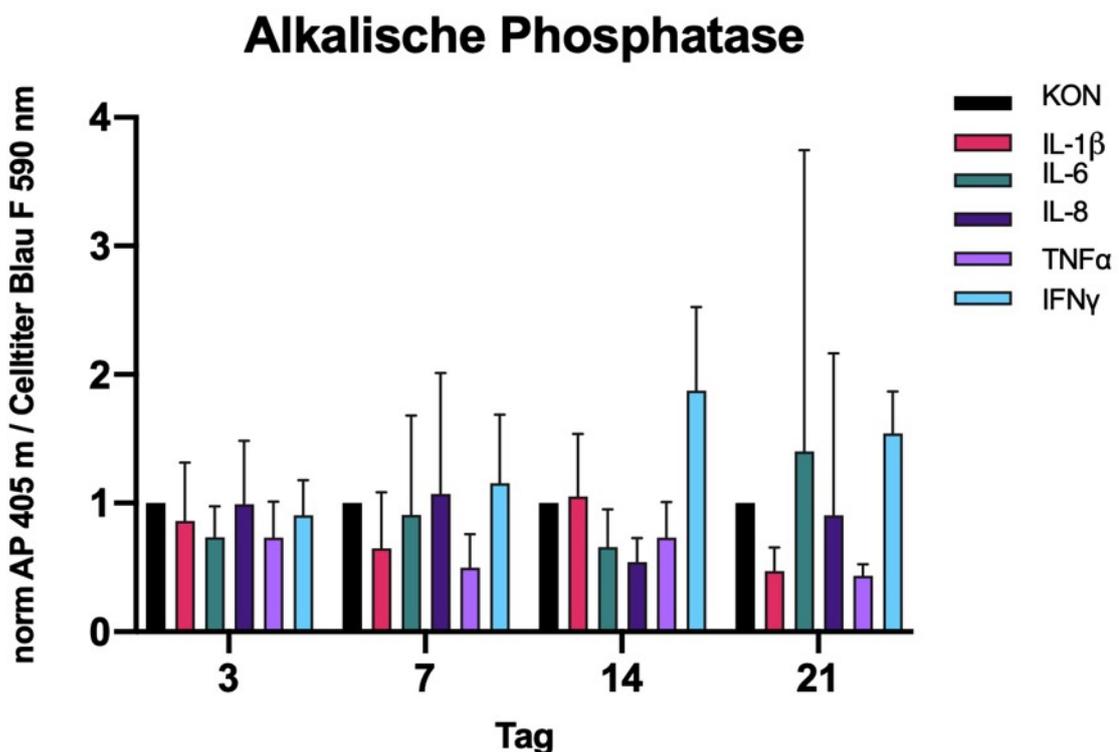


Abb. 22 Expression der Alkalischen Phosphatase

Dargestellt ist die Expression der Alkalischen Phosphatase an Tag 3, 7, 14 und 21 nach Kultivierung der ASCs aus Pool 1 und 2 mit osteogenem Differenzierungsmedium und proinflammatorischen Zytokinen. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardfehler. IL-1 β : 100 U/ml; IL-6: 50

U/ml; IL-8: 10 U/ml; TNF α : 100 U/ml; IFN γ : 20 U/ml. AP = alkalische Phosphatase. KON = Kontrolle mit osteogenem Differenzierungsmedium ohne Zytokin. n=6.

In Abbildung 22 ist die Expression der Alkalischen Phosphatase über einen Zeitraum von 21 Tagen während der osteogenen Differenzierung unter den Einfluss proinflammatorischer Zytokine dargestellt. Alle Messwerte wurden relativ zur Kontrolle des jeweiligen Tages, die keine Zytokinbehandlung erhielt, normiert. Im Vergleich zur Kontrolle zeigte sich in diesem Experiment eine tendenziell niedrigere Alkalische Phosphatase-Aktivität unter der Kombination aus osteogenem Differenzierungsmedium und proinflammatorischen Zytokinen.

Für IL1- β wurde eine anfängliche Erhöhung der alkalischen Phosphatase-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle auf 1,05 an Tag 14 festgestellt, gefolgt von einer Abnahme auf 0,47 an Tag 21. Die Aktivität unter dem Einfluss von IL-6 zeigte einen dynamischen Verlauf, der bis zu einem Anstieg auf 1,4 im Vergleich zur Kontrolle an Tag 21 reichte. In Bezug auf IL-8 wurden an den Tagen 3 und 7 zunächst vergleichbare Werte zur Kontrolle mit 0,99 und 1,07 beobachtet. Danach folgte eine Abnahme auf 0,54 an Tag 14 und ein erneuter Anstieg auf 0,91 an Tag 21. Die Alkalische Phosphatase-Aktivität unter TNF α zeigte eine ausgeprägte zeitliche Schwankung, wobei im Durchschnitt ein Wert von 0,6 im Vergleich zur Kontrolle gemessen wurde. Im Gegensatz zu den anderen Zytokinen demonstrierte die Behandlung mit IFN γ im Durchschnitt eine erhöhte Expression der Alkalischen Phosphatase im Vergleich zur Kontrolle. Insbesondere an Tag 14 wurde nahezu eine Verdopplung des Messwerts auf 1,87 beobachtet.

Von Tag 14 bis Tag 21 wurde bei jeder Behandlung eine Abnahme festgestellt, mit Ausnahme der Behandlung mit IL-6, bei der eine Zunahme von 0,66 auf 1,4 gemessen wurde, sowie der Behandlung mit IL-8, bei der der Wert von 0,54 auf 0,91 stieg.

Insgesamt deuteten die Ergebnisse darauf hin, dass proinflammatorische Zytokine keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität und die Expression der Alkalischen Phosphatase bei der osteogenen Differenzierung adipogener Stromazellen aufweisen. Aufgrund dieser Befunde ließ sich ableiten, dass bei der osteogenen Differenzierung unter dem Einfluss proinflammatorischer Zytokine andere

Schlüsselproteine eine Rolle spielen, was im Anschluss genauer untersucht wurde.

3.9 Quantifizierung der osteogenen Differenzierungsmarker auf Proteinebene

In dieser Experimentreihe wurde die Funktion der Schlüsselproteine Alkalische Phosphatase, BMP-2, Osteocalcin, Osteopontin und RUNX2 in der osteogenen Differenzierung unter dem Einfluss von proinflammatorischen Zytokinen mittels Western Blot untersucht. Das Ziel bestand darin, den zeitlichen Verlauf der Proteinexpression zu visualisieren und dabei den Zeitraum mit den stärksten Auswirkungen auf die proinflammatorischen Zytokine zu identifizieren. Die Zellen wurden in osteogenem Differenzierungsmedium kultiviert und zusätzlich mit 100 U/ml IL-1 β , 100 U/ml TNF α und 20 U/ml IFN γ behandelt. Dabei wurden adipogene Stromazellen aus Pool 1 und Pool 2 über einen Zeitraum von 7, 14 und 21 Tagen behandelt. Die Auswahl dieser spezifischen Zytokine und ihrer Konzentrationen basierte auf vorherige Experimente (siehe Abschnitt 3.4), in denen IL-1 β und TNF α signifikante positive Auswirkungen zeigten, während IFN γ eine negative Auswirkung auf die osteogene Differenzierung im Vergleich zur Kontrolle bewirkte. Alle gemessenen Werte an den entsprechenden Tagen wurden relativ zur Kontrolle normiert.

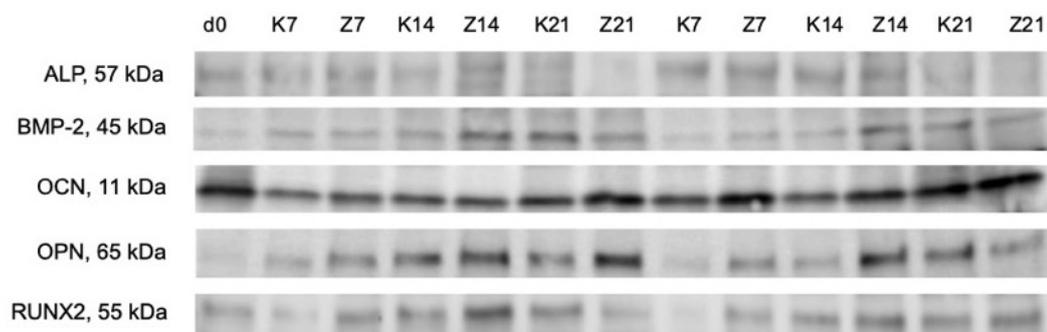


Abb. 23 Western Blot

Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot der untersuchten Schlüsselproteine Alkalische Phosphatase, BMP-2, Osteocalcin, Osteopontin und RUNX2 an Tag 7, 14 und 21 nach

Kultivierung der ASCs aus Pool 1 und 2 mit osteogenem Differenzierungsmedium und IL-1 β (100 U / ml). d0 = Kontrolle ohne Zytokin vor Versuchsstart. K = Kontrolle, Z = mit Zytokin. Hier n = 2.

Abbildung 23 präsentiert einen Western Blot mit der Behandlung mit IL-1 β der Versuche aus diesem Abschnitt. Die Molekulargewichte der Schlüsselproteine basierten auf Literatur und Informationsblätter der Proteine, um diese auf dem Gel sichtbar zu machen. Aufgrund dieser Analyse wurde angenommen, dass die dargestellten Banden zu den untersuchten Proteinen gehören. In der Abbildung folgt nach der Kontrolle jeweils die Behandlung mit dem Zytokin, zuerst am siebten Tag, dann an Tag 14 und schließlich an Tag 21. Da zwei Versuchsdurchläufe in dieser Abbildung dargestellt sind, lässt sich ein ähnliches Muster im Verlauf der Banden erkennen. Besonders bemerkenswert war, dass für RUNX2 an Tag 14 unter Zytokinbehandlung eine sichtbare Bande zu erkennen ist, was sich auch in der gemessenen Proteinexpression widerspiegelt (siehe Abbildung 28).

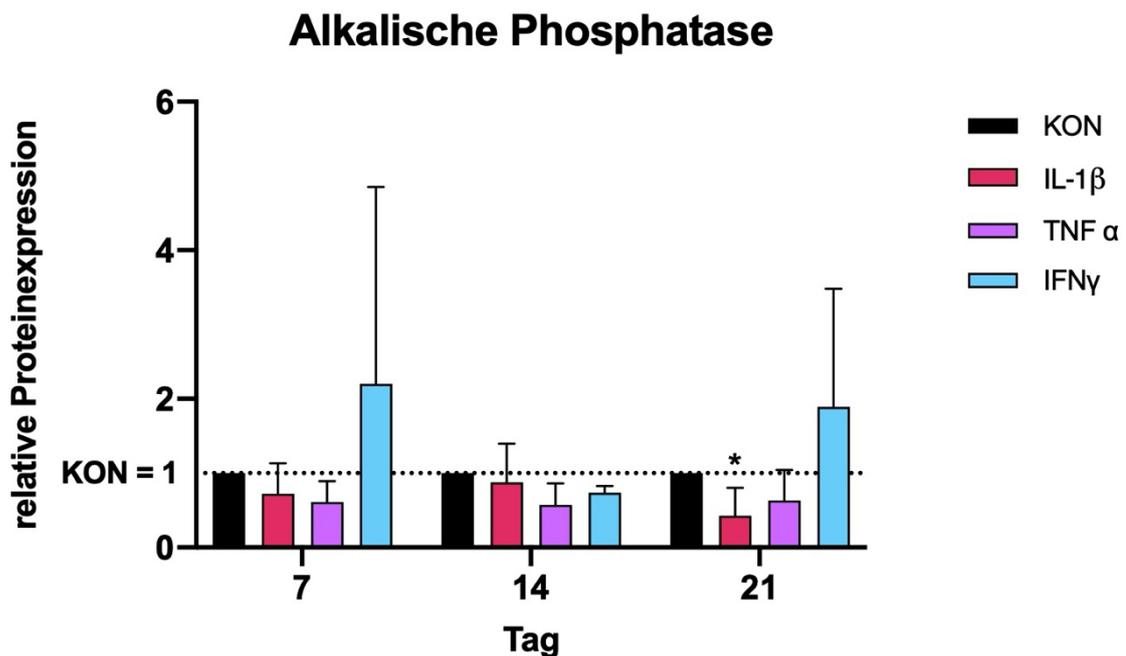


Abb. 24 Western Blot - Alkalische Phosphatase

Dargestellt ist die relative Expression der Alkalischen Phosphatase an Tag 7, 14 und 21 nach Kultivierung der ASCs aus Pool 1 und 2 mit osteogenem Differenzierungsmedium und IL-1 β , TNF α und IFN γ . IL-1 β : 100 U/ml; TNF α : 100 U/ml; IFN γ : 20 U/ml. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardfehler. KON = Kontrolle mit osteogenem Differenzierungsmedium ohne Zytokin. Die Signifikanzniveaus beziehen sich auf KON. * ($P \leq 0,05$). n=6.

In Abbildung 24 ist die relative Proteinexpression der alkalischen Phosphatase präsentiert. Die Behandlung mit IL-1 β ergab ein ähnliches Ergebnis, wie im alkalische Phosphatase Assay (siehe Abbildung 22). Allerdings zeigte sich am 21. Tag eine statistisch signifikante Abnahme der Expression der Alkalischen Phosphatase auf weniger als die Hälfte der Kontrolle, mit einem durchschnittlichen Wert von 0,43 ($P \leq 0,05$). Für TNF α waren zu allen Messzeitpunkten ähnliche Werte feststellbar. Der Mittelwert lag bei 0,6. Hingegen führte die Behandlung mit IFN γ zu einer Verdopplung im Vergleich zu Kontrolle, dokumentiert durch einen durchschnittlichen Wert von 2,2 an Tag 7. Im Alkalische Phosphatase Assay (siehe Abbildung 22) zeigte die Behandlung mit IFN γ stets eine positive Auswirkung. Hier fiel der Wert am 14. Tag jedoch auf durchschnittlich 0,74. Danach erzielte die Behandlung an Tag 21 wieder einen fast doppelt so hohen Wert als die Kontrolle mit im Durchschnitt 1,89.

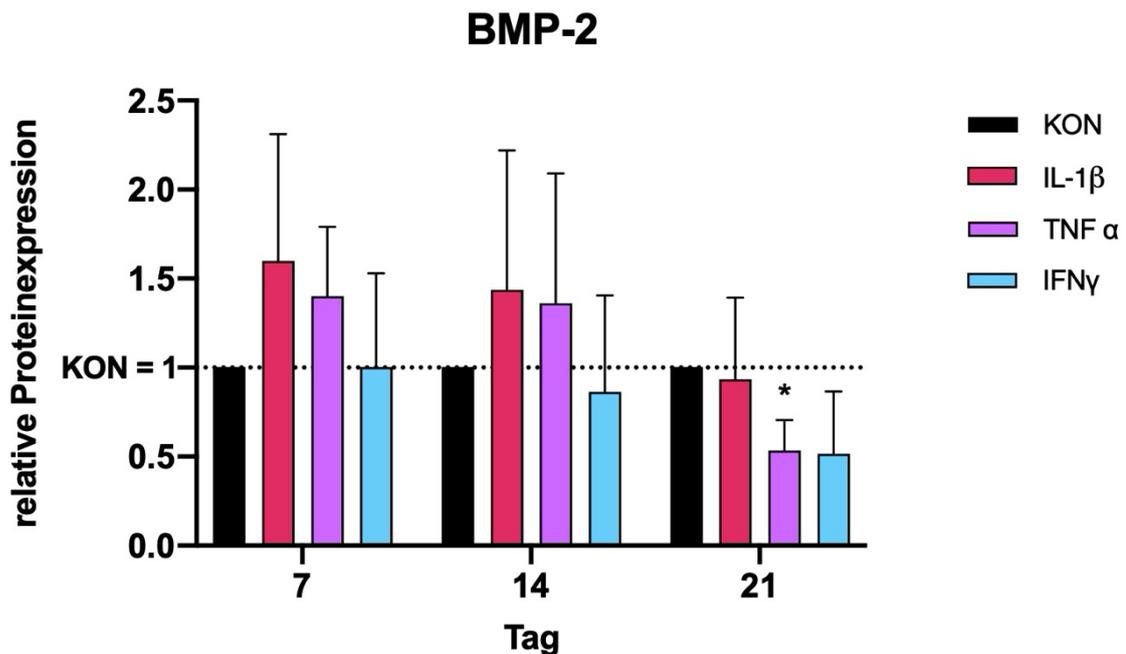


Abb. 25 Western Blot - BMP-2

Dargestellt ist die relative Expression von BMP-2 an Tag 7, 14 und 21 nach Kultivierung der ASCs aus Pool 1 und 2 mit osteogenem Differenzierungsmedium und IL-1 β , TNF α und IFN γ . IL-1 β : 100 U/ml; TNF α : 100 U/ml; IFN γ : 20 U/ml. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardfehler. KON = Kontrolle mit osteogenem Differenzierungsmedium ohne Zytokin. Die Signifikanzniveaus beziehen sich auf KON. * ($P \leq 0,05$). $n=6$.

Die relative Proteinexpression von BMP-2 ist in Abbildung 25 visualisiert. Im Verlauf jeder Behandlung wurde eine kontinuierliche Abnahme auf nahezu die Hälfte ihres anfänglichen Werts beobachtet. Die höchste Proteinexpression wurde bei der Behandlung mit IL-1 β an Tag 7 mit einem durchschnittlichen Wert von 1,6 erreicht, während für TNF α an Tag 7 ein durchschnittlicher Wert von 1,4 festzustellen war. An Tag 21 zeigte sich eine Abnahme der Proteinexpression unter IL-1 β auf durchschnittlich 0,93. Die Proteinexpression unter TNF α halbierte sich statistisch signifikant am 21. Tag auf durchschnittlich 0,53 ($P \leq 0,05$). Ebenso wurde für IFN γ eine Halbierung auf durchschnittlich 0,52 des anfänglichen Werts von im Mittel 1 verzeichnet.

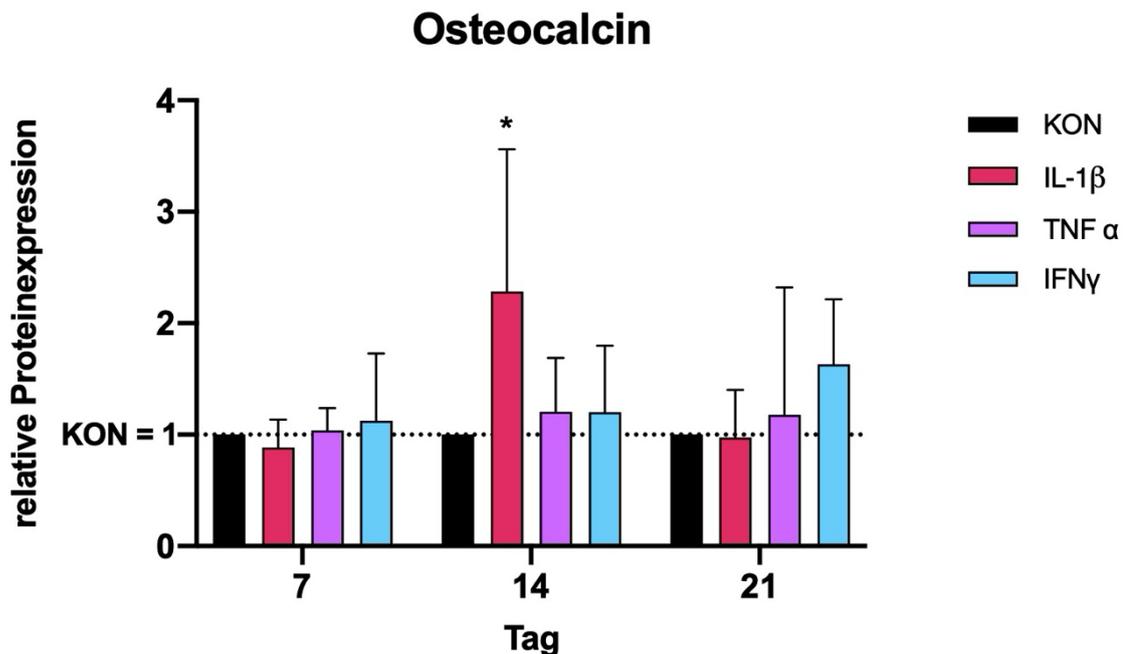


Abb. 26 Western Blot - Osteocalcin

Dargestellt ist die relative Expression von Osteocalcin an Tag 7, 14 und 21 nach Kultivierung der ASCs aus Pool 1 und 2 mit osteogenem Differenzierungsmedium und IL-1 β , TNF α und IFN γ . IL-1 β : 100 U/ml; TNF α : 100 U/ml; IFN γ : 20 U/ml. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardfehler. KON = Kontrolle mit osteogenem Differenzierungsmedium ohne Zytokin. Die Signifikanzniveaus beziehen sich auf KON. * ($P \leq 0,05$). $n=6$.

Abbildung 26 stellt die relative Proteinexpression von Osteocalcin dar. An dieser Stelle fiel besonders die Erhöhung der Proteinexpression im Vergleich zur Kontrolle unter dem Einfluss von IL-1 β am 14. Tag auf, wobei der durchschnittliche Wert mehr als das Doppelte erreichte mit 2,29 ($P \leq 0,05$). Die Behandlung mit

TNF α ähnelte im Verlauf der Kontrolle mit einem Mittelwert von 1,14. Die Untersuchung der Behandlung mit IFN γ zeigte einen kontinuierlichen Anstieg mit bis zu einem durchschnittlichen Wert von 1,63 an Tag 21.

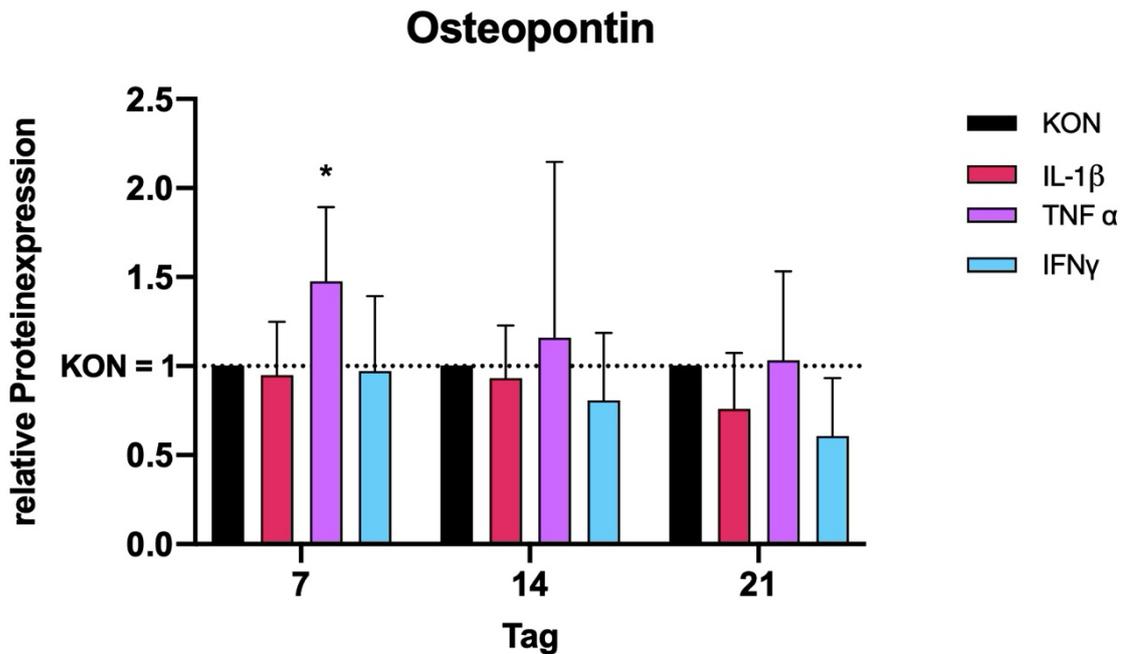


Abb. 27 Western Blot - Osteopontin

Dargestellt ist die relative Expression von Osteopontin an Tag 7, 14 und 21 nach Kultivierung der ASCs aus Pool 1 und 2 mit osteogenem Differenzierungsmedium und IL-1 β , TNF α und IFN γ . IL-1 β : 100 U/ml; TNF α : 100 U/ml; IFN γ : 20 U/ml. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardfehler. KON = Kontrolle mit osteogenem Differenzierungsmedium ohne Zytokin. Die Signifikanzniveaus beziehen sich auf KON. * ($P \leq 0,05$). $n=6$.

Die relative Expression von Osteopontin ist in Abbildung 27 präsentiert. Es ließ sich eine Abnahme im Verlauf für jede Behandlung im Vergleich zur Kontrolle erkennen. Die Behandlung mit TNF α wies kontinuierlich höhere Werte als die Kontrolle auf, wobei am siebten Tag ein durchschnittlicher Wert von 1,48 ($P \leq 0,05$) einen statistisch signifikanten positiven Einfluss auf die Proteinexpression zeigte. Im Gegensatz dazu wiesen die Werte für die Behandlung mit IFN γ den geringsten Einfluss auf und lagen unter denen der Kontrolle. An Tag 21 wurde ein durchschnittlicher Wert von 0,61 erreicht. Ein ähnliches Verhalten wurde bei der Behandlung mit IL-1 β beobachtet, bei der am 21. Tag ein durchschnittlicher Wert von 0,76 verzeichnet wurde.

RUNX2

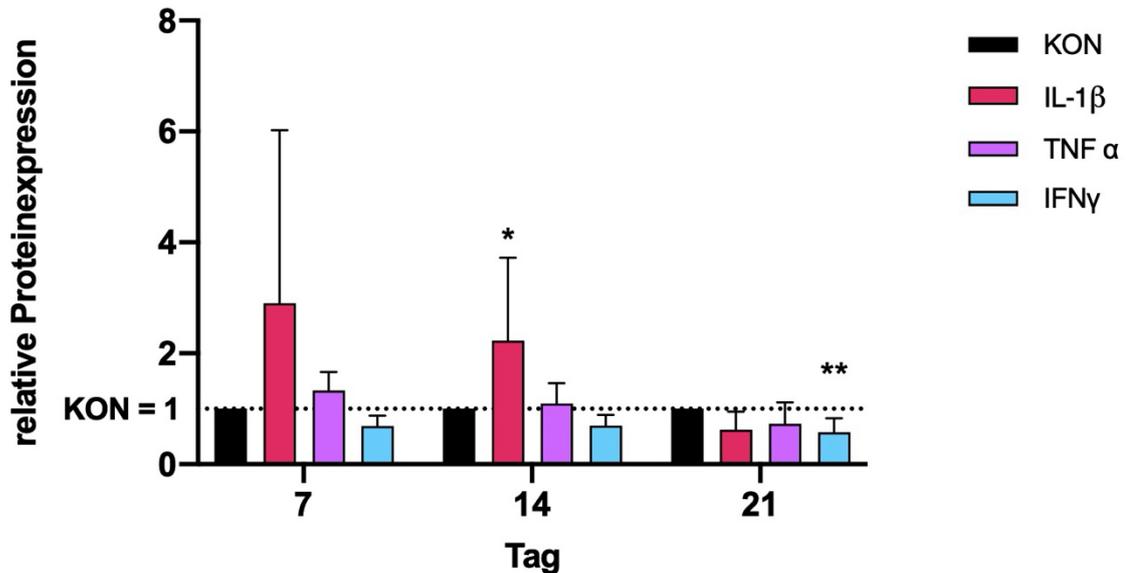


Abb. 28 Western Blot - RUNX2

Dargestellt ist die relative Expression von RUNX2 an Tag 7, 14 und 21 nach Kultivierung der ASCs aus Pool 1 und 2 mit osteogenem Differenzierungsmedium und IL-1 β , TNF α und IFN γ . IL-1 β : 100 U/ml; TNF α : 100 U/ml; IFN γ : 20 U/ml. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardfehler. KON = Kontrolle mit osteogenem Differenzierungsmedium ohne Zytokin. Die Signifikanzniveaus beziehen sich auf KON. * ($P \leq 0,05$); ** ($P \leq 0,01$). $n=6$.

In Abbildung 28 ist die Proteinexpression von RUNX2 unter dem Einfluss von proinflammatorischen Zytokinen dargestellt. Es ließ sich eine Abnahme im Verlauf jeder Behandlung im Vergleich zur Kontrolle feststellen. Die stärkste Beeinflussung der Proteinexpression wurde durch die Behandlung mit IL-1 β erreicht. Am siebten Tag wurde nahezu eine Verdreifachung im Vergleich zur Kontrolle mit einem durchschnittlichen Wert von 2,91 erzielt. Ein statistisch signifikanter Unterschied der Behandlung mit IL-1 β wurde am 14. Tag mit einem durchschnittlichen Wert von 2,23 ($P \leq 0,05$) dokumentiert. Der Einfluss von TNF α auf die Proteinexpression lag am siebten Tag noch bei etwa 1,33 und fiel anschließend kontinuierlich ab, bis er am 21. Tag durchschnittlich 0,74 erreichte. Im Vergleich zur Kontrolle zeigte die Behandlung mit IFN γ keinen wesentlichen Einfluss, da die Werte weder über die der Kontrolle hinausgingen noch eine Tendenz zum Anstieg oder Abfall aufwiesen. Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde jedoch am 21. Tag mit einem durchschnittlichen Wert von 0,58 ($P \leq 0,01$) erreicht.

In den Abbildungen 24-28 wurden mittels Western Blot wichtige Schlüsselproteine in der osteogenen Differenzierung von ASCs unter dem Einfluss der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , TNF α , und IFN γ näher beleuchtet. Hierbei konnte keine wesentliche Beeinflussung der Proteinexpression durch die Zytokine festgestellt werden. Dies deutete darauf hin, dass andere Faktoren in der osteogenen Differenzierung durch proinflammatorische Zytokine beeinflusst werden, was in einer vermehrten Knochenbildung resultierte.

4. Diskussion

Das Ziel dieser Dissertation war es, den Einfluss proinflammatorischer Zytokine auf das osteogene Differenzierungspotenzial von Stromazellen aus dem Fettgewebe zu untersuchen. Um dies zu ermöglichen, wurde ein *in vitro* Modell entwickelt, welches den entzündlichen Zustand im Körper älterer Menschen simuliert. Diese Herangehensweise basiert auf dem Konzept des „*Inflamm-Aging*“, welches die zunehmende systemische Entzündung im Alter als wichtigen Faktor für die Alterung und die damit verbundenen Krankheiten, einschließlich Osteoporose, beschreibt [63]. Die Untersuchung des Einflusses von proinflammatorischen Zytokinen auf die Differenzierung von Stromazellen aus Fettgewebe ist besonders relevant, da diese Zytokine sowohl hemmende als auch fördernde Effekte auf die Knochenbildung haben können.

In dieser Arbeit wurde daher das osteogene Differenzierungspotenzial von adipogenen Stromazellen gezielt unter dem Einfluss ausgewählter proinflammatorischer Zytokine untersucht, die eine zentrale Rolle bei der Entstehung von Osteoporose im Alter spielen. Die vorliegenden Ergebnisse dieser Forschungsarbeit weisen auf unerwartete Mechanismen hin, die bei der Interaktion zwischen proinflammatorischen Zytokinen und adipogenen Stromazellen eine Rolle spielen. Einige der beobachteten Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den bisherigen Annahmen: Das osteogene Differenzierungspotenzial der adipogenen Stromazellen wurde durch IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF α positiv beeinflusst. Besonders hervorzuheben ist, dass TNF α und IL-1 β in den getesteten Konzentrationen eine signifikante Steigerung der osteogenen Differenzierung der ASCs bewirkten. Im Gegensatz dazu zeigte IFN γ eine signifikante Hemmung der osteogenen Differenzierung.

4.1 Validierung des osteogenen Differenzierungspotenzials adipogener Stromazellen

Es ist gut dokumentiert, dass adipogene Stromazellen (ASCs) als multipotente Stammzellen das Potenzial besitzen, in Richtung Osteogenese zu differenzieren. Zuk et al. beschrieben dies erstmals im Jahr 2001 und zeigten, dass ASCs in der Lage sind, sich in verschiedene Zelltypen, einschließlich Osteoblasten zu entwickeln [64]. In Bezug auf ihre osteogenen Fähigkeiten wurde in Studien gezeigt, dass ASCs ähnliche Eigenschaften wie mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark (*Bone marrow-derived stromal cells*, BMSCs) aufweisen. So berichteten De Ugarte et al., dass ASCs unter geeigneten Bedingungen eine vergleichbare Kapazität zur osteogenen Differenzierung aufweisen wie BMSCs [65]. Dabei waren sowohl die Aktivität der Alkalischen Phosphatase (ALP), einem Schlüsselmarker für die frühe Osteogenese, als auch die Kalziumablagerungen in der extrazellulären Matrix ähnlich stark ausgeprägt. Ein wesentlicher Vorteil der ASCs gegenüber BMSCs besteht darin, dass sie durch weniger invasive Verfahren gewonnen werden können, was das Risiko für postoperative Schmerzen und Komplikationen deutlich verringert. Dies macht sie zu einer äußerst attraktiven Zellquelle für die regenerative Medizin. Darüber hinaus zeichnen sich ASCs durch eine hohe Proliferationsrate und ein ausgeprägtes Differenzierungspotenzial aus, was sie für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze, insbesondere im Bereich der Knochenregeneration, sehr wertvoll macht [66].

Zusammenfassend macht die vergleichbare Leistung von ASCs und BMSCs bei der Osteogenese ASCs zu einer vielversprechenden Alternative für die regenerative Medizin, insbesondere im Hinblick auf die Knochenbildung und den Ersatz von Knochengewebe [67]. Somit bildete dies die Grundlage für die nachfolgenden Experimente dieser Arbeit.

In der vorliegenden Forschungsarbeit wurde das Potenzial der ASCs zur Osteogenese umfassend untersucht. Über einen Zeitraum von 21 Tagen wurden die Zellen in einem speziellen osteogenem Differenzierungsmedium (siehe Tabelle 9) kultiviert, welches die Bedingungen für die Differenzierung zu Osteoblasten förderte. Die Ergebnisse wurden sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch

durch die Alizarin-Rot-Färbung visualisiert, die die Kalziumablagerungen in der extrazellulären Matrix sichtbar machte (siehe Abb. 7 und Abb. 8-15). Die anschließende Rücklösung des Farbstoffs und die photometrische Auswertung erlaubten eine quantitative Messung der Kalziumablagerungen und somit die Bestimmung der Mineralisierung. Es zeigte sich eine signifikante Zunahme der Mineralisierung in den ASCs, die im osteogenen Differenzierungsmedium kultiviert wurden, verglichen mit der Kontrollgruppe, die keiner Differenzierung ausgesetzt war (siehe Abbildung 17). Diese Ergebnisse bestätigten die Fähigkeit der ASCs, sich erfolgreich in Richtung Osteogenese zu differenzieren und untermauern ihr Potenzial als alternative Zellquelle für die Entwicklung regenerativer Therapien im Bereich der Knochenregeneration.

4.2 Positiver Einfluss von IL-1 β und TNF α auf die osteogene Differenzierung adipogener Stromazellen

Nachdem das osteogene Differenzierungspotenzial von ASCs etabliert wurde, richtete sich der Fokus dieser Forschungsarbeit auf die Untersuchung der Auswirkung von proinflammatorischen Zytokinen auf die Differenzierung. Die adipogenen Stromazellen wurden hierfür über einen Zeitraum von 21 Tagen in osteogenem Differenzierungsmedium unter Zugabe proinflammatorischer Zytokine kultiviert. Es zeigte sich, dass TNF α und IL-1 β die osteogene Differenzierung von ASCs signifikant förderten. Diese Ergebnisse stimmen mit Studien überein, die belegen, dass proinflammatorische Zytokine, abhängig von ihrer Konzentration, osteoanabole Effekte vermitteln können.

So berichteten Hess et al., dass TNF α die osteogene Differenzierung von BMSCs über die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs stimuliert [68]. Über den NF- κ B-Signalweg werden sowohl entzündliche als auch knochenregenerierende Prozesse reguliert. Dieser Signalweg spielt also eine zentrale Rolle bei der Regulation von Entzündungsprozessen. Gleichzeitig kann er in moderaten Konzentrationen die Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten fördern. Ähnlich wie in dieser Arbeit kultivierten Hess et al. die MSCs ebenfalls 21 Tage lang,

verwendeten jedoch eine TNF α -Konzentration von etwa 200 U/ml. In den vorliegenden Experimenten wurden TNF α -Konzentrationen von unter anderem 100 U/ml und 250 U/ml getestet. Beide Konzentrationen förderten die osteogene Differenzierung, jedoch deuten Unterschiede in der Stärke des Effekts darauf hin, dass es eine optimale TNF α -Konzentration gibt, bei der die Differenzierung am ausgeprägtesten ist. Es ist denkbar, dass eine Konzentration von 200 U/ml, wie sie bei Hess et al. verwendet wurde, einen stärkeren osteogenen Effekt hätte als die niedrigere Konzentration von 100 U/ml. Darüber hinaus unterschieden sich die Methoden zur Quantifizierung der Kalziumablagerungen: Während in dieser Arbeit die Alizarin-Rot-Färbung zur Visualisierung eingesetzt wurde, nutzten Hess et al. den *Cresolphthalein-Colormetric-Assay* zur quantitativen Messung [68, 69]. Beide Methoden sind etabliert, wobei die Alizarin-Rot-Färbung den Vorteil einer visuellen Darstellung bietet, während der Cresolphthalein-Assay präzisere quantitative Ergebnisse liefert.

Wang et al. berichteten, dass IL-1 β die Differenzierung von MSCs in Osteoblasten unterstützt, jedoch nur innerhalb eines bestimmten Konzentrationsbereichs unter 100 U/ml [70]. Die hemmende Wirkung trat bei einer Konzentration von 10 ng/ml auf, was ungefähr 100 U/ml entspricht. Niedrige Konzentrationen förderten die Osteogenese, während hohe Konzentrationen hemmend wirkten und die Osteogenese signifikant unterdrückten. Diese duale Wirkung verdeutlicht die Notwendigkeit einer präzisen Dosierung, um positive Effekte auf die Osteogenese zu erzielen. Dies widerspricht den Ergebnissen dieser Arbeit, in der bei einer Konzentration von 100 U/ml die größte Förderung der osteogenen Differenzierung beobachtet wurde.

Interessanterweise widersprechen die Ergebnisse dieser Arbeit anderen Studien, die sowohl fördernde als auch hemmende Wirkungen proinflammatorischer Zytokine auf die Osteogenese beschrieben haben, was ihre komplexe Funktion unterstreicht. In der Fachliteratur werden die Effekte von TNF α und IL-1 β daher kontrovers diskutiert.

Mo et al. zeigten, dass diese Zytokine in unterschiedlichen Konzentrationen teils fördernd, teils hemmend auf die Knochenbildung wirken [71]. Insbesondere die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs spielte eine zentrale Rolle, da NF- κ B nach

Freisetzung in den Zellkern transportiert wird und die Expression von Genen wie RUNX2 reguliert, die an der Osteogenese beteiligt sind. Mo et al. betonten, dass niedrige bis moderate Konzentrationen unter 100 U/ml von TNF α und IL-1 β eine Förderung der Osteogenese bewirken können, was mit den Ergebnissen dieser Arbeit übereinstimmt. Allerdings wurde in dieser Arbeit kein deutlich hemmender Effekt bei den verwendeten Zytokinkonzentrationen beobachtet, während Mo et al. darauf hinwiesen, dass bei höheren Konzentrationen von TNF α und IL-1 β hemmende Effekte durch Inhibition des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs und des Smad-Signalwegs auftreten können. Diese Diskrepanz könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Zytokinkonzentrationen dieser Arbeit möglicherweise nicht hoch genug waren und somit unter dieser Schwelle lagen. Um weiter zu klären, ob die beobachtete Förderung der osteogenen Differenzierung durch die Zytokine auf eine gesteigerte Zellproliferation der ASCs zurückzuführen ist, wurde im nächsten Schritt die Zellproliferation unter verschiedenen Bedingungen untersucht.

4.2.1 Einfluss von IL-1 β und TNF α auf die Proliferation adipogener Stromazellen

Die Proliferation der ASCs wurde unter verschiedenen Bedingungen analysiert, einschließlich der Kultur in osteogenem Differenzierungsmedium mit und ohne Zugabe der proinflammatorischen Zytokine. Zur Quantifizierung der Zellproliferation kamen der CellTiter-Blue-Assay und der BrdU-Assay zum Einsatz, die sowohl die metabolische Aktivität als auch die Zellteilung messen.

In der Kontrollgruppe, die kein osteogenes Differenzierungsmedium und keinen Zytokinzusatz enthielt, zeigte sich eine moderate Proliferation der ASCs, was die natürliche Teilungsrate dieser Zellen widerspiegelt. Die Ergebnisse dieser Gruppe dienten als Basislinie, mit der die Effekte der anderen Versuchsbedingungen verglichen wurden. Bei den Zellen, die in osteogenem Differenzierungsmedium kultiviert wurden, aber keine Zytokine erhielten, zeigte sich am dritten Tag eine leichte Reduktion der Proliferation im Vergleich zur Kontrollgruppe und dann am siebten Tag eine Zunahme (siehe Abbildung 20). Dies ist in Übereinstimmung mit bestehenden Studien, die zeigen, dass das osteogene

Differenzierungsmedium die Proliferation von MSCs signifikant erhöht [72, 73]. Im Vergleich zum Wachstumsmedium führte es zu einer erhöhten Zellzahl und Zelldichte, was auf eine stimulierte Zellproliferation während der osteogenen Differenzierung hindeutet. Ein möglicher Grund für diese erhöhte Proliferation ist, dass das osteogene Differenzierungsmedium die Differenzierung der MSCs zu prä-osteoblastischen Zellen fördert, die sich schneller vermehren als undifferenzierte MSCs.

Weiterhin zeigten die Ergebnisse, dass vor allem TNF α und IL-1 β zu einer Steigerung der Proliferation der ASCs führten. In der Arbeit von Canalis et al. wurde die duale Wirkung von TNF α in einem in vitro Modell auf die Knochenbildung untersucht [74]. Dabei hatten Konzentrationen von TNF α um 100-10.000 U/ml einen positiven Einfluss auf die DNA-Synthese und Zellreplikation in Rattenknochen-Kalvarienkulturen, wobei höhere Konzentrationen oder längere Behandlungen eine hemmende Wirkung auf die Knochenbildung und Kollagensynthese zeigten. Zudem zeigte eine kurzzeitige Behandlung über 24 Stunden mit TNF α eine erhöhte Synthese von Typ-I-Kollagen und eine erhöhte Aktivität der alkalischen Phosphatase, was auf eine Förderung der Osteogenese hinweist. Im Gegensatz dazu führte eine längere Behandlung mit TNF α über 48-96 Stunden zu einer signifikanten Hemmung der Kollagensynthese und ALP-Aktivität. TNF α hatte somit eine doppelte Wirkung mit Förderung der Knochenbildung bei kurzzeitiger Exposition und Hemmung der osteoblastischen Funktion und Steigerung des Kollagenabbaus bei längerer Exposition. Es kristallisierte sich heraus, dass TNF α die Replikation von Osteoprogenitorzellen förderte, die sich anschließend in Zellen mit osteoblastischen Eigenschaften differenzierten. Ebenso berichteten Matsumara et al., dass die Proliferation von MSCs aus dem Synovium in einem in vitro Modell insbesondere bei IL-1 β -Konzentrationen von 1-10 U/ml signifikant gesteigert wurde [75]. In einer anderen Arbeit zeigte sich, dass TNF α in der Kombination mit IFN γ zu einer erhöhten Zellteilung und einer verkürzten Verdopplungszeit der MSCs führte [76]. Interessanterweise war die alleinige Gabe von TNF α weniger wirksam in der Förderung der Proliferation im Vergleich zur Kombination beider Zytokine.

Obwohl TNF α und IL-1 β in dieser Arbeit die Zellproliferation signifikant stimulierten, war die osteogene differenzierung der ASCs unter dem Einfluss dieser

Zytokine deutlich ausgeprägter als die reine Zellvermehrung. Dies deutete darauf hin, dass sie neben der Proliferation auch spezifische Signale zur Förderung der Osteogenese senden, die unabhängig von der Zellproliferation wirken. Die verstärkte Knochenbildung, die durch die Alizarin-Rot-Färbung nachgewiesen wurde, war nicht direkt mit der Zellproliferation gekoppelt, sondern schien vielmehr durch die aktivierten osteogenen Signalwege bedingt zu sein. Diese osteogenen Marker sollten in weiteren Versuchen untersucht werden.

4.3 Hemmende Wirkung von IFN γ auf die osteogene Differenzierung adipogener Stromazellen

Im Gegensatz zu den positiven Effekten von TNF α und IL-1 β zeigte IFN γ in dieser Arbeit eine signifikant hemmende Wirkung auf die osteogene Differenzierung der ASCs. Diese Reduktion der Osteogenese zeigte sich vor allem durch eine verringerte Kalziumablagerung, die durch die Alizarin-Rot-Färbung sichtbar gemacht wurde. Diese Beobachtung steht im Einklang mit zahlreichen Studien, die IFN γ als negativen Regulator der Osteogenese identifizieren und insbesondere eine hemmende Wirkung auf die vollständige Reifung und Mineralisation von Osteoblasten zuschreiben [55, 78, 79].

In der Arbeit von Wang et al. zeigte IFN γ in den frühen Differenzierungsstadien einen positiven Effekt bei einer Exposition von etwa 200 U/ml, während in den späteren Differenzierungsstadien negative Effekte, insbesondere bei der Kalzifikation detektiert wurden [80]. Die Mineralisation wurde in späten Phasen unterdrückt und durch Abnahme der Kalziumablagerungen wie in dieser Arbeit nach 21 Tagen durch die Alizarin-Rot-Färbung sichtbar gemacht. Die späte Phase wurde neben einer Reduktion der Kalziumablagerungen in der Alizarin-Rot-Färbung auch mit einer Verringerung von Osteocalcin als Marker für Mineralisation und endgültige Reifung der Osteoblasten dargestellt. Die frühe Differenzierungsphase von Osteoblasten bei Wang et al. umfasste dagegen die ersten sieben Tage und war durch Marker wie Runx2 und Alkalische Phosphatase gekennzeichnet. Somit wurde als Endpunkt IFN γ ein hemmender Effekt auf die

vollständige Reifung und Mineralisation der Osteoblasten zugeschrieben, was mit den Beobachtungen dieser Arbeit nach 21 Tagen übereinstimmt.

Im Gegensatz dazu berichtete Lai et al. über eine umgekehrte, stufenabhängige Wirkung von IFN γ [81]. In der Frühphase bis zum siebten Tag wurde die Osteoblastendifferenzierung durch Hemmung der Proliferation und der Bildung der extrazellulären Knochenmatrix negativ beeinflusst. In der Spätphase, ab dem achten Tag jedoch, zeigte IFN γ eine entgegengesetzte Wirkung: Osteocalcin und Alkalische Phosphatase, welche die Mineralisation fördern, zeigten eine erhöhte Expression unter der Behandlung mit IFN γ .

Die Ergebnisse dieser unterschiedlichen Studien, die teils stufen- oder konzentrationsabhängige Effekte von IFN γ aufzeigen, lassen vermuten, dass diesem Zytokin eine komplexe, stadienabhängige Rolle in der Osteogenese zugeschrieben wird. Möglicherweise unterstützt IFN γ in früheren Differenzierungsphasen die initialen Prozesse, hemmt jedoch in den späteren Stadien die endgültige Reifung. Die Übereinstimmung der Ergebnisse in den späten Differenzierungsstadien deutet darauf hin, dass IFN γ , abhängig von der Zeit und Konzentration, eher die vollständige Osteoblastenreifung beeinträchtigt als die anfängliche Differenzierung.

4.3.1 Einfluss von IFN γ auf die Proliferation adipogener Stromazellen

Neben der verminderten osteogenen Differenzierung zeigte IFN γ in dieser Arbeit auch eine hemmende Wirkung auf die Proliferation von ASCs, gemessen mittels CellTiter-Blue- und BrdU-Assay. Diese Reduktion der Zellproliferation steht im Einklang mit den Ergebnissen von Vigo et al., die eine zweistufige und dosisabhängige Reaktion von IFN γ auf MSCs beschrieben [82]. Während niedrige IFN γ -Konzentrationen die Proliferation und Differenzierung leicht unterstützten, führte eine höhere und längere IFN γ -Exposition zu einer deutlichen Hemmung beider Prozesse. Der negative Einfluss wurde bei einer Konzentration von 100 U/ml und einer Expositionsdauer von 24-78 Stunden beobachtet. Diese Effekte wurden insbesondere durch die Aktivierung des STAT1-Signalwegs (*Signal transducers and activators of transcription*) und die Hemmung des mTOR-Signalwegs

(*mechanistic target of rapamycin*) vermittelt. Der STAT1-Signalweg unterdrückt proliferative Signale, während die Hemmung des mTOR-Signalwegs die zellulären Wachstumsprozesse verlangsamt und damit eine Reduktion sowohl der Proliferation als auch der Differenzierung bewirkt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen daher, dass IFN γ eine dosis- und zeitabhängige Hemmung auf die osteogene Differenzierung von ASCs ausübt und dass die Effekte eng miteinander verknüpft sind. Die teils gegensätzlichen Effekte abhängig von Konzentration und Expositionszeit in der Literatur unterstreichen die komplexe Rolle des Zytokins in der Osteogenese.

4.4 Einfluss von IL-6 und IL-8 auf die osteogene Differenzierung adipogener Stromazellen

In dieser Arbeit zeigte sich, dass IL-6 und IL-8 eine moderate Wirkung auf die osteogene Differenzierung und Proliferation der ASCs hatten. Im Vergleich zu TNF α und IL-1 β , die eine signifikante Förderung der Osteogenese bewirkten und zu IFN γ , welches eine deutliche Hemmung auslöste, erwiesen sich IL-6 und IL-8 als weniger potente Regulatoren der Knochenbildung. Die Behandlung der ASCs mit diesen Zytokinen führte zu einer leicht erhöhten Proliferationsrate, ohne die osteogene Differenzierung signifikant zu fördern oder zu hemmen.

Der moderate Einfluss von IL-6 und IL-8 steht somit in deutlichem Kontrast zu den Effekten von TNF α und IL-1 β , die eine wesentliche stärkere Wirkung auf die Osteogenese zeigten. Dieser Unterschied könnte, wie Arakil et al. beschrieben, auf unterschiedliche Signalwege zurückzuführen sein, die durch diese Zytokine aktiviert werden [83]. Während TNF α und IL-1 β primär stark proinflammatorische Signalwege wie NF κ B und MAPK aktivieren, wirken IL-6 und IL-8 primär über den JAK/STAT- und CXCR1/2-Signalweg, die in erster Linie die Zellproliferation, Migration und moderate Osteoklastenaktivität fördern.

Weiterhin stimmen die moderaten Effekte dieser Zytokine auf die osteogene Differenzierung der ASCs mit der bestehenden Literatur überein, die ihnen häufig eine duale Rolle in der Knochenhomöostase zuschreibt.

Die negative Wirkung von IL-6 wurde von Hughes et al. dokumentiert, die zeigten, dass IL-6 vor allem die Differenzierung und Mineralisation der Osteoblasten hemmt [84]. Dabei wurden jedoch keine ASCs untersucht, sondern Osteoblasten aus den Schädelknochen von Ratten, die mit rekombinantem humanem IL-6 bis zu einer Konzentration von 5000 U/ml kultiviert wurden. Auch der Einfluss auf die Zellproliferation wurde untersucht, worauf IL-6 keinen Einfluss zeigte, was mit dem Ergebnis der absoluten Zellzahl an Tag 21 dieser Arbeit übereinstimmt. IL-6 zeigte dabei auch keinen Anstieg der absoluten Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle. Die hemmende Wirkung wurde in einer weiteren Arbeit bestätigt, in der gezeigt wurde, dass IL-6 die Osteoklastendifferenzierung fördert [85]. Die verwendeten Zellen stammten dabei ursprünglich aus einer etablierten Zelllinie aus Maus-Osteozyten, die als Modell für Osteozyten verwendet wird.

Im Gegensatz dazu belegten Li et al., dass die IL-6-Rezeptorexpression während der Differenzierung zunahm und die Expression von Differenzierungsmarkern wie Runx2 und Osteocalcin gefördert wurde [86]. Weiterhin verdeutlichen sie die duale Funktion von IL-6, als positiven Induktor der Differenzierung in Präosteoblasten, während es in ausgereiften Zellen die Apoptose fördern kann. Darüber hinaus steigerte IL-6 in dieser Studie die osteozytäre RANKL-Expression über den JAK2/STAT3-Signalweg, wodurch die Osteoklastenaktivität verstärkt wird. Li et al. betonten, dass bei der Untersuchung der IL-6-Effekte das Differenzierungsstadium der Zellen berücksichtigt werden sollte, da IL-6 sowohl fördernde als auch hemmende Effekte je nach Stadium haben kann. Die Arbeit basierte auf Zellkulturmodellen, weshalb eine direkte Übertragbarkeit auf ASCs eingeschränkt ist. Diese differenzierte Betrachtung der verschiedenen Stadien könnte jedoch als zukünftiger Ansatz dienen, da in dieser Arbeit IL-6 keine klare Tendenz zeigte.

Zusammenfassend wird IL-6 in der Literatur häufig als pro-osteogenes Zytokin beschrieben, insbesondere im Zusammenhang mit der Förderung der Osteoblastenreifung und Mineralisation über den JAK/STAT-Signalweg. Verschiedene

Berichte weisen jedoch auf die stark kontextabhängige Wirkung hin. Abhängig von Konzentrationen, Zelltyp und Differenzierungsstadium kann es sowohl positive als auch negative Effekte auf die Osteogenese haben.

Ähnlich verhält es sich mit IL-8, das in einigen Studien als Förderer der Osteogenese beschrieben wird, insbesondere durch die Stimulierung der Osteoblastenproliferation und -migration. IL-8 ist primär für die Rolle als Chemokin bekannt, dass die Migration und Invasion, insbesondere von Immunzellen, moduliert [87, 88].

In der vorliegenden Arbeit führte die Behandlung mit IL-8 zu einer geringfügigen Erhöhung der Proliferation, ohne dass eine signifikante Steigerung der osteogenen Differenzierung beobachtet wurde. Die Kalziumablagerungen in der extrazellulären Matrix blieben unverändert. Diese moderaten Effekte von IL-8 auf die Proliferation und die vernachlässigbare Wirkung auf die Differenzierung stehen im Einklang mit der Literatur, die beschreibt, dass IL-8 nicht als primärer Faktor für die Osteogenese gilt.

So wurde in der Arbeit von De Larco et al. IL-8 primär als pro-mitogenes und chemotaktisches Molekül beschrieben, das die Migration und Zellviabilität durch Anziehung von Neutrophilen und Schaffung einer proinflammatorischen Umgebung fördert [89]. IL-8 entfaltet seine Wirkung über die CXCR1- und CXCR2-Rezeptoren, was zu einer Aktivierung des PI3K/AKT- und MAPK/ERK-Signalweg führt, die das Zellüberleben und die Proliferation unterstützen. Diese Signalwege sind auch in ASCs aktiv und könnten die leichte Proliferationssteigerung in der vorliegenden Arbeit erklären. Es wurde zudem hervorgehoben, dass IL-8 neutrophile Enzyme aktiviert, die die extrazelluläre Matrix abbauen und so das Eindringen von Tumorzellen in das Gewebe erleichtern. Obwohl dieser Mechanismus für ASCs weniger relevant ist, könnte er dennoch auf die Rolle von IL-8 bei der Zellmigration- und adhäsion hinweisen. Die in der vorliegenden Arbeit beobachteten begrenzten Effekte von IL-8 auf die Differenzierung stützen die Annahme, dass IL-8 zwar die Zellproliferation und Migration fördert, jedoch keine direkte osteogene Wirkung hat.

Insgesamt deuten diese Studien darauf hin, dass die moderate Wirkung von IL-6 und IL-8 auf ASCs auf ihre begrenzte Rolle in der direkten Förderung der

Osteogenese zurückzuführen ist. Beide Zytokine beeinflussen primär die Zellproliferation und Migration, ohne eine starke osteogene Differenzierung zu induzieren, was auch in dieser Arbeit beobachtet wurde. Diese Ergebnisse tragen zur wissenschaftlichen Literatur bei, die IL-6 und IL-8 eine duale Rolle in der Knochenhomöostase zuschreibt und bestätigen, dass ihre Effekte kontextabhängig und abhängig von Zelltyp und Differenzierungsstadium sind.

4.5 Fazit der Experimente zur osteogenen Differenzierung

In der Literatur gibt es zahlreiche Berichte über den Einfluss proinflammatorischer Zytokine auf die osteogene Differenzierung von Stromazellen. Die vorliegenden Ergebnisse erweitern diese Erkenntnisse. Ein wesentlicher Befund war dabei die Variabilität der Reaktion der ASCs auf die Zytokinbehandlung, die teilweise starke Unterschiede zwischen den Spender-Pools aufwies. Diese Unterschiede können auf eine Vielzahl von Faktoren zurückgeführt werden, darunter das Spenderalter, die Gesundheitszustände der Spender und die individuelle Heterogenität der ASCs selbst, die in ihrem Differenzierungspotenzial und ihrer Empfindlichkeit gegenüber Zytokinen variieren. Während einige Zellpools unter denselben Bedingungen eine starke Differenzierung und Mineralisation zeigten (*Responder*), reagierten andere kaum oder gar nicht auf die osteogenen Reize (*Non-Responder*). Dieser Unterschied verdeutlicht die biologische Heterogenität der verwendeten Zellpools und die variierenden Differenzierungspotenziale innerhalb der Spender. In den vorliegenden Versuchen waren die Zellpools repräsentativ für die durchschnittliche Spenderqualität, da sie Zellen sowohl hoher als auch niedriger Differenzierungsneigung enthielten. Die Kultivierung von acht verschiedenen Spendern über 14 und 21 Tage in osteogenem Differenzierungsmedium (OM) zeigte diesen Effekt (siehe Abbildung 17). Somit wurden die Unterschiede in der Reaktion auf das OM und die Heterogenität der Spenderzellen hinsichtlich ihres osteogenen Potenzials verdeutlicht.

Durch diese Ergebnisse wurde die in der Literatur häufig diskutierte Heterogenität mesenchymaler Stromazellen bestätigt.

4.5.1 Unterschiede der Responder und Non-Responder

Die Ergebnisse des Experiments zur osteogenen Differenzierung der ASCs unter dem Einfluss proinflammatorischer Zytokine zeigten deutliche Unterschiede in der Differenzierungsleistung zwischen einzelnen Zellspenden. Die Zellen ließen sich in *Responder* und *Non-Responder* unterteilen: *Responder* zeigten eine ausgeprägte osteogene Differenzierung, erkennbar an hohen Kalziumablagerungen, während *Non-Responder* aufgrund ihres Seneszenz-Status wenig bis gar nicht differenzierten. Die Seneszenz dieser Zellen deutete auf eine verstärkte Zellalterung und ein eingeschränktes regeneratives Potenzial hin. Die Studienlage zeigt, dass die Reaktionsfähigkeit der MSCs sowohl von individuellen Spendermerkmalen als auch von intrazellulären Signalwegen beeinflusst wird, was unterschiedliche Differenzierungsergebnisse zur Folge hat [90, 91].

Arzi et al. zeigten in einer Untersuchung adipogener Stammzelltherapien für Katzen, dass ähnliche Variationen in der Reaktionsfähigkeit auftraten [92]. In der Studie wurde im Rahmen der chronisch entzündlichen Erkrankung Gingivostomatitis die Fähigkeit von ASCs, das Immunsystem zu modulieren, untersucht. Bei *Respondern* konnte eine deutliche Reduktion der Entzündungszellen im Gewebe nachgewiesen werden. Die Ergebnisse stützen die Annahme, dass die Heterogenität der Spenderpopulation für die Variabilität der Ergebnisse dieser Arbeit entscheidend ist und dass die Durchschnittsqualität eines Spenderpools oft nicht die individuelle Differenzierungskapazität einzelner Zellen widerspiegelt.

In einer Publikation aus diesem Labor wurde belegt, dass *Non-Responder-ASCs* eine eingeschränkte oder nicht vorhandene osteogene Differenzierung aufwiesen, was bei älteren Spendern mit einer erhöhten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) verbunden wurde [93]. Die Behandlung mit Antioxidantien wie Superoxid-Dismutase (SOD) und Katalase führten wieder zu ähnlichen oder sogar höheren Differenzierungsraten als in den *Respondern*. Diese Erkenntnis legt nahe, dass die Kombination von Zytokinbehandlungen mit spezifischen Enzymen in zukünftigen Experimenten zur Steigerung der osteogenen Potenz von *Non-Respondern* in Betracht gezogen werden könnte.

Zusammenfassend bestätigen die Ergebnisse, dass ASCs je nach Spenderqualität unterschiedlich auf die osteogenen Differenzierungsreize ansprechen.

Studien legen nahe, dass eine gezielte Förderung von Non-Respondern durch die Kombination von Zytokinen mit antioxidativen Enzymen, photobiologischer Stimulation oder sogar eine prädiktive Analyse der Zellmarker in der Zellkultur nützlich sein könnten. Diese Ansätze könnten die Effizienz der Zelltherapie weiter verbessern, indem die *Responder* in Zellpools selektiv gefördert und die Differenzierungsschwäche in *Non-Respondern* gezielt adressiert wird.

4.6 Expression der Schlüsselproteine der osteogenen Differenzierung

Die osteogene Differenzierung unterliegt einer Vielzahl an Regulationsmechanismen, darunter die Expression von Schlüsselproteinen, die die Balance zwischen Osteoblasten- und Osteoklastengnese steuern. In dieser Arbeit wurde die Expression wichtiger osteogener Marker während der Differenzierung unter dem Einfluss der proinflammatorischen Zytokine TNF α , IL-1 β und IFN γ mittels Western Blot analysiert und mit einer Kontrollgruppe ohne Zytokinexposition verglichen. IL-6 und IL-8 wurden ausgeschlossen, da deren Effekte auf die osteogene Differenzierung in den vorherigen Versuchen als moderat eingestuft wurden. Um eine klare Auswirkung auf die Differenzierung zu ermitteln, wurden lediglich Zytokinkonzentration mit potenziell hoher Wirkung auf die Differenzierung der ASCs untersucht. Ziel war es, durch die Untersuchung der Schlüsselproteine tiefere Einblicke in die molekularen Grundlagen der Differenzierung unter entzündlichen Bedingungen zu gewinnen.

Die Zytokine beeinflussten die Expression von ALP, BMP-2, Osteocalcin, Osteopontin und Runx2 unterschiedlich stark. Allerdings konnte in den meisten Fällen keine statistisch signifikante Hochregulierung verzeichnet werden, was die Interpretation dieser Ergebnisse erschwerte.

Interessanterweise bewirkten TNF α und IL-1 β keine signifikante Hochregulierung und führten im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne proinflammatorische Zytokine über den Zeitraum von 21 Tagen zu einer geringeren ALP-Expression. Überraschend zeigte IFN γ eine höhere ALP-Expression an Tag 7 und 21, obwohl IFN γ in den vorherigen Experimenten als hemmend auf die Osteogenese beschrieben

wurde. Dieser Anstieg könnte auf eine initiale Differenzierungsinduktion hinweisen, ohne jedoch eine signifikante Förderung späterer osteogener Marker wie Osteocalcin oder Osteopontin zu bewirken. Die Wirkung von IFN γ auf die frühe ALP-Expression ist in der Literatur bisher kaum erforscht und könnte auf spezifische Mechanismen hindeuten, die eine vorübergehende Differenzierungsaktivierung unterstützen.

ALP ist als Marker der frühen osteogenen Differenzierung bekannt. In früheren Studien zeigte sich, dass eine signifikante Hochregulation von ALP bereits in der Frühphase unter Osteogenese-induzierenden Zytokinen erwartet wurde. Jedoch wurde im Gegensatz dazu in anderen Studien gezeigt, dass TNF α und IL-1 β ab einer Konzentration von etwa 100 U/ml hemmend auf die ALP-Aktivität wirken könnten [71, 77]. Diese Konzentration der Zytokine wurde hier verwendet. Im vorliegenden Versuch zeigte sich jedoch keine merkliche Beeinträchtigung der osteogenen Differenzierung, obwohl die ALP-Werte in der Western Blot-Analyse relativ niedrig ausfielen. Der niedrige ALP-Nachweis in der Western Blot Analyse stimmt somit mit einigen Studien überein. Auf der anderen Seite führte eine geringe TNF α Konzentration in der Arbeit von Croes et al. zu einer höheren ALP-Aktivität im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen [94].

Die Expression von BMP-2 stieg unter TNF α und IL-1 β an den Tagen 7 und 14 deutlich an, bevor sie an Tag 21 wieder abnahm. Im Gegensatz dazu zeigte IFN γ durchgehend eine reduzierte BMP-2-Expression, was dessen inhibierende Wirkung auf die osteogene Differenzierung bestätigt. Hohe TNF α -Konzentrationen über 100 U/ml können die Expression von BMP-2 hemmen, was möglicherweise eine verringerte Matrixmineralisierung zur Folge hat [77, 95]. In der Forschungsarbeit von Hess et al. wiederum wurde eine signifikante Erhöhung der Expression von osteogenen Markern wie BMP-2 und auch ALP beobachtet, was zu einer verstärkten Mineralisierung der extrazellulären Matrix führte [68]. Hierbei wurde eine TNF α -Konzentration von etwa 200 U/ml auf MSCs angewendet, die zu einer signifikanten Kalziumablagerung in der extrazellulären Matrix führte und als Marker für erhöhte Osteogenese gewertet wurde.

Osteocalcin, ein Marker der späten Osteoblastendifferenzierung, zeigte nur unter IL-1 β an Tag 14 eine Erhöhung der Expression. Die anderen Zytokine zeigten

entweder eine konstante oder leicht erhöhte Expression im Vergleich zur Kontrolle, was darauf hindeuten könnte, dass IL-1 β die späte Differenzierung gezielt unterstützt. In der Arbeit von Croes et al. wurde Osteocalcin als Marker für die spätere Phase der Osteogenese verstärkt exprimiert [94]. Diese Beobachtung konnte in dieser Arbeit nicht gemacht werden.

Die Expression von Osteopontin erreichte unter TNF α an Tag 7 ein Maximum und hielt sich bis Tag 21 auf einem verringerten Niveau. IL-1 β und IFN γ führten hingegen zu keiner signifikanten Osteopontin-Stimulation im Vergleich zur Kontrolle. Die anfänglich hohe und dann abnehmende Expression unter TNF α könnte auf die Aktivierung früher osteogener Signalwege zurückzuführen sein, die jedoch in späteren Phasen keine Nachhaltigkeit zeigen. Lacey et al. berichteten über eine signifikante Hemmung der Osteopontin-Expression bei niedrigen TNF α Konzentrationen, wobei die Expression durch IL-1 β nicht signifikant beeinflusst wurde [96]. Weiterhin haben in der Arbeit beide Zytokine die ALP-Aktivität gehemmt und zu einer Reduktion der Kalziumablagerungen sowie der Gesamtmineralisation geführt. Diese Hemmung fand selbst bei niedrigen Konzentrationen von etwa 1 U/ml für IL1 statt.

Runx2, ein zentraler Transkriptionsfaktor der Osteogenese, wurde unter IL-1 β an Tag 7 und 14 erhöht exprimiert, während TNF α und IFN γ eine geringere Expression zeigten. In der Arbeit von Xu et al. wurden für TNF α und IL-1 β bei Langzeiteinwirkung mit über 100 U/ml neben der Hemmung der ALP, BMP-2 und Osteocalcin-Expression auch eine Hemmung der Runx2 Expression gezeigt und die Differenzierung auf diese Weise beeinträchtigt [77]. Dennoch war es überraschend, dass trotz einer Zytokinkonzentration von 100 U/ml im vorliegenden Versuch eine signifikante Kalziumablagerung und somit eine erhöhte osteogene Differenzierung beobachtet wurde.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die getesteten Zytokine die osteogene Differenzierung in einer Zeit- und konzentrationsabhängigen Weise modulieren. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen jedoch keine statistisch signifikante Tendenz, was nahelegt, dass zukünftige Versuche andere Zytokinkonzentrationen in Betracht ziehen sollten. Es ist bemerkenswert, dass die osteogenen Effekte, wie die deutlichen Ergebnisse in der Alizarin-Rot-Färbung, möglicherweise

durch eine anfängliche Zytokinwirkung gefördert wurden, ohne dass die Differenzierungsmarker nachgewiesen werden konnten.

Zukünftige Untersuchungen könnten durch eine fein abgestimmte Dosierung und zeitlich variierte Zytokinexposition ein tieferes Verständnis der differenzierungsmodulierenden Wirkung proinflammatorischer Zytokine ermöglichen. Ergänzende Studien mit längerer Kultivierungszeit und zusätzlichem Einsatz osteoinduktiver Faktoren könnten die osteogene Differenzierung weiter fördern und statistisch signifikante Ergebnisse erzielen.

4.7 Stärken und Limitationen der Methodik

Die ausgewählten Materialien und die verwendete Methodik basierte auf etablierte Protokolle und SOPs des Labors. Dadurch wurde die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sichergestellt. Diese standardisierten Verfahren haben somit auch zur Validität der Ergebnisse beigetragen.

In dieser Forschungsarbeit wurden ASCs aus Abdominoplastiken isoliert und für die Versuche verwendet. Die Wahl von ASCs hat mehrere Vorteile, darunter die hohe Verfügbarkeit und die relativ einfache und weniger invasive Gewinnung. Um die Zellen aus den Abdominoplastiken zu isolieren, wurden präparierte Fettläppchen in einer Kollagenaselösung (siehe Tabelle 9) zentrifugiert, durch ein Filter gedrückt und anschließend mit PBS zentrifugiert. Grottkau et al verwendeten eine ähnliche Methode [97]. Ein Unterschied lag in der Zusammensetzung der Kollagenaselösung. Sie verwendeten lediglich PBS mit Typ 1 Kollagenase ohne BSA. Außerdem wurde die Lösung für 60 Minuten bei 37 ° zentrifugiert, wobei in dieser Arbeit die Zeit der Zentrifugation mit 45 Minuten geringer und zellschonender war. Der manuelle Waschvorgang am Ende der Isolation mit PBS wurde hier durch das intensivere Waschen mittels Zentrifuge ersetzt. Die Inkubation der ASCs war identisch bei 5 % CO₂ und 37° C. Die Extraktion der Zellen aus den Abdominoplastiken basierte also auch auf bereits etablierte Methoden. Dennoch traten Schwierigkeiten bei der Kultivierung der ASCs auf, wobei eine der größten Herausforderungen die bakterielle Kontamination der Zellkulturen war. Diese Einschränkung erschwerte das Erreichen einer ausreichenden Zellzahl für die

Experimente erheblich. Um dieser Limitation entgegenzuwirken, wurde die Antibiotikakonzentration im Differenzierungsmedium entsprechend erhöht oder durch ein zusätzliches Antibiotikum ergänzt.

Es ist bereits bekannt, dass die osteogene Differenzierung in niedrigen Zellpassagen besser unterstützt wird und dass ASCs bis ungefähr Passage 10 differenzieren können [98]. Bei der Kultivierung bis zur gewünschten Zellzahl für die Experimente wurde darauf geachtet, dass die einzelnen Spenderzellen in niedrigen Passagen gehalten wurden. Nach dem Zusammenführen der Zellen in Zellpools begann die Passagenzählung jedoch erneut, was dazu geführt haben könnte, dass die ASCs schließlich über Passage 10 hinaus kultiviert wurden. Dies könnte die Differenzierungsfähigkeit der ASCs negativ beeinflusst haben und möglicherweise erklären, warum im Western Blot eine geringe Expression der osteogenen Marker zu beobachten war.

Mithilfe eines osteogenen Differenzierungsmediums (siehe Tabelle 9) mit enthaltenen Wachstumsfaktoren und Zusätzen kann die Differenzierung der ASCs in Richtung Osteogenese stimuliert werden. Den enthaltenen Wirkstoffen Dexamethason, L-Ascorbinsäure-2-Phosphat und β -Glycerophosphat werden bedeutende Funktionen bei der osteogenen Differenzierung zugeschrieben [99]. Das Dexamethason wirkt osteoinduktiv durch Förderung der RUNX2 Expression. Als Phosphat-Quelle und somit Substrat der Alkalischen Phosphatase dient β -Glycerophosphat. Dadurch ist es an der Mineralisierung der Extrazellulärmatrrix beteiligt. Für die enzymatische Hydroxylierung von Prolin und Lysin in Pro-Collagen und Stabilität durch Steigerung der Kollagen Typ 1 Sekretion sorgt L-Ascorbinsäure-2-Phosphat. Auch Grottkau et al nutzten ein ähnliches osteogenes Differenzierungsmedium, wobei das dieser Arbeit auch ein Antibiotikum enthielt, welches aus Penicillin und Streptomycin zusammengesetzt war [97]. Es wurde weiterhin durch Zuk et al beschrieben, dass man das Dexamethason im Kulturmedium, welches zur Passagierung und Anzüchtung der ASCs genutzt wurde, gegen 1,25-dihydroxyvitamin D3 austauschen könnte [100]. Die Zusammensetzung des verwendeten osteogenen Differenzierungsmediums stützte sich somit auf bereits durchgeführte Forschungsarbeiten. Jedoch unterliegt die Differenzierungsfähigkeit von ASCs auch individuellen Spenderunterschieden, was zur Variabilität der Ergebnisse beigetragen haben könnte.

Zukünftige Studien könnten die Verwendung von Zellen eines größeren Spenderpools in Betracht ziehen, um den Einfluss einzelner Variablen zu reduzieren und repräsentativere Ergebnisse zu erzielen. Zudem könnten spezifische Ausschlusskriterien für Spender festgelegt werden, etwa in Bezug auf Grunderkrankungen, Medikamenteneinnahme, BMI, Geschlecht und Alter. Dies wäre sinnvoll, da entzündliche Prozesse im Körper der Spender möglicherweise die Ergebnisse beeinflussen könnten. So könnte man beispielsweise ältere Frauen mit Osteoporose ausschließen. Darüber hinaus ist bekannt, dass ASCs aus verschiedenen Körperregionen unterschiedliche Differenzierungspotenziale aufweisen [101]. Daher wäre es sinnvoll, neben Fettgewebe aus Abdominoplastiken auch Gewebeproben aus anderen Bereichen wie Gesäß oder Beinen einzubeziehen.

Die Widersprüchlichkeit in den Ergebnissen früherer Studien könnte auf unterschiedliche experimentelle Bedingungen, wie die Art der Zellen oder die Konzentrationen der Zytokine zurückzuführen sein. Die doppelte Rolle der Zytokine in der Literatur zeigt jedoch auch das Risiko einer Überstimulation in der klinischen Anwendung, was zu unerwünschten entzündlichen Reaktionen führen könnte. Daher ist eine präzise Dosierung entscheidend.

Weiterhin basierte die Entscheidung, $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ und $\text{IFN}\gamma$ in spezifischen Konzentrationen zu verwenden, auf Vorversuchen, die diese Konzentrationen als wirksam identifizierten. Dennoch zeigte sich in den Ergebnissen, dass die gewählten Konzentrationen und Expositionszeiten in den meisten Fällen keine statistisch signifikante Hochregulierung der Markerproteine bewirkte. Die Literatur weist darauf hin, dass eine genauere Abstimmung der Zytokinkonzentrationen und kürzere oder längere Expositionszeiträume sinnvoll sein könnten. Hierbei könnte ein abgestuftes Dosierungsschema implementiert werden, das von niedrigen zu höheren Dosen variiert, um eine präzisere Analyse der Konzentrationsabhängigkeit zu ermöglichen. Weiterhin wurden die Zytokine nur einzeln untersucht. Man könnte sich in Zukunft noch kombinierte Zytokineffekte anschauen, um synergistische oder antagonistische Wechselwirkungen zwischen den Zytokinen zu ermitteln.

Ein wesentlicher Unterschied in den verglichenen Studien ist die Art der verwendeten Zellen und die spezifischen experimentellen Bedingungen. In einigen

Untersuchungen wurden mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark verwendet, während in dieser Arbeit adipogene Stromazellen untersucht wurden. Diese Unterschiede könnten die Varianz in der Zytokinantwort erklären.

Einige Experimente wiesen eine hohe Standardabweichung auf, was auf die Variabilität zwischen den Zellpools sowie methodische Fehler zurückzuführen sein könnte. Es wurden trotzdem alle gemessenen Werte in die Auswertung einbezogen, um ein vollständiges Bild der Ergebnisse darzustellen. Trotz der teils großen Streuung ließen sich klare Tendenzen in den Ergebnissen erkennen, die wertvolle Hinweise auf die Wirkung der untersuchten Zytokine lieferten.

Bezüglich der Genauigkeit und Reproduzierbarkeit könnten in Zukunft einige Verbesserungen durchgeführt werden. In den vorliegenden Experimenten wurde eine Einzelpipette verwendet, um die verschiedenen Zytokine und Reagenzien zu dosieren. Während Einzelpipetten präzisere Ergebnisse liefern können, besteht insbesondere bei mehrfachem Pipettieren kleiner Volumina das Risiko von Fehlern, die durch Benutzerabhängigkeit und Schwankungen und Pipettierfehler bedingt sein können. Diese Variabilität könnte die Vergleichbarkeit der Ergebnisse leicht beeinträchtigen. Der Einsatz einer Multipipette in Zukunft könnte potenziell zu Reduzieren dieser Schwankungen beitragen. Durch das gleichzeitige Pipettieren mehrerer Wells könnte insbesondere bei Versuchen mit zahlreichen Replikaten eine höhere Genauigkeit erreicht werden.

Abschließend sollte bei der Betrachtung der Ergebnisse berücksichtigt werden, dass dieses *in vitro* Modell eine vereinfachte und kontrollierte Umgebung bot, jedoch die komplexe *in vivo* Situation nicht vollständig nachbilden konnte, insbesondere im Hinblick auf die Interaktion mit anderen Zelltypen und Gewebe.

4.8 Schlussfolgerung und klinische Relevanz

Zusammenfassend haben die Ergebnisse dieser Arbeit gezeigt, dass die osteogene Differenzierung von ASCs durch proinflammatorische Zytokine komplex

reguliert wird und dass die Effekte stark vom spezifischen Zytokin und dessen Konzentration abhängen.

Während TNF α und IL-1 β die Differenzierung förderten, zeigte IFN γ eine durchgehend hemmende Wirkung. Für IL-6 und IL-8 wurden moderate Effekte detektiert. Diese Arbeit unterstreicht das Potenzial von ASCs als vielversprechende Quelle für die regenerative Medizin, insbesondere in der Knochenregeneration. Die Möglichkeit, die osteogene Differenzierung durch gezielte Modulation proinflammatorischer Zytokine zu steuern, könnte zukünftig in therapeutischen Ansätzen zur Verbesserung der Knochenheilung nach Verletzungen oder bei degenerativen Knochenerkrankungen wie Osteoporose genutzt werden. Insbesondere in der Entwicklung individualisierter Therapien, bei denen Entzündungsprozesse gezielt reguliert werden, könnten ASCs als alternative Zellquelle gegenüber Knochenmarkzellen von Vorteil sein. Die Herausforderung liegt darin, die molekularen Mechanismen weiter zu erforschen und standardisierte Differenzierungsprotokolle zu entwickeln, die den klinischen Anforderungen gerecht werden und reproduzierbare Ergebnisse liefern. Mit den derzeitigen Erkenntnissen wird die medikamentöse Therapie jedoch eine untergeordnete Rolle spielen. Durch eine Therapie mit proinflammatorischen Zytokinen würde man ansonsten bei Patienten eine systemische Entzündungsreaktion hervorrufen. Entzündungsreaktionen bedürfen einer sorgfältigen Kontrolle, da sie in einer Gewebeschädigung oder einer systemischen Manifestation (*Systemic inflammatory response syndrome*, SIRS) resultieren können.

4.8.1 Ausblick

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass proinflammatorische Zytokine einen positiven Stimulator in der Osteogenese darstellen, obwohl sie gleichzeitig mit entzündlichen und katabolen Effekten in Verbindung stehen. Die genaue Wirkung dieser Zytokine scheint stark vom Zelltyp, der Konzentration und den Umweltbedingungen abzuhängen. Zukünftige Studien sind erforderlich, um die Mechanismen hinter diesen Effekten besser zu verstehen und mögliche klinische Anwendungen gezielt zu optimieren.

Ein Aspekt, der zukünftig untersucht werden könnte, ist die Kombination der Wirkung physikalischer Stimulation und proinflammatorischer Zytokine auf die osteogene Differenzierung und Proliferationen adipogener Stromazellen. Es ist bereits bekannt, dass physikalische Stimuli, wie beispielsweise mechanische Reize, die osteogene Differenzierung von Stromazellen positiv beeinflussen können [102-104]. Diese Stimuli ahmen *in vivo*-Bedingungen nach und kommen den natürlichen Prozessen in Geweben wie Knochen, Knorpel oder Muskeln nahe.

Die Kombination von ASCs und BMSCs wurde bereits untersucht und zeigte eine verstärkte osteogene Differenzierung, sowie eine erhöhte Angiogenese [105]. Zukünftige Studien könnten den Einfluss proinflammatorischer Zytokine auf diese Co-Kultur analysieren. Damit könnte die klinische Anwendung im Rahmen von Knochentransplantationen oder regenerativen Therapien potenziell optimiert werden.

Abschließend eröffnen die Ergebnisse neue Perspektiven für die Erforschung von Therapieansätzen, die nicht nur innovative Möglichkeiten für die Behandlung bieten, sondern auch ein tieferes Verständnis für die Pathogenese von Osteoporose und deren Verbindung zu Entzündungsprozessen und altersbedingten Veränderungen ermöglichen. Insbesondere im *Tissue Engineering* liefern diese Erkenntnisse wertvolle Anknüpfungspunkte: Die gezielte Modulation der osteogenen Differenzierung von ASCs durch proinflammatorische Zytokine und mechanische Stimuli könnten genutzt werden, um stabile Knochen- und Gewebekonstrukte zu entwickeln, die den komplexen Anforderungen der natürlichen Knochenheilung und -regeneration gerecht werden. Durch eine abgestimmte Kombination entzündungsfördernder und mechanischer Reize könnten Zellen gezielt für den Einsatz in bioaktive *Scaffold*-Systeme vorbereitet werden, die in der Lage sind, frakturiertes oder degeneriertes Knochengewebe zu regenerieren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit leisten somit einen bedeutenden Beitrag zur Entwicklung individualisierter, biologisch aktiver Implantate und eröffnen gleichzeitig neue Forschungsfelder und therapeutische Strategien für die Knochengesundheit und das Verständnis entzündungsbedingter Knochenerkrankungen.

5. Literatur- & Quellenverzeichnis

1. Xiao, P.L., et al., *Global, regional prevalence, and risk factors of osteoporosis according to the World Health Organization diagnostic criteria: a systematic review and meta-analysis*. *Osteoporosis International*, 2022. **33**(10): p. 2137-2153.
2. Fuchs J, S.-N.C., Kuhnert R, *12-Monats-Prävalenz von Osteoporose in Deutschland*. *Journal of Health Monitoring*, 2017. **2**(3): p. 61– 65.
3. Willers, C., et al., *Osteoporosis in Europe: a compendium of country-specific reports*. *Arch Osteoporos*, 2022. **17**(1): p. 23.
4. Wawrzyniak, A. and K. Balawender, *Structural and Metabolic Changes in Bone*. *Animals (Basel)*, 2022. **12**(15).
5. Raisz, L.G., *Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects*. *The Journal of Clinical Investigation*, 2005. **115**(12): p. 3318-3325.
6. Ji, M.-X., Q. Yu, and Y. Pan, *Primary osteoporosis in postmenopausal women*. *Chronic Diseases and Translational Medicine*, 2015. **01**(01): p. 9-13.
7. Sahota, O., *Osteoporosis and the role of vitamin D and calcium-vitamin D deficiency, vitamin D insufficiency and vitamin D sufficiency*. *Age Ageing*, 2000. **29**(4): p. 301-4.
8. Franceschi, C., et al., *Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence*. *Ann N Y Acad Sci*, 2000. **908**: p. 244-54.
9. Medzhitov, R., *Origin and physiological roles of inflammation*. *Nature*, 2008. **454**(7203): p. 428-435.
10. Libby, P., *Inflammation and cardiovascular disease mechanisms*. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2006. **83**(2): p. 456S-460S.
11. Kauppinen, A., et al., *Inflammation and its role in age-related macular degeneration*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2016. **73**(9): p. 1765-1786.
12. Caplan, A.I., *Mesenchymal stem cells*. *Journal of Orthopaedic Research*, 1991. **9**(5): p. 641-650.
13. Cook, D. and P. Genever, *Regulation of mesenchymal stem cell differentiation*. *Adv Exp Med Biol*, 2013. **786**: p. 213-29.
14. Karsenty, G., *Transcriptional control of skeletogenesis*. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2008. **9**: p. 183-96.
15. James, A.W., *Review of Signaling Pathways Governing MSC Osteogenic and Adipogenic Differentiation*. *Scientifica*, 2013. **2013**: p. 684736.
16. Bari, A.A.a.C.D., *The Regulation of Differentiation in Mesenchymal Stem Cells*. *Human Gene Therapy*, 2010. **21**(10): p. 1226-1238.

17. Nieto, M.A., *The snail superfamily of zinc-finger transcription factors*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(3): p. 155-66.
18. Komori, T. *Regulation of Osteoblast Differentiation by Runx2*. 2010. Boston, MA: Springer US.
19. Komori, T., *Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors*. Journal of Cellular Biochemistry, 2006. **99**(5): p. 1233-1239.
20. Chen, D., M. Zhao, and G.R. Mundy, *Bone Morphogenetic Proteins. Growth Factors*, 2004. **22**(4): p. 233-241.
21. Chen, D., et al., *Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2) Enhances BMP-3, BMP-4, and Bone Cell Differentiation Marker Gene Expression During the Induction of Mineralized Bone Matrix Formation in Cultures of Fetal Rat Calvarial Osteoblasts*. Calcified Tissue International, 1997. **60**(3): p. 283-290.
22. Neve, A., A. Corrado, and F.P. Cantatore, *Osteoblast physiology in normal and pathological conditions*. Cell Tissue Res, 2011. **343**(2): p. 289-302.
23. Marie, P.J., F. Debais, and E. Haÿ, *Regulation of human cranial osteoblast phenotype by FGF-2, FGFR-2 and BMP-2 signaling*. Histol Histopathol, 2002. **17**(3): p. 877-85.
24. Siffert, R.S., *THE ROLE OF ALKALINE PHOSPHATASE IN OSTEOGENESIS*. Journal of Experimental Medicine, 1951. **93**(5): p. 415-426.
25. Vimalraj, S., *Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization*. Gene, 2020. **754**: p. 144855.
26. Makris, K., C. Mousa, and E. Cavalier, *Alkaline Phosphatases: Biochemistry, Functions, and Measurement*. Calcified Tissue International, 2023. **112**(2): p. 233-242.
27. Golub, E.E. and K. Boesze-Battaglia, *The role of alkaline phosphatase in mineralization*. Current Opinion in Orthopaedics, 2007. **18**(5): p. 444-448.
28. Chandler, R.L., et al., *Bmp2 transcription in osteoblast progenitors is regulated by a distant 3' enhancer located 156.3 kilobases from the promoter*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(8): p. 2934-51.
29. Rosen, V., *BMP2 signaling in bone development and repair*. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2009. **20**(5): p. 475-480.
30. Levi, B., et al., *Enhancement of human adipose-derived stromal cell angiogenesis through knockdown of a BMP-2 inhibitor*. Plast Reconstr Surg, 2012. **129**(1): p. 53-66.
31. Dai, J., et al., *Vascular Endothelial Growth Factor Contributes to the Prostate Cancer-Induced Osteoblast Differentiation Mediated by Bone Morphogenetic Protein*. Cancer Research, 2004. **64**(3): p. 994-999.
32. Wolf, G., *Function of the Bone Protein Osteocalcin: Definitive Evidence*. Nutrition Reviews, 1996. **54**(10): p. 332-333.
33. Zoch, M.L., T.L. Clemens, and R.C. Riddle, *New insights into the biology of osteocalcin*. Bone, 2016. **82**: p. 42-49.

34. Sodek, J., B. Ganss, and M.D. McKee, *Osteopontin*. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 2000. **11**(3): p. 279-303.
35. Icer, M.A. and M. Gezmen-Karadag, *The multiple functions and mechanisms of osteopontin*. *Clinical Biochemistry*, 2018. **59**: p. 17-24.
36. Butler, W.T., *The nature and significance of osteopontin*. *Connect Tissue Res*, 1989. **23**(2-3): p. 123-36.
37. Boyce, B.F., et al., *NF- κ B-Mediated Regulation of Osteoclastogenesis*. *enm*, 2015. **30**(1): p. 35-44.
38. Sandhu, S.K. and G. Hampson, *The pathogenesis, diagnosis, investigation and management of osteoporosis*. *Journal of Clinical Pathology*, 2011. **64**(12): p. 1042-1050.
39. Boyce, B.F. and L. Xing, *The RANKL/RANK/OPG pathway*. *Current Osteoporosis Reports*, 2007. **5**(3): p. 98-104.
40. Simonet, W.S., et al., *Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density*. *Cell*, 1997. **89**(2): p. 309-19.
41. Shiotani, A., et al., *Regulation of osteoclast differentiation and function by receptor activator of NF κ B ligand and osteoprotegerin*. *The Anatomical Record*, 2002. **268**(2): p. 137-146.
42. McLean, R.R., *Proinflammatory cytokines and osteoporosis*. *Current Osteoporosis Reports*, 2009. **7**(4): p. 134-139.
43. Schett, G., *Effects of inflammatory and anti-inflammatory cytokines on the bone*. *European Journal of Clinical Investigation*, 2011. **41**(12): p. 1361-1366.
44. Damoulis, P.D. and P.V. Hauschka, *Nitric Oxide Acts in Conjunction with Proinflammatory Cytokines to Promote Cell Death in Osteoblasts*. *Journal of Bone and Mineral Research*, 1997. **12**(3): p. 412-422.
45. Abbas, S., et al., *Tumor necrosis factor- α inhibits pre-osteoblast differentiation through its type-1 receptor*. *Cytokine*, 2003. **22**(1): p. 33-41.
46. Amarasekara, D.S., et al., *Regulation of Osteoclast Differentiation by Cytokine Networks*. *Immune Netw*, 2018. **18**(1): p. e8.
47. Bendre, M.S., et al., *Interleukin-8 stimulation of osteoclastogenesis and bone resorption is a mechanism for the increased osteolysis of metastatic bone disease*. *Bone*, 2003. **33**(1): p. 28-37.
48. Fong, Y.-C., et al., *Osteoblast-Derived TGF- β 1 Stimulates IL-8 Release Through AP-1 and NF- κ B in Human Cancer Cells*. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2008. **23**(6): p. 961-970.
49. Sigl, V., D. Schramek, and J. Penninger, *RANK und RANKL-Vom Knochen zum Mammakarzinom*. *Journal für Mineralstoffwechsel & Muskuloskelettale Erkrankungen*, 2012. **19**(1): p. 27-32.
50. Kohara, H., et al., *IFN- γ directly inhibits TNF- α -induced osteoclastogenesis in vitro and in vivo and induces apoptosis mediated by Fas/Fas ligand interactions*. *Immunology Letters*, 2011. **137**(1): p. 53-61.

51. Gilbert, L., et al., *Inhibition of Osteoblast Differentiation by Tumor Necrosis Factor- α* . *Endocrinology*, 2000. **141**(11): p. 3956-3964.
52. Kuroki, T., et al., *Effects of cytokines on alkaline phosphatase and osteocalcin production, calcification and calcium release by human osteoblastic cells*. *Br J Rheumatol*, 1994. **33**(3): p. 224-30.
53. Ralston, S.H., et al., *Human osteoblast-like cells produce nitric oxide and express inducible nitric oxide synthase*. *Endocrinology*, 1994. **135**(1): p. 330-336.
54. Rothe, L., et al., *Human Osteoclasts and Osteoclast-Like Cells Synthesize and Release High Basal and Inflammatory Stimulated Levels of the Potent Chemokine Interleukin-8***This work was supported by NIH Grants AR-32087 and DE-06891 (to P.O.) and DK-46773 (to S.G.), and a Mineral Metabolism Fellowship (to Y.C.). *Endocrinology*, 1998. **139**(10): p. 4353-4363.
55. Tang, M., et al., *Interferon-Gamma-Mediated Osteoimmunology*. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 1508.
56. Gimble, J.M., A.J. Katz, and B.A. Bunnell, *Adipose-derived stem cells for regenerative medicine*. *Circ Res*, 2007. **100**(9): p. 1249-60.
57. O'Brien, F.J., *Biomaterials & scaffolds for tissue engineering*. *Materials Today*, 2011. **14**(3): p. 88-95.
58. Vogel, K.G., *Effects of hyaluronidase, trypsin, and EDTA on surface composition and topography during detachment of cells in culture*. *Exp Cell Res*, 1978. **113**(2): p. 345-57.
59. Gregory, C.A., et al., *An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction*. *Anal Biochem*, 2004. **329**(1): p. 77-84.
60. RICH MORAVEC, B. and T. RISS, *THE CELLTITER-BLUE™ CELL VIABILITY ASSAY: MONITORING CELL VIABILITY USING A FLUORESCENT REDOX INDICATOR DYE*. *Cell*, 2003. **12**(5).
61. Hoy, C.A., L.C. Seamer, and R.T. Schimke, *Thermal denaturation of DNA for immunochemical staining of incorporated bromodeoxyuridine (BrdUrd): Critical factors that affect the amount of fluorescence and the shape of BrdUrd/DNA histogram*. *Cytometry*, 1989. **10**(6): p. 718-725.
62. Huang, T., M. Long, and B. Huo, *Competitive Binding to Cuprous Ions of Protein and BCA in the Bicinchoninic Acid Protein Assay*. *Open Biomed Eng J*, 2010. **4**: p. 271-8.
63. Xia, S., et al., *An Update on Inflamm-Aging: Mechanisms, Prevention, and Treatment*. *Journal of Immunology Research*, 2016. **2016**: p. 8426874.
64. Zuk, P.A., et al., *Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies*. *Tissue Eng*, 2001. **7**(2): p. 211-28.
65. De Ugarte, D.A., et al., *Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow*. *Cells Tissues Organs*, 2003. **174**(3): p. 101-9.

66. Rada, T., R.L. Reis, and M.E. Gomes, *Adipose tissue-derived stem cells and their application in bone and cartilage tissue engineering*. Tissue Eng Part B Rev, 2009. **15**(2): p. 113-25.
67. Sterodimas, A., et al., *Tissue engineering with adipose-derived stem cells (ADSCs): Current and future applications*. Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery, 2010. **63**(11): p. 1886-1892.
68. Hess, K., et al., *TNF α promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by triggering the NF- κ B signaling pathway*. Bone, 2009. **45**(2): p. 367-376.
69. Gitelman, H.J., *An improved automated procedure for the determination of calcium in biological specimens*. Analytical Biochemistry, 1967. **18**(3): p. 521-531.
70. Wang, H., et al., *IL-1 β promotes osteogenic differentiation of mouse bone marrow mesenchymal stem cells via the BMP/Smad pathway within a certain concentration range*. Exp Ther Med, 2020. **20**(4): p. 3001-3008.
71. Mo, Q., et al., *Regulation of osteogenic differentiation by the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α : current conclusions and controversies*. Human Cell, 2022. **35**(4): p. 957-971.
72. Vater, C., P. Kasten, and M. Stiehler, *Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells*. Acta Biomaterialia, 2011. **7**(2): p. 463-477.
73. Nishimura, I., et al., *Effect of osteogenic differentiation medium on proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells in three-dimensional culture with radial flow bioreactor*. Regenerative Therapy, 2015. **2**: p. 24-31.
74. Canalis, E., *Effects of tumor necrosis factor on bone formation in vitro*. Endocrinology, 1987. **121**(5): p. 1596-604.
75. Matsumura, E., et al., *Pretreatment with IL-1 β enhances proliferation and chondrogenic potential of synovium-derived mesenchymal stem cells*. Cytotherapy, 2017. **19**(2): p. 181-193.
76. Mohammadpour, H., et al., *Increasing proliferation of murine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells by TNF- α plus IFN- γ* . Immunopharmacology and Immunotoxicology, 2016. **38**(2): p. 68-76.
77. Xu, J., et al., *The effect of cytokines on osteoblasts and osteoclasts in bone remodeling in osteoporosis: a review*. Front Immunol, 2023. **14**: p. 1222129.
78. Gao, Y., et al., *IFN-gamma stimulates osteoclast formation and bone loss in vivo via antigen-driven T cell activation*. J Clin Invest, 2007. **117**(1): p. 122-32.
79. Li, S., G. Liu, and S. Hu, *Osteoporosis: interferon-gamma-mediated bone remodeling in osteoimmunology*. Front Immunol, 2024. **15**: p. 1396122.
80. Wang, Z., et al., *The positive effects of secreting cytokines IL-17 and IFN- γ on the early-stage differentiation and negative effects on the calcification of primary osteoblasts in vitro*. International Immunopharmacology, 2018. **57**: p. 1-10.

81. Lai, J.-H., et al., *Interferon-gamma regulates the levels of bone formation effectors in a stage-dependent manner*. *Molecular Biology Reports*, 2022. **49**(12): p. 12007-12015.
82. Vigo, T., et al., *IFN- γ ; orchestrates mesenchymal stem cell plasticity through the signal transducer and activator of transcription 1 and 3 and mammalian target of rapamycin pathways*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2017. **139**(5): p. 1667-1676.
83. Arakil, N., et al., *Intersecting Paths: Unraveling the Complex Journey of Cancer to Bone Metastasis*. *Biomedicines*, 2024. **12**: p. 1075.
84. Hughes, F.J. and G.L. Howells, *Interleukin-6 inhibits bone formation in vitro*. *Bone and Mineral*, 1993. **21**(1): p. 21-28.
85. Wu, Q., et al., *IL-6 Enhances Osteocyte-Mediated Osteoclastogenesis by Promoting JAK2 and RANKL Activity In Vitro*. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2017. **41**(4): p. 1360-1369.
86. Li, Y., et al., *IL-6 receptor expression and IL-6 effects change during osteoblast differentiation*. *Cytokine*, 2008. **43**(2): p. 165-173.
87. Youngs, S.J., et al., *Chemokines induce migrational responses in human breast carcinoma cell lines*. *Int J Cancer*, 1997. **71**(2): p. 257-66.
88. Mukaida, N., A. Harada, and K. Matsushima, *Interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemoattractant and activating factor (MCAF/MCP-1), chemokines essentially involved in inflammatory and immune reactions*. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 1998. **9**(1): p. 9-23.
89. De Larco, J.E., B.R.K. Wurtz, and L.T. Furcht, *The Potential Role of Neutrophils in Promoting the Metastatic Phenotype of Tumors Releasing Interleukin-8*. *Clinical Cancer Research*, 2004. **10**(15): p. 4895-4900.
90. Schneider, C., et al., *The impact of photobiomodulation on the chondrogenic potential of adipose-derived stromal/stem cells*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2021. **221**: p. 112243.
91. Tencerova, M., et al., *Molecular differences of adipose-derived mesenchymal stem cells between non-responders and responders in treatment of transphincteric perianal fistulas*. *Stem Cell Research & Therapy*, 2021. **12**(1): p. 586.
92. Arzi, B., et al., *A multicenter experience using adipose-derived mesenchymal stem cell therapy for cats with chronic, non-responsive gingivostomatitis*. *Stem Cell Research & Therapy*, 2020. **11**(1): p. 115.
93. Sahlender, B., J. Windolf, and C.V. Suschek, *Superoxide dismutase and catalase significantly improve the osteogenic differentiation potential of osteogenetically compromised human adipose tissue-derived stromal cells in vitro*. *Stem Cell Research*, 2022. **60**: p. 102708.
94. Croes, M., et al., *Proinflammatory Mediators Enhance the Osteogenesis of Human Mesenchymal Stem Cells after Lineage Commitment*. *PLOS ONE*, 2015. **10**(7): p. e0132781.

95. Hutton, D.L., et al., *Tumor Necrosis Factor Improves Vascularization in Osteogenic Grafts Engineered with Human Adipose-Derived Stem/Stromal Cells*. PLOS ONE, 2014. **9**(9): p. e107199.
96. Lacey, D.C., et al., *Proinflammatory cytokines inhibit osteogenic differentiation from stem cells: implications for bone repair during inflammation*. Osteoarthritis and Cartilage, 2009. **17**(6): p. 735-742.
97. Grottkau, B.E. and Y. Lin, *Osteogenesis of Adipose-Derived Stem Cells*. Bone Res, 2013. **1**(2): p. 133-45.
98. Wall, M.E., S.H. Bernacki, and E.G. Lobo, *Effects of serial passaging on the adipogenic and osteogenic differentiation potential of adipose-derived human mesenchymal stem cells*. Tissue Eng, 2007. **13**(6): p. 1291-8.
99. Langenbach, F. and J. Handschel, *Effects of dexamethasone, ascorbic acid and β -glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro*. Stem Cell Research & Therapy, 2013. **4**(5): p. 117.
100. Zuk, P.A., et al., *Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(12): p. 4279-95.
101. Gimble, J.M. and F. Guilak, *Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential*. Cytotherapy, 2003. **5**(5): p. 362-369.
102. Huang, X., et al., *Physical Stimulations for Bone and Cartilage Regeneration*. Regenerative Engineering and Translational Medicine, 2018. **4**(4): p. 216-237.
103. Wang, Y.-K. and C.S. Chen, *Cell adhesion and mechanical stimulation in the regulation of mesenchymal stem cell differentiation*. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2013. **17**(7): p. 823-832.
104. Meier, E. and M. Lam, *Role of Mechanical Stimulation in Stem Cell Differentiation*. Biotechnology and Bioengineering, 2016. **3**: p. 1069.
105. Kim, K.-I., S. Park, and G.-I. Im, *Osteogenic differentiation and angiogenesis with cocultured adipose-derived stromal cells and bone marrow stromal cells*. Biomaterials, 2014. **35**(17): p. 4792-4804.

6. Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Differenzierung von MSCs	4
Abb. 2 Regulation der Osteoklastengnese	9
Abb. 3 Isolation von ASCs aus Fettlappen.	30
Abb. 4 Versuchsaufbau der osteogenen Differenzierung je Zytokin.	37
Abb. 5 Wachstumskinetik im zeitlichen Verlauf mittels CTB, Pool 1 + DMEM. .	49
Abb. 6 Alizarin-Rot-Färbung Tag 14, OM + TNF α , IFN γ und IL-6.	51
Abb. 7 Alizarin-Rot-Färbung nach 21 Tagen OM + TNF α	53
Abb. 8 Alizarin-Rot-Färbung ASC KON = OM ohne Zytokin, Tag 21, 5-fache Vergrößerung.	54
Abb. 9 Alizarin-Rot-Färbung ASC OM + 250 U/ml TNF α , Tag 21, 5-fache Vergrößerung.	54
Abb. 10 Alizarin-Rot-Färbung ASC OM + 100 U/ml TNF α , Tag 21, 5-fache Vergrößerung.	55
Abb. 11 Alizarin-Rot-Färbung ASC OM + 50 U/ml TNF α , Tag 21, 5-fache Vergrößerung.	55
Abb. 12 Alizarin-Rot-Färbung ASC OM + 20 U/ml TNF α , Tag 21, 5-fache Vergrößerung.	56
Abb. 13 Alizarin-Rot-Färbung ASC OM + 10 U/ml TNF α , Tag 21, 5-fache Vergrößerung.	56
Abb. 14 Alizarin-Rot-Färbung ASC OM + 5 U/ml TNF α , Tag 21, 5-fache Vergrößerung.	57
Abb. 15 Alizarin-Rot-Färbung ASC OM + 2,5 U/ml TNF α , Tag 21, 5-fache Vergrößerung.	57
Abb. 16 A-E Einfluss von proinflammatorischen Zytokinen auf die osteogene Differenzierung.	59

Abb. 17 A & B Osteogene Differenzierung Responder vs. Non-Responder	63
Abb. 18 Alizarin-Rot-Färbung eines Spenders nach 21 Tagen OM + Zytokine.	65
Abb. 19 Einfluss von proinflammatorischen Zytokinen auf die osteogene Differenzierung von Respondern	66
Abb. 20 Relative Zellproliferation unter dem Einfluss von proinflammatorischen Zytokinen	68
Abb. 21 Absolute Zellzahl der ASCs über 3 Wochen osteogener Differenzierung unter Zytokinen	69
Abb. 22 Expression der Alkalischen Phosphatase	71
Abb. 23 Western Blot.....	73
Abb. 24 Western Blot - Alkalische Phosphatase	74
Abb. 25 Western Blot - BMP-2	75
Abb. 26 Western Blot - Osteocalcin.....	76
Abb. 27 Western Blot - Osteopontin	77
Abb. 28 Western Blot - RUNX2	78

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Markerproteine der Osteogenese	7
Tabelle 2: Verwendete Geräte mit Herstellerangaben	17
Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangaben	20
Tabelle 4: Verwendete Substanzen mit Herstellerangaben	23
Tabelle 5: Verwendete Kits mit Herstellerangaben	24
Tabelle 6: Verwendete Zytokine mit Herstellerangaben	24
Tabelle 7: Verwendete Primärantikörper mit Herstellerangaben und Verdünnung	25
Tabelle 8: Verwendete Sekundärantikörper mit Herstellerangaben und Verdünnung	26
Tabelle 9: Verwendete Medien, Puffer und Lösungen mit Zusammensetzung ..	28
Tabelle 10: Verwendete Software	29
Tabelle 11: Volumen je Kulturgefäß bei adhärennten Zellen	32
Tabelle 12: Auflistung der ASC-Pools	36
Tabelle 13: BSA-Standard-Verdünnung (Proteinbestimmung).....	44
Tabelle 14: Gele und Menge von Laemml-Puffer + β -Mercaptoethanol.....	46

Danksagung

Am Ende dieser Reise, die von wissenschaftlicher Neugier, Herausforderungen und Wachstum geprägt war, möchte ich den Menschen danken, die mich auf diesem Weg begleitet und unterstützt haben.

Zu Beginn möchte ich der Stiftung Jürgen Manchot danken, die mich mit einem Stipendium großzügig unterstützt haben und mir so die Durchführung dieser Arbeit erleichtert haben.

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater, Prof. Dr. C. S. Suschek, für seine fachliche Begleitung, seine unermüdliche Unterstützung und seine stets offene Tür. Seine Expertise und seine Art haben mich während dieser Zeit stets motiviert und inspiriert. Ohne seine Begleitung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Ebenfalls danke ich meinem Co-Betreuer PD Dr. C. Mahotka für seine Unterstützung.

Vielen Dank an das großartige Team des Labors, das mich nicht nur wissenschaftlich, sondern auch menschlich begleitet hat. Danke an Samira Seghrouchni, meine „Labor-mama“, die mit Rat und Tat immer an meiner Seite stand, sowie an Jutta Schneider, Christa Wilkens-Roth und Juliana Franziska Bousch, deren Unterstützung und Freundlichkeit diese Zeit bereichert haben.

Ein besonderer Dank geht an Sina Solhdjou, der mir in schwierigen Zeiten Liebe, Kraft und Zuversicht geschenkt hat.

Herzliches Dankeschön an Astrid Göldner, mit der ich viele freie Tage und Wochenenden in die Fertigstellung unserer Dissertationen investiert habe, sowie an all meine Freunde, die mich während dieser Zeit begleitet haben.

Ich möchte mich bei meiner Hündin Melek bedanken, die mich 15 Jahre lang treu begleitet hat und nun im Himmel ist. Die Erinnerung an sie hat mir oft Kraft gegeben und mir gezeigt, wie wichtig bedingungslose Liebe und Treue sind.

Dankeschön an meine Schwester Serihan für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Zuletzt gilt mein tiefer Dank meinen Eltern, Dönsel und Halil Kula, die immer an mich geglaubt und mir den Rücken gestärkt haben.