Die Wirkung von Katalase auf das osteogene und chondrogene Potential von adipogenen Stammzellen und dedifferenzierten Adipozyten

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Anne Wiebke Bollmann

aus Düsseldorf

Düsseldorf, Dezember 2025

aus dem Institut für Unfall- und Handchirurgie,

Medizinische Fakultät und Universitätsklinikum Düsseldorf

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichterstatter:

1. Prof. Dr. rer. nat. Christoph V. Suschek

2. Prof. Dr. rer. nat. Henrike Heise

Tag der mündlichen Prüfung: 03.09.2026

Zusammenfassung

Aus Fettgewebe gewonnene adipogene Stroma-/Stammzellen (ASCs) spielen eine wichtige Rolle bei verschiedenen therapeutischen Ansätzen zur Knochen und Knorpelregeneration. Es kommt jedoch immer wieder vor, dass diese ASCs z.B. ein beeinträchtigtes osteogenes Differenzierungspotential (ODP) besitzen. Das Fettgewebe ist auch die Quelle eines anderen Zelltypen mit Stammzelleigenschaften, den aus adulten Adipozyten hergestellten dedifferenzierten Fettzellen (DFATs).

In dieser Arbeit wurden zum ersten Mal die ODPs von ASCs und DFATs aus der gleichen Fettgewebeprobe verglichen. Außerdem wird die Rolle von oxidativem Stress durch H_2O_2 und der antioxidativen Katalase auf Osteo- und Chondrogenese untersucht.

Methoden

Das osteogene Potenzial von ASCs und DFATs wurde *in vitro* verglichen. Über einen osteogenen Induktionszeitraum von bis zu 14 Tagen wurde unter anderem die Kalzifizierung der Extrazellulären Matrix, die Zellvitalität, Proteinexpression, mitochondriale Polarisation und Atmung betrachtet. H_2O_2 wurde verwendet, um oxidativen Stress auszulösen, und Katalase wurde als antioxidativer Gegenspieler eingesetzt. Des Weiteren wurde der Einfluss von Katalase auf die Chondrogenese über einen Zeitraum von 24 Tagen untersucht. Hier wurden der Proteoglycan-Gehalt der gebildeten extrazellulären Matrix sowie andere knorpelspezifische Proteine untersucht.

Ergebnisse

Die Ergebnisse zeigen, dass ODPs von ASCs und DFATs des gleichen Spenders Ähnlichkeiten aufweisen. Dafür unterscheiden sich die ODPs zwischen den Spendern, mit bis zu einem Faktor von 20, extrem stark. Eine Zugabe von H_2O_2 hemmte die Osteogenese. Unabhängig vom individuellen ODP führte die Zugabe von exogener Katalase zu einem ca. 2,5-fachen Anstieg der Osteogenese in den ASC- und DFAT-Kulturen. Der Einfluss von exogen applizierter Katalase führt zu einem Verlust von H_2O_2 im extra- und interzellulären Raum. Ein Effekt der sich bis in die Mitochondrien nachverfolgen lässt. Die Expression der H_2O_2 produzierenden mitochondrialen Superoxid-Dismutase (MnSOD) erhöhte sich signifikant und die Menge an Cytochrom c der Atmungskette verringerte sich. Außerdem nahm die Expression des Uncoupling Protein 1 (UCP1) ab. Der Einfluss von Katalase ließ sich mit dem Zusatz von L-Lactat inhibieren. Dieses erhöhte die mitochondriale Polarisation, welche durch eine gesteigerte Expression von UCP1 begleitet wurde. Diese Ergebnisse führen zur Vermutung, dass die Polarisation der Mitochondrien bei der Osteogenese eine wichtige Rolle spielt. Anschließende Versuche zur mitochondrialen Polarisation und Atmung untermauerten dies.

Auch auf die Chondrogenese hatte Katalase einen signifikanten positiven Effekt. Der Hauptwachstumsfaktor SOX9 wurde stark im Nucleus lokalisiert und Knorpel-typische Proteoglycane wurden durch Katalase um den Faktor 5 verstärkt gebildet.

Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse zeigen, dass DFATs ähnlich stark differenzieren wie ASCs und daher eine sehr attraktive und leicht zugängliche Quelle multipotenter Stammzellen für autologe Knochenregenerationstherapien sein könnten.

Zudem ist Katalase *in vitro* ein starker pro-osteogener und pro-chondrogener Induktor. Eine Erkenntnis, die für neue innovative Einsatzmöglichkeiten bei der Knochen- und Knorpelregeneration spricht.

Summary

Adipose tissue-derived adipogenic stromal/stem cells (ASCs) play an important role in various therapeutic approaches in bone and cartilage regeneration. However, it becomes problematic when these ASCs exhibit dysfunction, such as impaired osteogenic differentiation potential (ODP). Adipose tissue is also the source of another cell type with stem cell properties, adult adipocyte-derived dedifferentiated adipocytes (DFATs).

In this work, the ODP of ASCs and DFATs from the same adipose tissue sample are compared for the first time. In addition, the role of oxidative stress through H_2O_2 and the antioxidant catalase on osteo- and chondrogenesis is examined. Oxidative stress may play an important role in the cells impaired differentiation.

Methods

The osteogenic potential of ASCs and DFATs was compared *in vitro*. Calcification of extracellular matrix, cell vitality, protein expression, mitochondrial polarization and respiration were examined over an osteogenic induction period of up to 14 days. H_2O_2 was used to induce oxidative stress and catalase was used as an antioxidant measure. Furthermore, the influence of catalase on chondrogenesis was examined over a period of 24 days. The proteoglycan content and other specific proteins were examined.

Results

The results show that the ODPs of ASCs and DFATs from the same donor are similar. The ODPs differ extremely between donors, up to a factor of 20. Adding H_2O_2 inhibited osteogenesis. Independent of individual ODP, addition of exogenous catalase resulted in a 2.5-fold increase in osteogenesis in the ASCs and DFATs cultures. The influence of exogenously applied catalase leads to a loss of H_2O_2 in the extra- and intercellular space. An effect that can be traced down to the mitochondria. The expression of H_2O_2-producing mitochondrial superoxide dismutase (MnSOD) increased significantly and the amount of cytochrome c of the respiratory chain decreased. In addition, the expression of uncoupling protein 1 (UCP1) was downregulated. The influence of catalase could be inhibited with the addition of lactate. It increased mitochondrial polarization, which was accompanied by increased expression of UCP1. Mitochondria polarization is thought to play an important role in osteogenesis and has been examined by experiments on mitochondrial polarization and respiration.

Catalase also had a clearly positive effect on chondrogenesis. The main growth factor SOX9 was more significantly localized in the nucleus and cartilage-typical proteoglycans were increased by a factor of 5 by catalase.

Conclusions

The results show that DFATs differentiate similarly to ASCs and therefore could be a very attractive and readily available source of multipotent stem cells for bone regeneration therapies.

In addition, catalase is a strong pro-osteogenic and chondrogenic inducer in vitro. A finding that points to new innovative strategies and therapeutic approaches in bone and cartilage regeneration.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen ... *10*

Einleitung ... **11**

Mesenchymale Stammzellen ... 11

Adipogene Stammzellen ... 11

Tissue Engineering und regenerative Medizin ... 12

Fettgewebe ... 14

Weißes Fettgewebe ... *14*

Braunes Fettgewebe ... *14*

Beiges Fettgewebe ... *15*

Zellmorphologie von weißen, braunen und beigen Adipozyten ... *15*

ASCs und DFATs aus dem Fettgewebe ... 17

Knochen ... 19

Knochen-Zelltypen ... *19*

Aufbau des Röhrenknochens ... *21*

Knochenbildung oder Osteogenese ... 23

Desmale Ossifikation ... *23*

Chondrale Ossifikation ... *24*

Appositionelles Knochenwachstum und Knochenumbau ... *25*

Der Knochenbruch ... *25*

Osteoporose ... *26*

Natürliche Heilung von Knochenverletzungen ... *26*

Heilung problematischer Knochenverletzungen ... *27*

Regulation der Osteogenese ... 28

Knorpel ... 30

Knorpelbildung oder Chondrogenese ... 31

Regulation der Chondrogenese ... 32

Heilung von Knorpelverletzungen ... *33*

Oxidativer Stress ... 34

Katalase ... 35

H_2O_2 – Rolle in Zellen ... 37

Fragestellung dieser Doktorarbeit ... 40

Material und Methoden ... **41**

Herkunft des Fettgewebes ... 41

Methoden ... 41

Isolierung von ASCs und adulten Adipozyten aus Liposuktionsfett ... *41*

Generierung von DFATs ... *42*

Einfrieren von ASCs und DFATs - Kryokonservierung ... *43*

Zellkultur ... *44*

Besatz der Well-Platten mit ASCs oder DFATs *45*
Bestimmung der Lebendzellzahl mit CellTiter-Blue® *45*
Osteogene Differenzierung *45*
Beschichtung von Well-Platten mit Gelatine für die Adipogene Differenzierung *46*
Adipogene Differenzierung *46*
Chondrogene Differenzierung *46*
Proteinisolation und Konzentrationsbestimmung *47*
Western Blot *48*
Durchflusszytometrie *53*
Färbung der ASCs und DFATs *53*
Fluoreszenzmikroskopie *55*
Färbung mit Fluoreszenzfarbstoffen *56*
Immunfluoreszenzfärbung *58*
Färbung mit Alizarinrot - Osteogenese *60*
Färbung mit Alcianblau - Chondrogenese *60*
Alkalische Phosphatase Assay *61*
Auswertung mit ImageJ *62*
Messungen mit Agilents Seahorse XF96 Analyzer *65*
Zellkulturmedien und Materialien 69
Ergebnisse **73**
ASCs und DFATs lassen sich aus humanem Fettgewebe gewinnen und kultivieren *73*
ASCs und DFATs lassen sich in Knorpel-, Knochen- und Fettzellen differenzieren und exprimieren typische mesenchymale Stammzell-Marker *75*
Das osteogene Potential von ASCs und DFATs jedes Spenders ist unterschiedlich *77*
Oxidativer Stress durch H_2O_2 als möglicher Grund für die unterschiedliche Performance von Spender Zellen *77*
Der Zusatz von Katalase steigert die Osteogenese von ASCs und DFATs *79*
Katalase erhöht die osteogenen Potentiale aller Spender egal ob von Low- oder High-Respondern *82*
Die Unterschiede zwischen Low- und High-Responder *83*
ASCs expremieren mehr PPARy und FOXO1 als DFATs und H_2O_2 hat Einfluss auf Proteinexpression von MnSOD und OPN *86*
H_2O_2-Zusatz führt zu vermehrter Adipogenese von ASCs unter osteogenen Bedingungen *88*
Durch Wnt-Inhibitor CT-98014 induzierte Adipogenese verringert die Osteogenese der ASCs *89*
Katalase steigert die Zellvitalität während der Osteogenese aber nicht die Zellzahl *91*
Citrat als Substrat des Citrat-Zyklus erhöht weder Zellvitalität noch Osteogenese *93*
Lactat inhibiert Osteogenese und verhindert auch die durch Katalase verstärkt induzierte Osteogenese *94*
Lactat inhibiert Osteogenese und führt zu vermehrter Produktion von Lipidvakuolen *94*
Lactat hat keinen signifikanten Einfluss auf die Zellvitalität- Katalase hingegen schon- die Zellvitalität korreliert nicht mit der Kalzium Akkumulation *95*

Lactat hemmt die Osteogenese und verringert auch die durch Katalase verstärkte Differenzierung *97*

Lactat erhöht das Membranpotential der Mitochondrien von osteogen induzierten ASCs *98*

Katalase verringert Expression von beigen Adipozyten Proteinen und steigert die Expression von osteogenen Markerproteinen sowie MnSOD *100*

Die Mitochondriale Atmung wird durch Katalase-Zusatz verändert, zudem unterscheiden sich ASCs und DFATs deutlich *102*

Katalase und ihre Wirkung auf die Chondrogenese *106*

Chondrogen differenzierende ASCs und Katalase *106*

Beobachtung der Knorpel-typischen Matrixproteine Aggrecan und Collagen II *108*

Der Einfluss von Katalase auf den chondrogenen Wachstumsfaktor SOX9 ..... *109*

Diskussion **111**

ASCs und DFATs und ihr osteogenes Differenzierungspotential *111*

Oxidativer Stress durch H_2O_2 verringert Osteogenese *113*

Antioxidative Katalase verstärkt Osteogenese *113*

Wo wirkt die Katalase? *114*

Lactat als Induktor der beigen Adipogenese und dessen Rolle bei der mitochondrialen Polarisation und Atmung *115*

Katalase als Induktor der Chondrogenese *121*

Gedanken zum therapeutischen Einsatz *122*

Literatur **123**

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Bekannte Differenzierungs- und Transdifferenzierungsmöglichkeiten von ASCs..... 12
Abbildung 2: Möglicher Anwendungs-Zyklus von ASCs beim Tissue Engineering. 13
Abbildung 3: Unterschiede zwischen weißen und braunen Fettzellen. 16
Abbildung 4 Unterschiedlich gebildete Knochen des adulten Menschen..... 24
Abbildung 5 Regulation der Osteogenese von MSC 29
Abbildung 6: Das Vorkommen der drei Knorpelgewebe im Menschen 30
Abbildung 7 Darstellung der Chondrogenese..... 33
Abbildung 8 Vorkommen von Katalase und H2O2 in ASCs..... 37
Abbildung 9 Anregungs- und Emissionsspektrum von Hoechst33342 55
Abbildung 10 Anregungs- und Emissionsspektrum von JC-1..... 58
Abbildung 11: Beispielkurve für den Sauerstoffverbrauch bei der mitochondrialen Atmung..... 66
Abbildung 12 Beispielkurve für die extrazelluläre Ansäuerung bei der Glykolyse..... 67
Abbildung 13 ASCs und DFATs aus der Isolation aus Fettgewebe..... 73
Abbildung 14 Dedifferenzierung von Adipozyten im Zeitverlauf..... 74
Abbildung 15: Drei-Linien-Differenzierungspotenzial von ASCs und DFATs 76
Abbildung 16: Osteogenese von ASCs und DFATs von einem Low- und einem High Responder..... 77
Abbildung 17: Der Einfluss von H_2O_2 auf die Osteogenese..... 78
Abbildung 18 Osteogene Differenzierung über 14 Tage 80
Abbildung 19 Vergleich der Calcium Akkumulation in ASCs und DFATs..... 81
Abbildung 20 Calcium Akkumulation an Tag 7 und 14..... 82
Abbildung 21 Low-Responder..... 84
Abbildung 22 High Responder 85
Abbildung 23 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen an Tag 7 der osteogenen Differenzierung..... 86
Abbildung 24 Western Blots von ASC und DFAT 87
Abbildung 25 Lipidvakuolen in osteogen differenzierten ASCs an Tag 14..... 88
Abbildung 28 Osteogene Differenzierung von ASCs über 14 Tage 92
Abbildung 29 Osteogene Differenzierung von ASCs über 14Tage mit dem Zusatz von Citrat 93
Abbildung 30 Osteogene Differenzierung von ASCs über 7 Tage mit dem Zusatz von L-Lactat..... 94
Abbildung 31 Osteogene Differenzierung von ASCs über 14 Tage zur Überprüfung der stattfindenden Adipogenese 95
Abbildung 32 Celltiterblue-Fluoreszenz als Maß für die Zellvitalität..... 96
Abbildung 33 Calcium Akkumulation in ASCs an Tag 7 und 14 der osteogenen Differenzierung 97
Abbildung 34 JC1-Fluoreszenzfärbung von ASCs nach 2 Tagen (48 h)osteogener Differenzierung 98
Abbildung 35 Auswertung der Durchflusszytometrie der JC1-Fluoreszenzfärbung. 99

Abbildung 36 UCP1 Expression in ASCs an Tag 7 der osteogenen Differenzierung. *100*
Abbildung 37 Western Blot von ASCs an Tag 7 der osteogenen Differenzierung. *101*
Abbildung 38 Glycolyse-Stress Test und Mitochondrien Stress-Test von ASCs und DFATs *103*
Abbildung 39 Glycolyse-Stress Test und Mitochondrien Stress-Test von ASCs mit Lactat. *104*
Abbildung 40 von ASCs und DFATs unter osteogenen Differenzierungsbedingungen. *105*
Abbildung 41 Chondrogene Differenzierung von ASCs an Tag 12 und 24. ..... *106*
Abbildung 42 Chondrogene Differenzierung von ASCs an Tag 12 und 24. ..... *107*
Abbildung 43 Die ASCs wurden über 24 Tage chondrogen differenziert. *108*
Abbildung 44 Die ASCs wurden über 24 Tage chondrogen differenziert. *109*
Abbildung 45 Die ASCs wurden über 8 Tage chondrogen differenziert. . IF-Färbung SOX9.* *110*
Abbildung 46 Vermutete Prozesse auf Mitochondrien-Ebene *118*
Abbildung 47 Abschluss-Grafik *120*
Abbildung 48 mögliche Anwendung von ASCs und DFATs in Kombination mit Katalase im Tissue Engineering *122*

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 unter unseren Labor-Bedingungen gewonnene Zellzahlen aus Fettgewebe *18*
Tabelle 2 Durch H2O2 beeinflusste Transkriptionsfaktoren *39*
Tabelle 3 Besatz der Well-Platten mit Zellen *45*
Tabelle 4 Lösungen für die Proteinisolation *47*
Tabelle 5 Lösungen für Western Blots *49*
Tabelle 6 Sammel- und Trenngel *50*
Tabelle 7 Antikörper für Western Blots *52*
Tabelle 8 Antikörper für Durchflusszytometrie *54*
Tabelle 9 Wellenlängen-Einstellungen des Multilabel Readers *57*
Tabelle 10 Filter-Einstellungen für Fluorophore *58*
Tabelle 11 Fluorophor-gekoppelte Antikörper *59*
Tabelle 12 Bio-Sensor-Cartridge Befüllung *68*
Tabelle 13 Zusammensetzungen der Zellkulturmedien *69*
Tabelle 14 Zusätze zu den Zellkulturmedien *70*
Tabelle 15 Zellkulturmedien *70*
Tabelle 16 Chemikalien *71*
Tabelle 17 Gebrauchsmaterial. *72*
Tabelle 18 Geräte *72*
Tabelle 19 Mittelwerte ± Standardabweichung der Abbildung 19 ..... *82*
Tabelle 20 Alizarinrot Werte für die in Abb. 8 markierten Low- und High-Responder *83*

Abkürzungen

ASCs	Adipogene Stamm-/Stromazellen
DFATs	Dedifferenzierte Adipozyten (Fettzellen)
ODP	Osteogenes Differenzierungs-Potential
Kat	Katalase
Lac	L-Lactat
DMEM	Dulbeccos Modified Eagles Medium
MSC	Mesenchymale Stammzelle
BMSC	Stammzelle des Knochenmarks
ALP	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
NAD	Nicotinamidadenindinucleotid
UCP1	Uncoupling Protein 1
BMI	Body Mass Index
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RUNX2	Runt-related Transkriptionsfaktor 2
OCN	Osteocalcin
OPN	Osteopontin
Cyt c	Cytochrom c
MnSOD	Mitochondriale Superoxid Dismutase
TGF β	Transkriptionsfaktor β
SOX9	SRY-related high-mobility group box
ECAR	Extrazelluläre Versäuerungs-Rate
OCR	Sauerstoff Verbrauchs-Rate

Einleitung

Mesenchymale Stammzellen

Die adulten mesenchymalen Stamm/-Stromazellen oder auch multipotente Stamm- oder Vorläuferzellen (MSCs) besitzen die Fähigkeit, sich selbst zu erneuern und können zudem in verschiedene Zellarten differenzieren. Sie finden sich in vielen post-natalen Organen mesenchymalen Ursprungs, wie z.B. dem Fettgewebe oder dem Knochenmark.

MSCs werden für klinische Anwendungen genutzt und sind auf Grund ihres Potentials, geschädigte Gewebe zu erneuern oder zu ersetzen, Gegenstand der aktuellen Forschung [87].

MSCs, die aus dem Menschen in großen Mengen vor allem aus Knochenmark (*Bone marrow stem cells, BMSC*) und Fettgewebe gewonnen werden, können *in vitro* in viele verschiedene Zellarten differenziert werden.

Dabei werden die gewonnenen Zellen als MSCs definiert, wenn sie sich mindestens in die drei Zellarten Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten differenzieren können [30, 88].

Adipogene Stammzellen

Das Fettgewebe bietet eine besonders ergiebige Quelle für mesenchymale Stammzellen. Die sogenannten multipotenten Stromazellen des Fettgewebes (ASCs, für *adipose-derived stromal/stem cells*) werden hier aus der Stromafraktion von abgesaugtem oder chirurgisch entferntem Fettgewebe isoliert.

Da die Gewinnung von ASCs minimal-invasiv ist und hohe Ausbeuten liefert, besitzen diese Zellen ein großes Potential für regenerative Therapien.

Dabei variiert die quantitative und qualitative ASC-Ausbeute von Spender zu Spender. Auch liefern Fettgewebe verschiedener Körperregionen unterschiedliche viele ASCs. Subkutanes Fett der Bauchregion liefert z.B. die 5 fache Menge an ASCs im Vergleich zu Fett der Hüftregion [48]. ASCs sind plastikadhärente Zellen. Sie exprimieren die Oberflächenmarker CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 und CD166. ASCs besitzen die Fähigkeit sich in mesodermale Adipozyten, Chondrozyten, Osteoblasten, Myozyten und Kardiomyozyten sowie Tenozyten zu differenzieren [88, 97, 100, 106]. Außerdem können sie in ektodermale neuronen-

ähnliche Zellen [40] transdifferenzieren. Die Transdifferenzierung in endodermale Endothelzellen, β-Zellen und Hepatozyten [2, 3, 17] ist ebenfalls möglich.

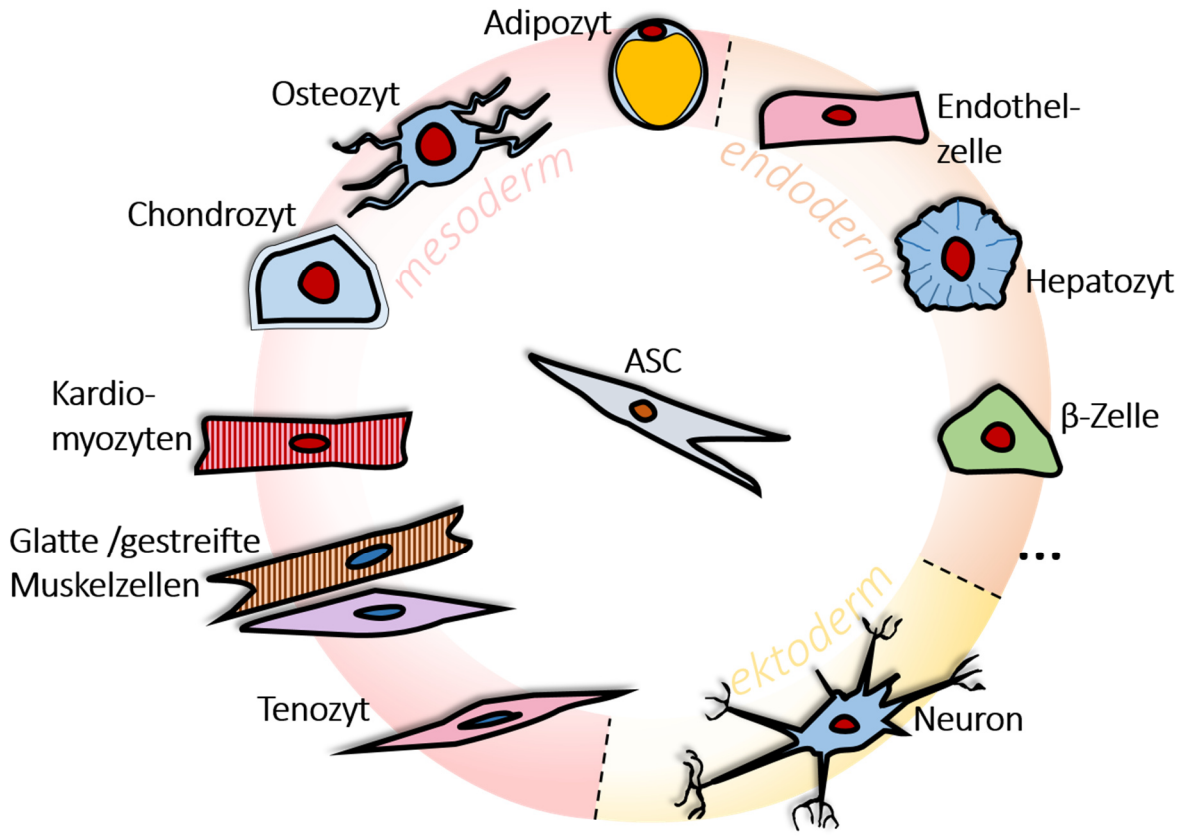


Abbildung 1: Bekannte Differenzierungs- und Transdifferenzierungsmöglichkeiten von ASCs.

Tissue Engineering und regenerative Medizin

MSCs werden schon seit langem in der Therapie von Leukämie verwendet. Seit einigen Jahren besteht zudem die Möglichkeit, embryonale Stammzellen aus der Nabelschnur von Neugeborenen einzufrieren und ihnen so für die Zukunft pluripotente Stammzellen als Notreserve aufzubewahren.

Die Nutzung von embryonalen Stammzellen birgt jedoch das Risiko der Bildung von Tumoren, den Teratomen, da pluripotente Stammzellen unkontrolliert wachsen können. Adulte Stammzellen sind dazu nicht fähig [120].

Adulte Stammzellen werden daher im Tissue Engineering bevorzugt. Dabei wird sich hauptsächlich der MSCs bedient [71].

In den meisten Therapien werden undifferenzierte MSCs genutzt. Häufig wird hierzu zuerst ein Gerüst (*scaffold*) angefertigt, an dem sich die MSCs festsetzen. Dazu gibt es mittlerweile viele klinische Studien um z.B. Knorpeldefekte im Meniskus des Knies zu ersetzen(Gobbi et al. (2014) oder zur Reparatur von Knochendefekten [124].

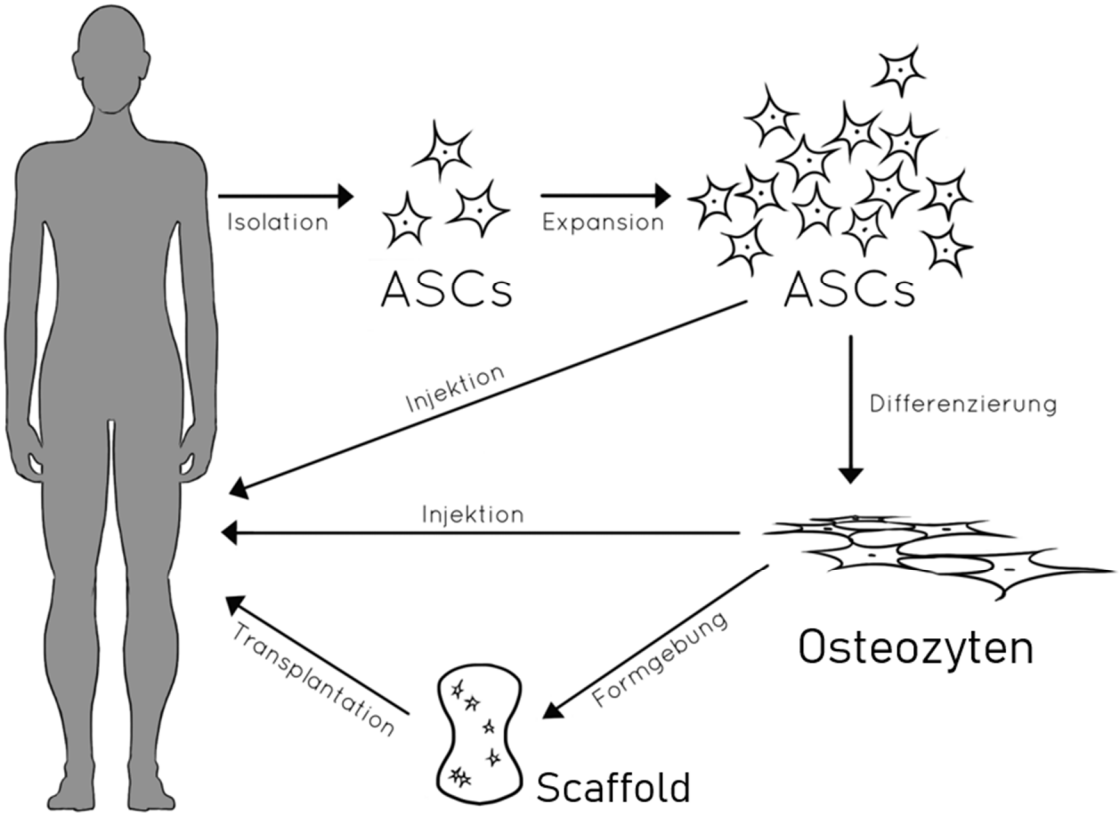


Abbildung 2: Möglicher Anwendungs-Zyklus von ASCs beim Tissue Engineering. Zuerst werden die ASCs aus dem Fettgewebe des Patienten isoliert. Dann wird die ASC-Population expandiert. Anschließend erfolgt die Differenzierung der ASCs z.B. zu Osteozyten. Diese können (genau wie die undifferenzierten ASCs) z.B. in einen Knochendefekt injiziert werden. Die Osteozyten (und Osteoblasten) können allerdings auch auf ein Scaffold (z.B. aus Kollagen) aufgebracht werden. Dieses wird von ihnen besiedelt und kann dann transplantiert werden.

Fettgewebe

Das Fettgewebe ist eine Form des Bindegewebes. Es ist im menschlichen Körper an diversen Stellen zu finden. Es besteht hauptsächlich aus Fettzellen, den sogenannten Adipozyten. Zudem befinden sich auch verschiedene Blutzellen, Mastzellen, Fibroblasten, Perizyten, Endothelzellen und adipogene Stammzellen im Gewebe [32].

Fettgewebe kann in verschiedene Gewebetypen unterteilt werden. Das **gelbe Knochenmark** dient als Energiespeicher für die Zellen des gesamten Knochenmarks. Das **Fettgewebe der Brust** dient dort als Energiespeicher und gibt beim Stillen Energie und Nährstoffe ab. **Mechanisches Fettgewebe** dient der Polsterung von empfindlichen Körperteilen, wie z.B. den Händen. **Braunes Fettgewebe** dient der Wärmeerzeugung an kritischen kälteempfindlichen Stellen des neugeborenen Menschen. Es ist in vielen Säugetieren zu finden und dient beim Winterschlaf der Erhaltung der Körpertemperatur. Braunes Fettgewebe ist bei erwachsenen Menschen wahrscheinlich nicht mehr vorhanden [121]. Das **weiße Fettgewebe** dient dem Menschen als Energiespeicher.

Weißes Fettgewebe

Das weiße Fettgewebe (*white adipose tissue*, WAT) dient der Speicherung von überflüssiger Energie in Form von Triglyzeriden und gehört außerdem zu den endokrinen Organen. Es sekretiert verschiedene Adipozytokine wie Leptin, Adiponektin und Resistin.

Braunes Fettgewebe

Braunes Fettgewebe kann hingegen (*brown adipose tissue*, BAT) Triglyzeride nicht nur speichern, sondern diese bei Bedarf auch wieder verbrennen.

Braune Fettzellen sind zur Thermogenese fähig. Sie besitzen, in Gegensatz zu weißen Fettzellen, eine erhöhte Menge an Mitochondrien. In der inneren Mitochondrienmembran befindet sich das, nur in braunen Fettzellen vorkommende, Transmembranprotein Thermogenin (*uncoupling protein-1,* UCP1). Ist es aktiviert, so unterdrückt es die Oxidative Phosphorylierung, welche die Atmungskette und ATP-Synthase-Komplex aneinander koppelt. Die Energie der Atmungskette wird so direkt als Wärme genutzt, ohne als ATP gespeichert zu werden. Braune Fettzellen exprimieren zudem, anders als weiße Fettzellen, erhöhte Mengen an Proteinen, die bei der Fettsäure-Oxidation eine Rolle spielen [78].

BAT dient der Thermogenese, welche durch Kälteexposition aktiviert wird. Das sympathische Nervensystem signalisiert dem BAT die Thermogenese zu starten [68].

Beiges Fettgewebe

War man früher noch der Meinung, dass BAT nur bei neugeborenen Menschen zu finden sei, weiß man nun, dass BAT bzw. dem ähnliches, zur Thermogenese fähiges, Fettgewebe auch in Erwachsenen vorkommt [93].

Positronen Emissions Tomographien (PET) von erwachsenen Menschen zeigten, nach Kälteexposition, Lokalisationen von thermogenesefähigem Fettgewebe an Hals, Schlüsselbein, neben der Aorta, an den Wirbeln und über den Nieren [107].

Die Menge dieses Gewebes nimmt mit steigendem Alter und steigender Fettleibigkeit ab. Auch scheint es saisonale Unterschiede zu geben. Saito et al [92] konnte zeigen, dass gerade im Winter, nach Kälteexposition, Thermogenese im Fettgewebe in sechs von acht Testpersonen mittels PET nachzuweisen war. Im Sommer war dies hingegen nur bei zwei von acht Personen zu sehen.

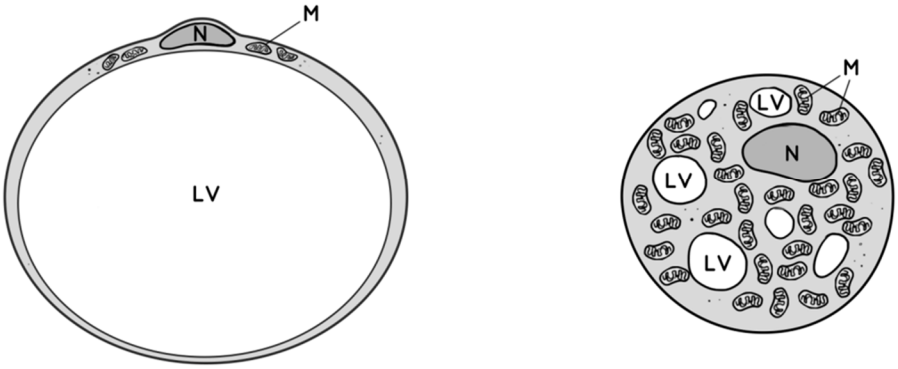
Wu et al. konnte schließlich beweisen, dass dieses Thermogenese-fähige Fettgewebe im Menschen sowie in der Maus kein klassisches BAT ist. Es handelt sich bei dem Gewebe um sogenanntes **beiges Fett**, welches beige Adipozyten enthält[121].

Auch die Ursprünge der Adipozyten der verschiedenen Fettgewebe sind deutlich verschieden. So fand Seale et al. mittels eines Mausmodells heraus, dass BAT aus Myf-5 (*myogenic factor 5*) expremierenden myogenen Vorläuferzellen entsteht. Weiße sowie beige Adipozyten entstehen hingegen aus Myf-5 negativen Adipoblasten und Prädipozyten [95].

Zellmorphologie von weißen, braunen und beigen Adipozyten

Weiße, ausgereifte Adipozyten sind univakuolär und kugelförmig (siehe Abb. 3). Sie besitzen eine einzige große Lipidvakuole, die sämtliche Zellorganellen an den Rand der Zelle verdrängt. Diese Adipozyten können, je nach Menge des vom Körper aufgenommenen Fettes, in ihrer Größe schwanken, erreichen aber bis zu 200µm im Durchschnitt. Braune Adipozyten sind hingegen deutlich kleiner als weiße Adipozyten und plurivakuolär. Sie besitzen viele, kleine Lipidvakuolen. Zudem besitzen sie viele Mitochondrien, die sie zur Thermogenese benötigen. Die große Menge an Mitochondrien im Zytoplasma geben den Zellen auch ihre charakteristische bräunliche Färbung [109].

Beige Adipozyten ähneln optisch braunen Adipozyten, jedoch sind sie meist in Nachbarschaft von weißen Adipozyten zu finden. Diese Zellen unterscheiden sich nur im Expressionsmuster bestimmter Gene von ihren braunen Analoga [121].



Weiße Adipozyten	Braune und beige Adipozyten
Eine bis wenige große Lipidvakuolen weiß-gelbliche, große Zellen <200µm	Viele kleine Lipidvakuolen, viele Mitochondrien bräunliche, kleine Zellen 10-25 µM

Abbildung 3: Unterschiede zwischen weißen und braunen Fettzellen. Der ausgewachsene weiße Adipozyt besitzt eine große Lipidvakuole(LV), die Zellkompartimente wie Mitochondrien (M) und Nucleus (N) an den Rand verdrängt- Der braune Adipozyt besitzt eine Vielzahl kleinerer LV und eine große Zahl Mitochondrien. Die Zelle besitzt eine bräunliche Färbung.

ASCs und DFATs aus dem Fettgewebe

Fettgewebe kann einen großen Teil des menschlichen Körpergewichts ausmachen. Es wird dabei subkutanes Fettgewebe und viszerales Fettgewebe unterschieden. Das viszerale Fettgewebe befindet sich zum einen am Herzen, zum anderen an den Organen des Bauchraums. Das subkutane Fettgewebe liegt hingegen als Schicht unter der Dermis. Es besteht aus Fettzellen die mit Bindegewebe mit der Dermis verbunden sind. Das Gewebe ist vaskularisiert und wird über den Blutkreislauf versorgt.

Durch Liposuktion oder Bauchstraffung kann dieses leicht zugängliche Fettgewebe gewonnen werden. Das gewonnene Gewebe ist ein Gemisch verschiedener Zelltypen mit Fettzellen, den Adipozyten, als größte Zellfraktion (> 90 % des Gesamtvolumens) und verschiedenen Zellen aus Stroma und Gefäßen [24]. Besonders sind hier die ASCs hervorzuheben, die zu den mesenchymalen Stammzellen gehören. Des Weiteren sind auch Perizyten, mikrovaskuläre Endothelzellen und verschiedene Blutzellen enthalten. Durch die Plastik-adhärenz von ASCs können diese von nicht adhärenten Zellen, wie den Blutzellen, getrennt werden [32].

Geringe Mengen Perizyten und Endothelzellen können jedoch weiterhin in der ASC-Fraktion zu finden sein. DFATs hingegen sind durch ihre Vorläufer, die adulten Adipozyten, eine weitaus reinere Zellpopulation.

Die relative Reinheit dieser Zellfraktion wird von mehreren Veröffentlichungen [70, 108] belegt. Jedoch gibt es auch kritische Stimmen, die argumentieren, dass Zellen wie Perizyten oder Makrophagen auf den Adipozyten sitzen und mit ihnen bei der Ceiling-Culture (siehe Methoden) an die Oberfläche der Flasche schwimmen und dort festwachsen können [98].

Die klassische Lösung aus Fettgewebe MSCs zu gewinnen, fokussiert sich auf ASCs, die im Stroma zu finden sind. Aus 100 Gramm Fettgewebe lassen sich unter unseren Konditionen um die **10 bis 20 Millionen ASCs** nach ca. 7 Tagen Zellkultur gewinnen (siehe Tab.1). Direkt nach der Isolation sind zwar deutlich mehr Zellen zu zählen (>50 Millionen), jedoch wächst von diesen nur ein Teil am Boden der Zellkultur-Flaschen an. Die DFATs, die aus den Adipozyten mittels Dedifferenzierung gewonnen werden, bedürfen einer längeren Kulturzeit von ca. 14-17 Tagen (hierbei ist jedoch anzumerken, dass die Kulturbedingungen dieser Zellen durch andere Zellkulturgefäße optimiert werden könnten, wodurch eine schnellere und höhere Ausbeute an DFATs möglich wäre). Die Ausbeute aus 100 g Fettgewebe läge unter unseren Bedingungen bei **67 bis 100 Millionen DFATs**. Wobei aktuell lediglich aus 15g Fettgewebe DFATs

hergestellt werden, da der Dedifferenzierungsprozess mit ganz gefüllten T25 Kulturflaschen viel Medium bedarf. Nach ca. 14-17 Tagen wachsen so ca. **10-15 Millionen DFATs** heran. Die Gewinnung von DFATs verspricht somit eine deutlich höhere Zellausbeute, im Vergleich zu ASCs, ist aber zeitaufwändiger und mit den jetzigen Kulturflaschen materialaufwendig und somit teurer.

Fettgewebe (g)	**15 g**	**100 g**	**15 g**	**100 g**
	ASC	**ASC**	**DFATs**	**DFATs**
Kulturzeit	7 Tage	7 Tage	14-17 Tage	14-17 Tage
verbrauchte Kulturflaschen	2 x T75	3 x T175	3 x T25 , 2 x T175	20 x T25 , 13 x T175
verbrauchtes Medium	60 ml	225 ml	300 ml	1975 ml
Ausbeute (Zellzahl)	1.5-3 x10^6	10-20 x10^6	10-15 x10^6	67-100 x10^6
ungf. Kosten für Material+ Medium	6 €	20 €	23 €	150 €

Tabelle 1 unter unseren Labor-Bedingungen gewonnene Zellzahlen aus Fettgewebe

Knochen

Knochen ist ein festes, mineralisiertes Bindegewebe, aus dem das Skelett besteht. Das Skelett stützt den Körper und schützt Organe. Allerdings ist Knochen keineswegs ein reines Stützgewebe. Durch ständige Resorption und Neubildung (Knochenumbau) ist Knochen ein dynamisches Gewebe und hat auf diese Weise auch Funktion in der Calcium- und Phosphat Homöostase (Calcium- und Phosphat-Haushalt).

Es werden verschiedene Knochengewebe unterschieden:

Die Zellen und Kollagenfasern von **Geflechtknochen** sind ungeordnet und die EZM weniger mineralisiert und dadurch das Gewebe flexibler. Dieses Gewebe entsteht bei der Osteogenese und der Heilung von Knochenfrakturen und ist reich an Knochenzellen. Er wird im späteren Verlauf zum geordneten Lamellenknochen umgebaut. Im adulten Menschen kommt Geflechtknochen dauerhaft nur in Bereichen der Schädelknochen, des Kiefers und der Schlüsselbeine vor.

Die Kollagenfasern der EZM von **Lamellenknochen** sind geordnet und bilden Lamellen, die für erhöhte Stabilität sorgen. Die Matrix ist stärker mineralisiert und die Knochenzellen sind ihrer Funktion entsprechend angeordnet. Der Lamellenknochen ist deutlich stabiler und weist eine komplexe Struktur auf. Sämtliche Röhrenknochen sowie die meisten anderen Knochen des Körpers gehören in diese Kategorie.

Die Knochengewebe sind aus mineralisierter Knochenmatrix und 4 Zelltypen aufgebaut. Den Osteoblasten, Osteozyten, Saumzellen und Osteoklasten.

Knochen-Zelltypen

Osteoblasten

Osteoblasten sind Zellen mit aktivem Stoffwechsel. Sie bilden eine epithel-artige Schicht an der Knochenoberfläche und stehen untereinander mit Gap- und Tight-Junctions in Verbindung [12]. Sie sind maßgeblich an der Synthese von noch nicht mineralisierter Knochenmatrix (Osteoid) beteiligt. Sie sezernieren viele Proteine und können zudem in Osteozyten und Saumzellen differenzieren (siehe auch Osteogenese) [35].

Saumzellen

Als Saumzellen werden MSCs, Osteoprogenitorzellen und Osteoblasten bezeichnet, die sich nicht zu Osteozyten differenziert haben, oder apoptotisch wurden. Sie bilden eine dünne Epithel-Schicht um die Knochenoberfläche. Diese Schicht gehört zum Periost und Endost. Sie sind mit den Osteozyten des Knochens über Gap-Junctions verbunden. Saumzellen können Hämatopoetische Stammzellen verankern und spielen so eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Osteoklasten [57].

Osteozyten

Osteozyten stammen von Osteoblasten ab und liegen in Lakunen innerhalb der mineralisierten Knochenmatrix. Sie machen über 95% der Knochenzellen aus und ähneln in ihrem Aussehen Dendritischen Zellen, mit ihren langen Ausläufern. Diese verlaufen in dünnen Kanälen (Canaliculi) durch die Matrix, verbinden Osteozyten miteinander, haben über Gap-Junctions Kontakt mit Osteoblasten und stehen über die Havers-Kanäle mit Blutgefäßen über Gap-Junctions in Verbindung. Auf diese Weise werden sie osmotisch mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt. Osteozyten spielen Schlüsselrollen in der Regulation der Knochen- und Mineral-Homöostase. Sie besitzen die Fähigkeit mechanische Belastungen des Skeletts wahrzunehmen und durch Regulation von Osteoblasten und Osteoklasten den Knochen darauf anzupassen [27, 35].

Osteoklasten

Osteoklasten sind Riesenzellen mit bis zu 25 Zellkernen. Es handelt sich um fusionierte Monozyten, die aus den Blutgefäßen ausgewandert sind und sich an der Oberfläche der Knochenmatrix niederlassen, um diese zu resorbieren. Die Zellen bilden Resorptions-Lakunen in der Matrix, in welche sie Enzyme und Protonen abgeben, welche die Matrix auflösen. Frei werdendes Kollagen und Kalziumphosphat wird vom Osteoklast per Endozytose aufgenommen, Kollagen weiter aufgespalten und schließlich in den Blutkreislauf abgegeben [52]. Der Gegenspieler solcher Resorptions-Prozesse ist wiederum die Neubildung von Knochenmatrix durch Osteoblasten. Durch diesen ständigen Knochenumbau kann der Knochen sich ändernden Belastungen anpassen und Verletzungen reparieren.

Aufbau des Röhrenknochens

Der Röhrenknochen besteht aus Lamellenknochengewebe. Er besitzt eine äußere harte Schicht, die Kompakta und eine innere schwammartige und leichtere Schicht, die Spongiosa. Der Knochen ist außen mit dem Periost umhüllt und von innen mit Endost ausgekleidet.

Periost

Die Knochenhaut auf der Außenseite des Knochens ist faserreich (Kollagene) und beherbergt die Saumzellen, die als Schicht an der Oberfläche des Knochens liegen und zur Osteogenese fähig sind. Das Periost ist mittels Sharpey Fasern (Kollagen) der Knochenmatrix mit der Knochenoberfläche verbunden. Das Gewebe ist innerviert und wird von Blutgefäßen durchzogen. Nerven und Blutgefäße reichen nicht nur in das Periost sondern gelangen von dort auch weiter über die so genannten Volkmann Kanäle in den Knochen. Diese senkrecht zum Periost verlaufenden Kanäle sind wiederum mit den waagerecht verlaufenden Havers Kanälen verbunden.

Kompakta

Die äußere Lamellenknochenschicht ist aus Osteonen zusammengesetzt, welche längs des Röhrenknochens verlaufen. Ein Osteon besteht aus 5-20 konzentrisch um eine Röhre (Havers Kanal) verlaufende Schichten von Lamellen. Havers Kanäle sind mit Endost ausgekleidet, enthalten Blutgefäße und manchmal Nerven. Die Osteozyten liegen konzentrisch, an den Lamellen ausgerichtet im Osteon, sind über Canaliculi mit dem Havers Kanal verbunden und werden über diesen mit Nährstoffen versorgt.

Spongiosa

Die innere Schicht besteht aus miteinander in einer schwammartigen Struktur verbundenen Knochenbälkchen (Trabekel), die ebenfalls aus Lamellen bestehen. Spongiosa ist leichter als kompakter Knochen und kleidet den Hohlraum vieler Knochen, wie den Röhrenknochen aus, um diesen erhöhte Stabilität zu verleihen. Die Trabekel sind mit Endost umhüllt und ihre Osteozyten werden überwiegend mittels Diffusion aus Endost und Knochenmark versorgt.

Endost

Die innere Knochenhaut liegt auf den inneren Strukturen des Knochens und reicht auch in die Havers Kanäle. Auch hier sind Saumzellen mit zu finden, die gleiche Funktionen haben, wie im Periost.

Knochenmatrix

Die extrazelluläre Knochenmatrix oder Osteoid besteht aus Proteinen, Mineralien und Wasser. Das am meisten vorhandene Protein ist Kollagen I, welches eng gepackt vor allem in Form von Tropokollagen vorkommt. Diese Fasern haben eine Helix Struktur bestehend aus 3 Kollagen I Peptidketten und können mineralisiert sein [111]. Dies bedeutet, dass in der Helix Hydroxylapatit-Nanokristalle gebunden werden. Diese Calciumphosphate bilden den Hauptanteil der Knochenmasse. Bei der Reifung des Osteoids findet diese Mineralisierung statt und die zuvor Hydrogel-artige Matrix verliert ihr Wasser. Mehrere mineralisierte Tropokollagene bilden Fibrillen. Diese liegen geordnet in den Lamellen der Osteone, wobei die Orientierung der Fibrillen sich von Lamelle zu Lamelle abwechselt, welches zu mehr Stabilität führt [85]. Die Fibrillen sind zudem untereinander über *Crosslinks* verbunden. Als Osteon bezeichnet man den Zusammenschluss von mehreren über Gap-Junctions verbundenen Osteoblasten mit anschließenden Lamellen des Osteoids und Osteozyten, die um einen Havers Kanal liegen. Osteone grenzen sich voneinander durch eine undurchlässige Zementlinie ab [12]. Andere wichtige Proteine wie Glycoproteine geben der Matrix zusätzliche Stabilität. Zudem finden sich auch weitere typische Proteine wie Osteocalcin und Osteopontin in der Knochenmatrix [35]. Zwischen den Kollagenfibrillen finden sich zahlreiche Bindungen, die wie eine Art Kleber fungieren [33].

Knochenmark

Das Knochemark ist ein Binde- und Stammzellgewebe im inneren der meisten Lammellenknochen. Es ist im Hohlraum vieler Röhrenknochen beherbergt und enthält unter anderen hämatopoetische Stammzellen, welche das Blut bilden. Dabei werden rotes und gelbes Knochenmark unterschieden. Das rote Knochenmark dient der Blutbildung und enthält zudem eine Fraktion mesenchymaler Stammzellen. Diese Zellen werden auch als *bone marrow stem cells* (BMSCs) bezeichnet und werden im Tissue Engineering eingesetzt. Mit zunehmendem Alter verringern sich die Mengen von rotem Knochenmark. So ist im adulten Menschen in den Röhrenknochen weniger rotes und immer mehr gelbes Knochenmark oder Fettmark zu finden. Die Farbe dieses Knochenmarks stammt von gelblichen Adipozyten, die Überhand nehmen. Reines Fettmark enthält keine hämatopoetischen Stammzellen mehr. Doch die Adipozyten haben auch wichtige Funktionen in Knochenumbau und Blutbildung und sind somit unabdingbar im Knochenmark [112]. Um rotes Knochenmark für Knochenmarksspenden oder Tissue Engineering zu gewinnen wird deswegen auf platte Lamellenknochen, wie

Beckenknochen oder Brustbein zurückgegriffen, die dieses auch noch mit fortschreitendem Alter enthalten.

Knochenbildung oder Osteogenese

Desmale Ossifikation

Entstehung von Geflechtknochen aus dem mesenchymalen Gewebe im Embryo. Einige mesenchymale Zellen differenzieren zu Osteoblasten und beginnen mit der Produktion von ungeordneten Knochenmatrix-Proteinen. Sie bilden so genannte Ossifikations-Zentren, von denen aus die Knochenbildung ausgeht. Die Matrix wird mineralisiert. Einzelne Osteoblasten werden mit Knochenmatrix umhüllt und differenzieren zu Osteozyten. Die Osteoblasten auf der Oberfläche bilden immer mehr Osteoid. Es lagern sich mehr Osteoblasten an. Es entstehen viele Ausläufer oder Trabekel, die sich um embryonale Blutgefäße legen. Der Raum zwischen den Ossifikations-Zentren füllt sich mit Knochenmatrix. Es bildet sich ein Knochen umhüllendes Periost [37].

Chondrale Ossifikation

Bei der chondralen Ossifikation handelt es sich um die Entstehung von Ersatzknochen durch den Ersatz von Knorpelgewebe, welches als Vorstufe des Knochens dient. Zu Beginn entstehen aus mesenchymalen Zellen des Embryos an den Stellen vieler späterer Knochen, wie z.B. dem Röhrenknochen des Oberarms, Chondrozyten. Diese bilden dann EZM und formen so ein Grundgerüst für den späteren Knochen. Zudem bildet sich um den Knorpel eine Haut oder Perichondrium aus. Die Chondrozyten teilen sich vermehrt und hypertrophieren. Dabei produzieren sie andere Matrixproteine wie CollagenX und Fibronektin. Durch die hohe Dichte dieser Bereiche, sterben die Chondrozyten dort ab. Mit der Folge, dass vom Perichondrium aus der Knorpel mit Blutgefäßen MSCs und Osteoblasten infiltriert wird. Zudem bilden Osteoblasten des Perichondriums nun von außen Knochenmatrix. Dieser Prozess heißt auch perichondrale Ossifikation und das Perichondrium heißt nun Periost. Da die Bildung von Knochenmatrix hier noch ungeordnet erfolgt, gehört diese Knochenbildung noch zur desmalen Ossifikation. Im Bereich des infiltrierten Knorpels, der durch Knochen ersetzt wird, bilden sich zudem Osteoklasten, die allmählich die Substanz im Zusammenspiel mit Osteoblasten mit spongiösem Knochen ersetzen und so das primäre Ossifikations-Zentrum des Knochens bilden.

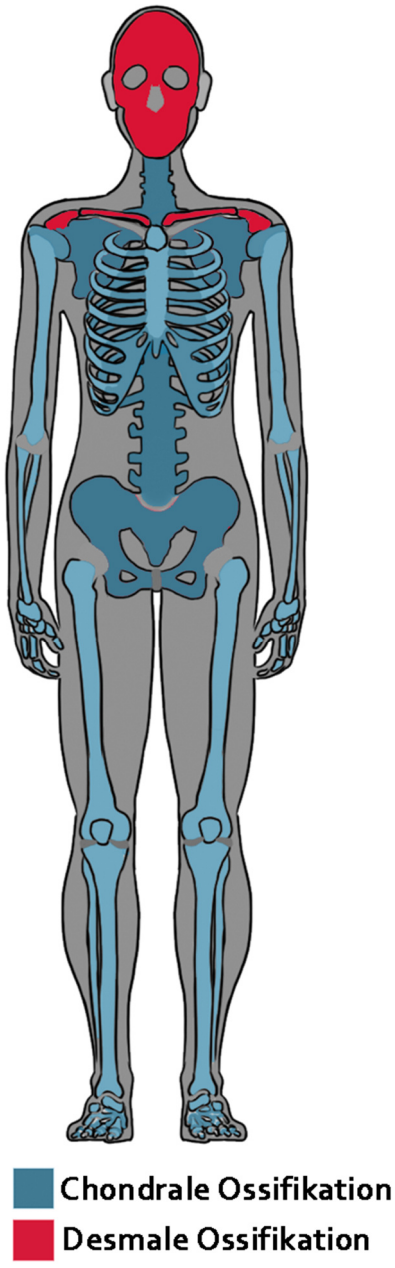


Abbildung 4 Unterschiedlich gebildete Knochen des adulten Menschen

Beim weiteren Wachstum des Knochens verlängert sich nun die Diaphyse des Röhrenknochens. Dabei bildet sich die Knochenmarkshöhle aus, die sich mit Knochenmark füllt. An den beiden Enden (Epiphysen) des Knochens bilden sich sekundäre Ossifikations-Zentren. Zwischen Epiphyse und Diaphyse befindet sich die Metaphyse. Die Epiphyse bildet zur Metaphyse hin eine Wachstumsfuge (Epiphysenfuge) aus Knorpel. Diese garantiert das Längenwachstum des Knochens nach der Geburt. Diese endochondrale Ossifikation findet beim Wachstum des Menschen statt. Dabei geht der Knorpel der Epiphyse in die Wachstumszone über, in der die Chondrozyten des Knorpels proliferieren und sich in Richtung

Diaphyse schieben. Die Chondrozyten liegen dabei Säulen-artig übereinander. Darunter befindet sich dann der Bereich, in dem die Chondrozyten hypertrophieren und darunter beginnen sie zu kalzifizieren. Noch weiter darunter sterben die Chondrozyten ab und die kalzifizierte Knorpelmatrix wird durch einwandernde Osteoklasten und Osteoblasten aus der Diaphyse zu Knochensubstanz umgebaut. Ist die Chondrozyten-Teilungsrate erschöpft, so endet auch das Längenwachstum des Knochens. Die Epiphyse des Knochens besitzt zum Gelenkspalt hin jedoch dauerhaft eine Schicht von Gelenkknorpel [37].

Appositionelles Knochenwachstum und Knochenumbau

Adulter Knochen kann von den Seiten (appositionell) an Dicke zunehmen, wenn er Stressimpulsen ausgesetzt ist. Dazu gehören sportliche Aktivitäten, sowie Gewichtszunahme, die dazu führen, dass durch Knochenumbau vermehrt Knochensubstanz angelagert wird. Durch verringerten Stress auf den Knochen, z.B. durch lange Bettruhe, kann Knochenmasse jedoch auch abgebaut werden [52]. Verschiedene Signale können den Knochenumbau auslösen. Neben mechanischer Beanspruchung bis hin zu Mikrorissen, spielen auch Hormone eine entscheidende Rolle: Das Parathormon, welches bei zu geringem Kalzium-Gehalt im Blut, ausgeschüttet wird, kann Kalzium akut aus dem Knochen mobilisieren. Erhöhte Mengen an Parathormon führen zudem zu erhöhter Produktion von Calcitriol (aktive Form des Vitamin D) in den Nieren. Beide Hormone können Kalzium aus Nieren und Knochen mobilisieren, um die Kalzium-Konzentration im Blut schnell wieder zu erhöhen [9]. Östrogen und Androgen, verringern die Osteoklasten-Anzahl und Aktivität und erhöhen die Lebenszeit von Osteoblasten. Somit erhöhen sie die Knochendichte aber mindern den Knochenumbau. Der Konzentrationsabfall dieser Hormone nach der Menopause bei der Frau oder im fortgeschrittenen Alter im Mann, kann Osteoporose auslösen [1].

Der Knochenbruch

Zwischen den Kollagenfibrillen des Lamellenknochens finden sich zahlreiche Bindungen, die wie eine Art Kleber fungieren. Bei zu starker Krafteinwirkung auf den Knochen sind diese Bindungen, die Ersten, die nachgeben und werden deswegen auch als *sacrificial bonds* bezeichnet [33]. Sie sind einer der Mechanismen, um Brüche im Knochen vorzubeugen. Reicht dies nicht aus, um die ausgeübte Kraft auf den Knochen aufzufangen, finden weitere Mechanismen, wie das Entwickeln von Tropokollagen-Strängen, Fibrillen-Gleiten, Fibrillen-Risse, Mikrorisse bis hin zum Brechen des Knochens statt [129].

Osteoporose

Osteoporose wird durch einen fehlerhaften Knochenumbau, eine daraus resultierende verringerte Knochenmasse und eine Degeneration der Knochenmatrix definiert, was zu fragilen Knochen mit einer höheren Neigung zu Frakturen führt [49]. Allein in der EU sind schätzungsweise 22 Millionen Frauen und 5,5 Millionen Männer von Osteoporose betroffen [45]. Osteoporotische Zustände können in primäre oder sekundäre klassifiziert werden. Der primäre Typ besteht aus Osteoporose Typ I und II. Typ I ist postmenopausal und kann Frauen mit Östrogenmangel betreffen. Es ist gekennzeichnet durch einen erhöhten Knochenumsatz, der mit einer geringeren Knochenmasse verbunden ist [36]. Typ II ist altersbedingt und betrifft sowohl Männer als auch Frauen.

Sekundäre Osteoporose ist das Ergebnis anderer Faktoren wie veränderter körperlicher Aktivität [34] oder von Medikamenten wie Glukokortikoiden, die zu einem raschen Verlust der Knochenmineraldichte führen können [84].

Natürliche Heilung von Knochenverletzungen

Direkte Frakturheilung

Bei geringem Abstand bis zu 1 mm (meistens nur durch Anschrauben durch Metallplatten erreichbar) zwischen den Fraktur-Enden können die Osteoklasten Kanäle von der einen zur anderen Hälfte „bohren“. An diesen entlang bilden sich neue Osteone, welche die Fraktur verschließen.

Indirekte Frakturheilung

Bei breiteren Frakturen entsteht zuerst ein Hämatom, welches zur Bildung von Granulationsgewebe führt. Dann entsteht ein Kallus aus stark Kollagenfaser-haltigem Faserknorpel, welcher hypertrophiert. Nun findet chondrale Ossifikation statt und es entsteht zuerst Geflechtknochen mit ungeordneter Struktur. Dieser baut sich in weiterem Verlauf der Heilung zu geordnetem Lamellenknochen um.

MSCs bei der Frakturheilung

Die genaue Rolle der MSC lässt sich *in vivo* nur schwer nachweisen. Aus dem Fettgewebe gewonnene Perizyten (CD146+) und Adventitiazellen (CD34+) mit MSC-Charakter konnten in

einem Knochenbruch-Mausmodell jedoch nachweislich bei der Osteogenese und Angiogenese beobachtet werden [117].

Heilung problematischer Knochenverletzungen

Die Heilung von Knochendefekten kritischer Größe und von osteoporotischen Knochen ist eine Herausforderung. Entweder ist der Knochendefekt zu groß, um von selbst richtig zu heilen [54, 80], oder andere Faktoren wie Osteoporose behindern eine ausreichende Wiederherstellung des geschädigten Knochens.

Tissue Engineering von Knochen ist ein vielversprechender Ansatz zur Reparatur dieser Defekte [5]. Gegenwärtige Behandlungen verwenden Auto-, Allo- oder Xenotransplantate. Leider besitzen alle diese Transplantate Mängel. Am häufigsten werden Autotransplantate genutzt, welche als einziges lebensfähige Zellen wie Osteoprogenitoren, Osteoblasten, Osteozyten, Osteoklasten und MSCs enthalten und daher osteogen sind. Allo- und Xenotransplantate werden normalerweise stark prozessiert und sind daher zellfrei. Sie werden seltener verwendet, können jedoch sehr nützlich sein, wenn eine bestimmte Transplantatgröße und Form erforderlich ist oder keine Autotransplantate aus dem Patienten gewonnen werden können [82]. Es ist jedoch möglich, diese Zell-freien Transplantate mit autologen MSCs zu besiedeln oder Gerüste aus Biomaterial zu verwenden, die mit MSCs besiedelt sind [89]. Im Allgemeinen werden BMSCs und ASCs für die *in-vitro*- und *in-vivo*-Produktion dieser *de-novo*-Knochentransplantate verwendet [5] [39].

Die Verwendung Patienten-eigener Stammzellen kann jedoch zu unvorhersehbaren Ergebnissen führen. ASCs oder BMSCs besitzen manchmal keine osteogene Kapazität. Verschiedene Faktoren wie Alter, BMI, Geschlecht und Gesundheit sowie Zell-Passage spielen wahrscheinlich eine Rolle bei diesem Phänomen [58, 63, 99, 102, 127]. Wenn die MSCs des Spenders nicht in Knochen differenzieren können, kann auch der reaktive Sauerstoffspezies (ROS) Metabolismus in diesen Zellen verändert sein. Es wird angenommen, dass oxidativer Stress eine Ursache für Defekte in gealterten MSCs und sich selbst erneuernden Osteoprogenitoren ist, und zu Seneszenz führt [51, 104].

Regulation der Osteogenese

Knochen kann durch zwei Wege entstehen. Entweder über die chondrale Ossifikation (siehe Abschnitt zur Chondrogenese) oder über desmale Ossifikation. Bei der Desmalen Ossifikation entstehen aus mesenchymalen Stammzellen im ersten Schritt Osteo-Progenitor-Zellen. Dieser Prozess wird durch die *Bone Morphogenic Proteins* (BMP*), Fibroblast-Growth-Factors* (FGF), sowie über den Wnt-Signalweg initialisiert. BMP2 aktiviert den Haupt-Transkriptionsfaktor der Osteogenese, den *Runt-related Transkriptionfactor-2* (RUNX2). Es wird vermehrte Alkalische Phosphatase (ALP) produziert, welche Phosphate für die Synthese von Calciumphosphat der Knochenmatrix „rekrutiert". Die membranständige ALP dephosphoryliert Proteine und andere Moleküle und stellt so Phosphat für die Synthese des Calciumphosphats zur Verfügung. Das frühe EZM-Protein Kollagen 1a wird ebenfalls vermehrt produziert.

Daraufhin findet nun auch Signalgebung durch TGF-β und Calcium-Mobilisation durch Parathormon (PTH) statt. Die Transkriptionsfaktoren RUNX2 und DLX5 induzieren Osterix (OSX). ATF4 und SATB2 interagieren mit RUNX2 und induzieren die Expression von Osteocalcin (OCN), *Bone Sialoprotein* (BSP) und OSX. Das OSX induziert im weiteren Verlauf die Expression von einigen Osteoblasten Proteinen, wie Kollagen 1a, OCN, Osteopontin (OPN), Osteonectin (ONN) und BSP. Die Signalgebung des PTH wird hingegen über das *cAMP-Responsive Element Binding Protein* (CREB) an den Nucleus vermittelt und erhöht die BMP2 Expression [20].

Die verschiedenenen Signalwege erhöhen die BMP und TGF-β Expression, welche wiederum die Osteogenese der umgebenen Zellen erhöhen.

Die noch organische EZM mit dem Hauptbestandteil Kollagen 1 beginnt zu mineralisieren. Dabei fängt das durch PTH und ALP beschaffte Calcium (Ca^{2+}) und Phosphat (HPO_4^{2-}) an den Kollagen-Fibrillen an zu kristallisieren. Es entsteht Hydroxylapatit ($Ca_5[OH|(PO_4)_3$), welches sich entlang der Fibrillen ausrichtet und den anorganischen Teil der EZM bildet [77].

Durch Einbettung von Osteoblasten in die mineralisierte und an Dicke zunehmende EZM entstehen Osteozyten. Diese stehen mit den Osteoblasten an der Knochenoberfläche durch Canaliculi in Kontakt. Das von ihnen produzierte Sclerostein wird so an die Osteoblasten weitergeleitet und hemmt eine weitere Knochenbildung durch Inhibition des Wnt-Signals [19].

Es sind noch einige weitere Faktoren an der Regulation der Osteogenese beteiligt. Der ständige Knochenumbau wird durch Osteoklasten verursacht, welche u.a. über den Rezeptor activator

of nuclear factor kappa B (RANK) und dessen Liganden RANKL mit Osteoblasten und Osteozyten kommunizieren. So wird präzise der Ab- und Aufbau des Knochens gesteuert.

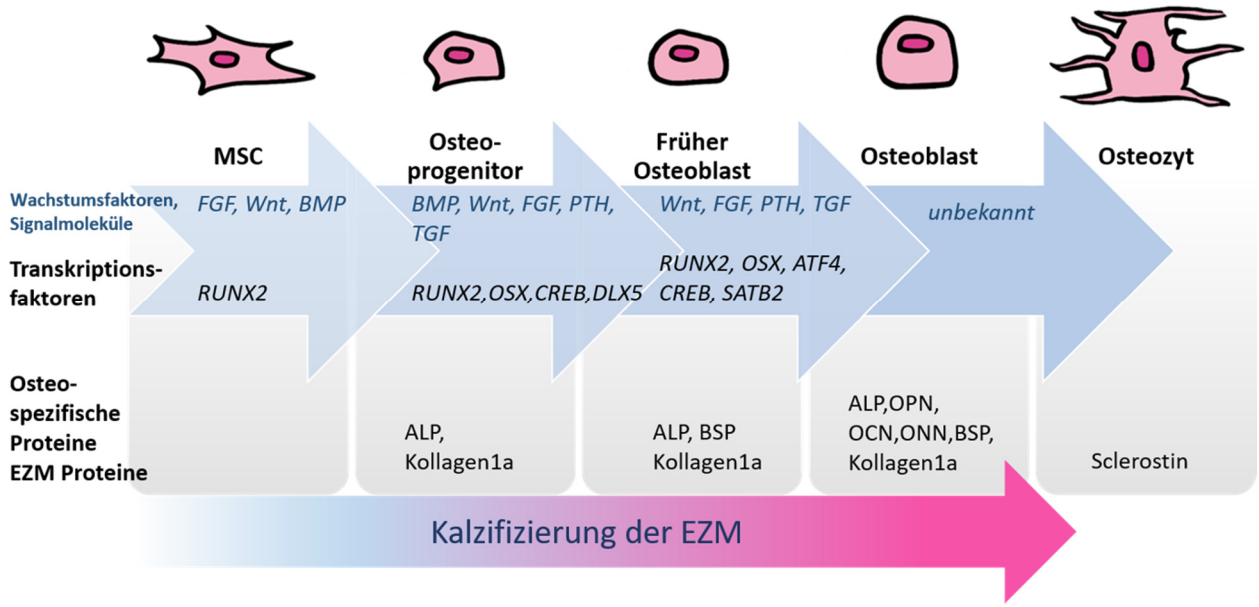


Abbildung 5 Regulation der Osteogenese von MSC mit ihren, in den verschiedenen Stadien exprimierten Proteinen

Knorpel

Knorpel ist ein druckelastisches, zugfestes und gefäßloses Bindegewebe. Es dient als Stützgewebe im Körper. Knorpelgewebe besteht aus ortsfesten Chondroblasten und Chondrozyten, die in einer extrazellulären Matrix eingebettet sind. Diese besteht aus Kollagenfibrillen und Proteoglykanen, die für Elastizität und Stabilität sorgen. Es werden drei Arten des Knorpels unterschieden [94].

Der **hyaline Knorpel** findet sich vor allem als Gelenkknorpel in den Gelenken. Dort ermöglicht er eine reibungsfreie Bewegung der Gelenkflächen, indem er die entstehenden Kräfte gleichmäßig verteilt und zum Teil absorbiert [47]. Zudem ist dieser Knorpel auch an Brustbein und Rippenbögen zu finden. Dort ermöglicht er durch seine Flexibilität die Vergrößerung des Brustkorbs beim Atmen. Der hyaline Knorpel spielt bei der Entwicklung des Knorpelskeletts (chondrale Ossifikation) eine tragende Rolle. Zudem ist er auch an den Wachstumsfugen zu finden (Erlebacher et al. 1995). Außerdem findet sich dieser Knorpel auch in Nase, Larynx, Trachea und Bronchien (Abb.6).

Elastischer Knorpel besitzt im Gegensatz zu hyalinem Knorpel zusätzliche elastische Fasern. Diese erhöhen die Elastizität zusätzlich. Elastischer Knorpel ist vor allem im Ohr und im Kehldeckel zu finden.

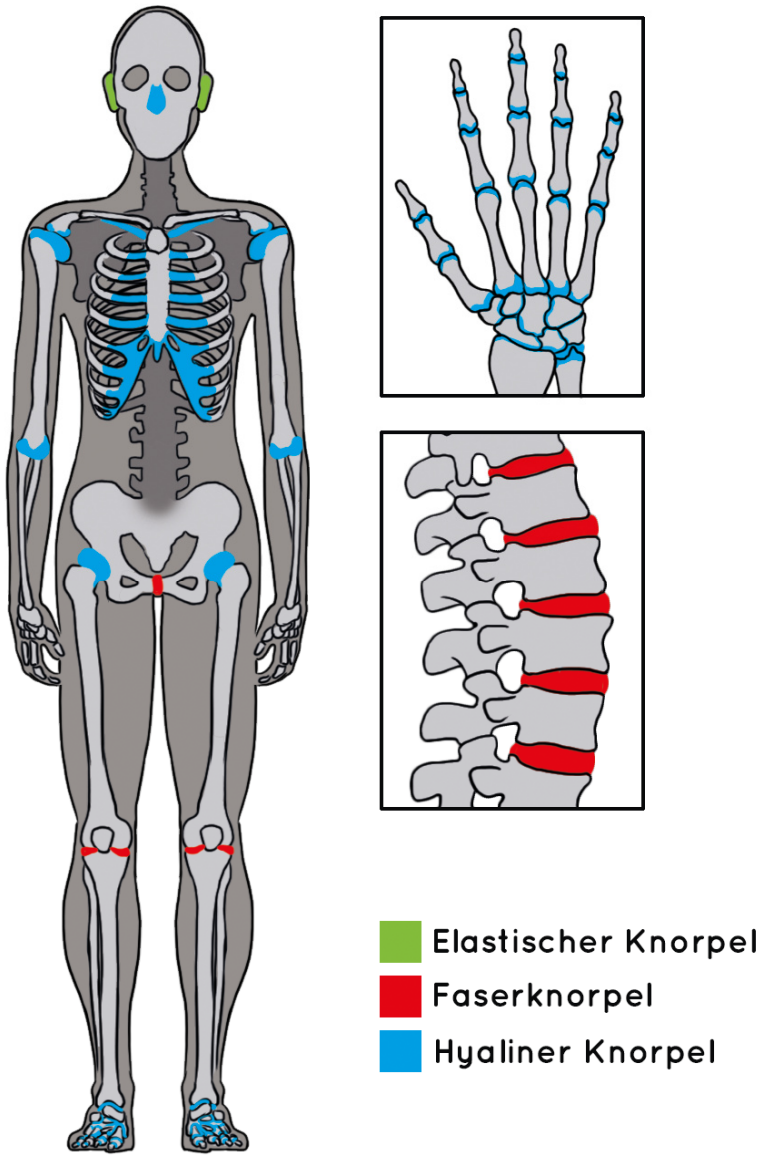


Abbildung 6: Das Vorkommen der drei Knorpelgewebe im Menschen

Faserknorpel ist ein Übergangsgewebe zwischen hyalinem Knorpel und faserreichem Bindegewebe. Es ist z.B. in den Bandscheiben und Menisken zu finden, sowie nahe druckbeanspruchten Sehnen. Kollagenfasern liegen in diesem Knorpel deutlich vermehrt vor.

Hyaliner und elastischer Knorpel besitzen, anders als der Faserknorpel das Perichondrium (Knorpelhaut). Ausgenommen ist hier der hyaline Gelenkknorpel, der kein Perichondrium besitzt. Das Perichondrium dient der Versorgung des Knorpels mit Nährstoffen. Es besitzt Blutgefäße und ist innerviert. Gelenkknorpel wird hingegen durch die Gelenkflüssigkeit des Gelenkspalts versorgt. Das Perichondrium wird in Stratum cellulare und Stratum fibrosum unterteilt. Im Ersteren befinden sich zur Teilung fähige Chondroblasten, die vor allem im jungen Menschen Knorpel regenerieren können. Da das Stratum cellulare im hyalinen Gelenkknorpel fehlt, kann dieser sich auch nicht mehr regeneirieren. Das Stratum fibrosum ist hingegen reich an Kollagen und elastischen Fasern und kann so flexibel Bewegungen des Knorpels mitmachen [94].

Knorpelbildung oder Chondrogenese

Knorpelgewebe ist mesenchymalen Ursprungs. Aus embryonalen Stammzellen entstehen schon im wenige Wochen alten Embryo kondensierte Gruppen von Zellen. Aus diesen Stellen hoher Zelldichte gehen die Knorpel und dann die Knochen hervor. Damit MSCs an diese bestimmten Stellen wandern, werden sie rekrutiert. Dann folgt Migration zu der Stelle und die Kondensation der Zellen (wobei eine Erhöhung der Zellmenge gemeint ist, die nicht durch erhöhte Proliferation, sondern durch Migration entsteht). Es entstehen mesenchymale Chondroprogenitorzellen, die zu Chondroblasten differenzieren. Diese produzieren extrazelluläre Matrix (EZM), die reich an Kollagen Typ-I, Hyaluronan, Tenaskin und Fibronektin ist. Durch diese Matrix trennen sich die Zellen voneinander. Sie differenzieren zu Chondrozyten aus. Dies führt zu einer Änderung der EZM-Zusammensetzung. Chondrozyten produzieren Knorpel-spezifisches Kollagen Typ-II sowie vermehrt Aggrecan, COMP (*cartilage specific oligomeric matrix protein*) und Linker-Protein. Die Expression von Kollagen Typ-1 wird gestoppt.

Die Chondrozyten liegen nun einzeln in der EZM und weisen eine charakteristische runde Form auf. Nach weiterem Wachstum (Hypertrophie) wird vermehrt Kollagen Typ-X exprimiert sowie Kollagenase 3. Die Expression von Kollagen Typ-II wird gestoppt.

Bei der chondralen Ossifikation vaskularisiert der hypertrophe Knorpel und durch nun hineingelangendes Blut werden Osteoblasten aus dem Perichondrium in den Knorpel transportiert. Chondrozyten gehen in Apoptose oder transdifferenzieren zu Osteoblasten. Diese Zellen ersetzen allmählich den Knorpel durch mineralisierten Knochen. Auf diese Weise entstehen die axialen Knochen, die Knochen der Gliedmaßen und das Becken. Die Schädelknochen entstehen hingegen durch intramembrane Ossifikation direkt aus undifferenzierten MSCs.

Es entsteht jedoch auch Knorpel, der nicht hypertrophiert und so auch nicht zu Knochen umgebaut wird. Dieser bleibt auch im adulten Menschen erhalten, wie z.B. als Gelenkknorpel. Die Chondrozyten dieses Knorpels teilen sich nicht mehr und dienen nur noch dem Erhalt des Knorpels. Dieser wird durch Signale wie Wachstumsfaktoren und mechanische Reize durch Gelenkbewegungen gewährleistet [28].

Regulation der Chondrogenese

Die Chondrogenese wird sowohl durch Zell-Zell-Kontakte als auch durch Wachstums- und Transkriptionsfaktoren initiiert.

Kontakte zwischen den MSCs finden durch N-Cadherin und NCAM (*neural cell adhesion molecule*) sowie durch Matrixmoleküle wie Tenascin und Versican statt und sind für die Kondensation der Zellen wichtig [41, 81].

Bei der Anlage der Gliedmaßen wirken verschiedene Zytokine der FGF-Familie (*fibroblast growth factor*). Sie induzieren zum einen die Bildung des AER (*area of specialized epithelium*), der Stelle, an der die Knorpel- bzw. Gliedmaßenbildung erfolgen soll, zum anderen stabilisieren sie auch den Erhalt der AER [114]. Unter der AER liegt die Wachstumszone (*progress zone*). In dieser findet eine Stammzell-typische rapide Proliferation der darin befindlichen mesodermalen Zellen statt (Hypertrophierung). So werden die Knorpelanlagen gebildet. Der transformierende Wachstumsfaktor TGF-β (*transforming growth factor β*) spielt bei dieser Differenzierung der MSCs zu Chondrozyten eine wichtige Rolle. Das Zytokin aktiviert Signalkaskaden die zu der Expression von Chondrozyten-spezifischen Genen führt. Diese EZM-Gene codieren für Proteine der EZM. Solche Proteine sind Kollagen Typ-I Fibronektin und Proteoglykane [28].

IGF-1 (*insulin growth factor 1*) spielt ebenfalls eine wichtige Rolle. Es führt ebenfalls zur Hypertrophierung der Chondrozyten und steigert die Matrixsynthese [116].

Eine Schlüsselrolle in der Chondrogenese spielt der Transkriptionsfaktor SOX9 (*SRY-related high-mobility group box*). Dessen Expression wird durch TGF-β und BMP-2,-4,-6 und -7 (*bone morphogenic protein*) induziert [50].

SOX9 induziert in den kondensierten Zellen die Expression von weiteren Sox-Genen (SOX5 und 6) sowie von Kollagen Typ-II, -IX und Aggrecan. Es entstehen prähypertrophe Chondrozyten. Die anschließende Bildung von hypertrophen Chondrozyten geschieht nur nach Abschalten von SOX9.

Die Hypertrophierung der Zellen wird durch den Transkriptionsfaktor Runx-2 induziert. Es wird Kollagen Typ-X exprimiert. Runx2 ist, wie Osterix ein wichtiger Trankriptionsfaktor der Osteogenese und ist zudem in reifen Chondrozyten hochreguliert.

Es sind noch eine Vielzahl anderer Faktoren beteiligt, die in nachfolgender Grafik (Abb. 7) aufgelistet sind.

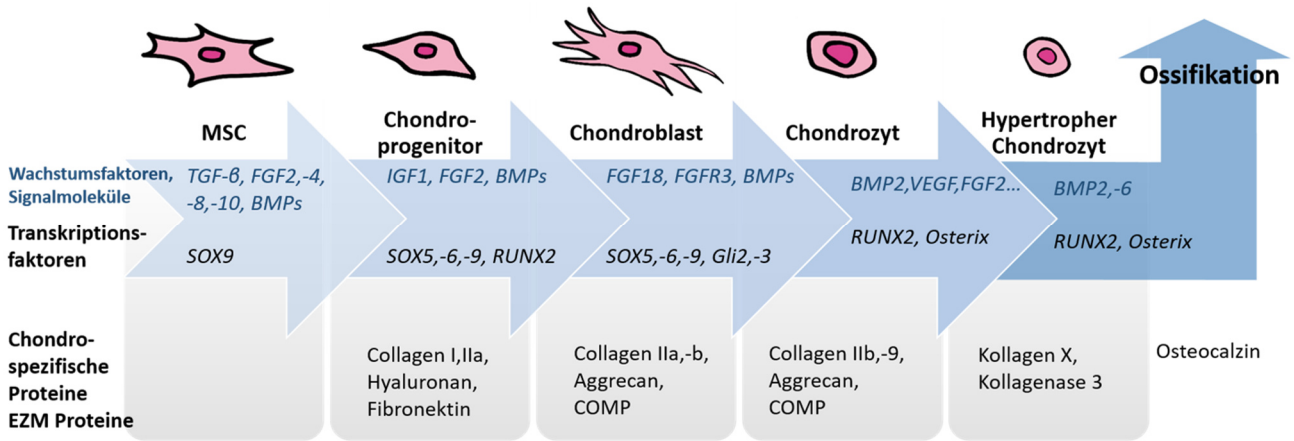


Abbildung 7 Darstellung der Chondrogenese. (nach Grassel und Ahmed, 2007 und Kelc et al. 2013).

Heilung von Knorpelverletzungen

Verletzungen am Gelenkknorpel sind beim Menschen sehr häufig. Die Knorpel der Gelenke werden besonders stark beansprucht und erleiden so oftmals Risse oder werden, z.B. durch Entzündungen im Gelenk, abgebaut. Da der Knorpel als wichtiger Schutz für Knochen und Sehnen dient, führen Läsionen des Knorpels wiederum zu Problemen wie Arthrose.

Die körpereigene Regeneration von Knorpel erfolgt im Menschen nur schlecht bis gar nicht. Dies liegt daran, dass Knorpel nicht durchblutet wird und größtenteils aus Knorpelmatrix

besteht, in der die Knorpelzellen bzw. Chondrozyten einzeln und unbeweglich liegen. Chondrogene Vorläuferzellen können nicht durch diese Matrix zu Läsionen gelangen, lediglich Chondrozyten an der Läsion können in diese migrieren und dort reperative Matrix generieren [113].

Heutzutage werden viele Knorpelverletzungen operiert. Dabei werden Verfahren wie Débridement (Entfernen von Knorpel), ACI (Autologe Chondrozytenimplantation) und Knochenmarkstimulation angewendet [65].

Die Behandlung von Knorpelläsionen mit mesenchymalen Stammzellen ist eine vielversprechende Möglichkeit, die Chancen auf Heilung zu steigern.

Es wurden bereits erfolgreich ASCs, die in Zellkultur unter Einfluss von FGF-2 und TGFβ induziert wurden, mittels Fibrinkleber-Gerüst in Knorpeldefekte von Kaninchen gesetzt. Nach einigen Wochen wurde histologisch die Bildung eines Knorpel-Phänotyps festgestellt [31].

Oxidativer Stress

Obwohl viele verschiedene Faktoren an den Prozessen beteiligt sind, die zu Osteoporose führen, gibt es einen Faktor, der bei vielen Erkrankungen eine wichtige Rolle spielt. Es ist oxidativer Stress, welcher von im Körper erzeugten freien Sauerstoffradikalen, den sogenannten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) verursacht wird.

Die häufigsten ROS im menschlichen Körper sind Superoxidanionen (O2−.), Hydroxylradikal (•OH), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), hypochlorige Säure (HOCl), Peroxyl- und Hydroperoxylradikale (ROO•, HOO-) [10].

ROS können aber auch durch exogene Faktoren wie Rauchen [46, 79] oder UV-Strahlung aufgenommen oder die Produktion im menschlichen Körper induziert werden [69, 86]. Die meisten ROS sind endogen und werden von Zellen produziert. Sie werden von NADPH-Oxidasen [8] und hauptsächlich von Komplex I und III der mitochondrialen Atmungskette [42, 96] produziert. Beide erzeugen Superoxid, indem sie Elektronen über biologische Membranen auf Sauerstoff übertragen. Die Enzyme Xanthinoxidase und Aminosäureoxidase produzieren ebenfalls Superoxid. Das Superoxid kann sich spontan umwandeln oder wird weiter durch Superoxiddismutasen (SOD) zu H_2O_2 katalysiert. Katalase kann H_2O_2 weiter in Wasser und Sauerstoff umwandeln. Außerdem sind auch Glutathionperoxidasen in der Lage, H_2O_2 in Wasser umzuwandeln. Darüber hinaus gibt es eine Reihe kleiner antioxidativer Moleküle wie

Glutathion, die Vitamine A, C und E sowie einige Redoxproteine wie Thioredoxin, die die Zellen gegen ROS schützen [10].

ROS sind nicht nur in der Lage, DNA und andere Zellbestandteile wie Proteine zu modifizieren, sie haben auch Funktionen bei der Zellsignalisierung. Oxidativer Stress, der durch ein Ungleichgewicht von Antioxidantien und ROS induziert wird, kann verschiedene Signalmoleküle triggern und die Expression von Transkriptionsfaktoren auslösen, die eine wichtige Rolle bei Entzündung, Differenzierung und Zelltod spielen.

Katalase

Katalase ist ein Enzym der antioxidativen Abwehr von Zellen, welches H_2O_2 in Wasser und Sauerstoff umwandelt.

Die humane Katalase ist ein Homotetramer, dessen vier Untereinheiten jeweils eine Häm-Gruppe als aktives Zentrum besitzen. Die Anordnung als Tetramer ermöglicht einen noch schnelleren Umsatz von H_2O_2. So hat z.B. Katalase aus humanen Erythrozyten einen ungefähren Umsatz von 550.000 Molekülen H_2O_2 pro Sekunde [105].

Die Katalyse erfolgt in zwei Schritten:

1. Katalase-[Por-Fe(III)] + H_2O_2 → **Katalase-[Por+.-Fe(IV)=O] + H_2O**

2. Katalase-[Por+.-Fe(IV)=O] + H_2O_2 → **Katalase-[Por-Fe(III)] + H_2O + O_2**

Die zusammengefasste Reaktion lautet: **2** H_2O_2→ **$2H_2O$ + O_2**

Katalase ist ein wichtiges antioxidatives Enzym und kommt in sämtlichen Zellen des Körpers vor. Nach dessen Synthese im Endoplasmatischem Reticulum gelangt es als Monomer ins Cytosol. Die Monomere sind nicht aktiv, können sich aber sporadisch zu enzymatisch aktiven Tetrameren zusammenbauen. Die Monomere und auch Tetramere bindet PEX5 (*Peroxisom Biogenese Factor 5*) und schleust diese in die Peroxisomen. Dort bilden sich Katalase-Tetramere, die peroxisomales H_2O_2 abbauen [128].

Interessant hierbei ist auch die Rolle der VCP-ATPase (*p97, Valosin-containing Protein*). Welche am Transport und der Verteilung von Proteinen im Zytoplasma in die Organellen beteiligt ist. VCP kann bei hohen Konzentrationen von H_2O_2 im Zytoplasma inaktiviert werden, wodurch Catalase im Zytoplasma verbleibt [76]. Auch das PEX5 bindet und transportiert

Katalase deutlich schlechter in Peroxisomen, wenn der oxidative Stress im Cytosol hoch ist [115]. Diese Mechanismen erlauben eine Verteilung von Katalase, wo sie gerade benötigt wird.

Bei der Zellalterung funktioniert dies nicht mehr und es kommt zu einer hohen Lokalisation von Katalase im Zytoplasma und Peroxisomen mit nur wenig Katalase. Ein gesteigertes Bindeverhalten von Katalase an PEX5 konnte diesen Prozess aufhalten und die Anzahl seneszenter Zellen *in vitro* verringern [62][56].

Das Umverteilen von Katalase ist also ein wichtiger Schutz der Zellen gegen oxidativen Stress.

Den Schutzmechanismus von Katalase machen sich auch Tumorzellen zur Nutze: Sie verhindern interzelluläre Apoptose-induzierende ROS-Signale durch eine starke Lokalisation von Katalase auf der Außenseite ihrer Zellmembranen [13].

Des Weiteren sind MSCs in der Lage Katalase in extrazellulären Vesikeln (EV), wie Exosomen oder Mikrovesikeln, in den extrazellulären Raum abzugeben. So konnten EV von MSCs Neuronen vor oxidativem Stress und Synapsen-Schädigung schützen [38]. Auch ASCs produzieren EV, welche durch verschiedene entzündungshemmende Faktoren Knorpelabbau mindern können [119]. Auch die Chondrogenese wird durch EV in ASCs gefördert und die Adipogenese verringert [110].

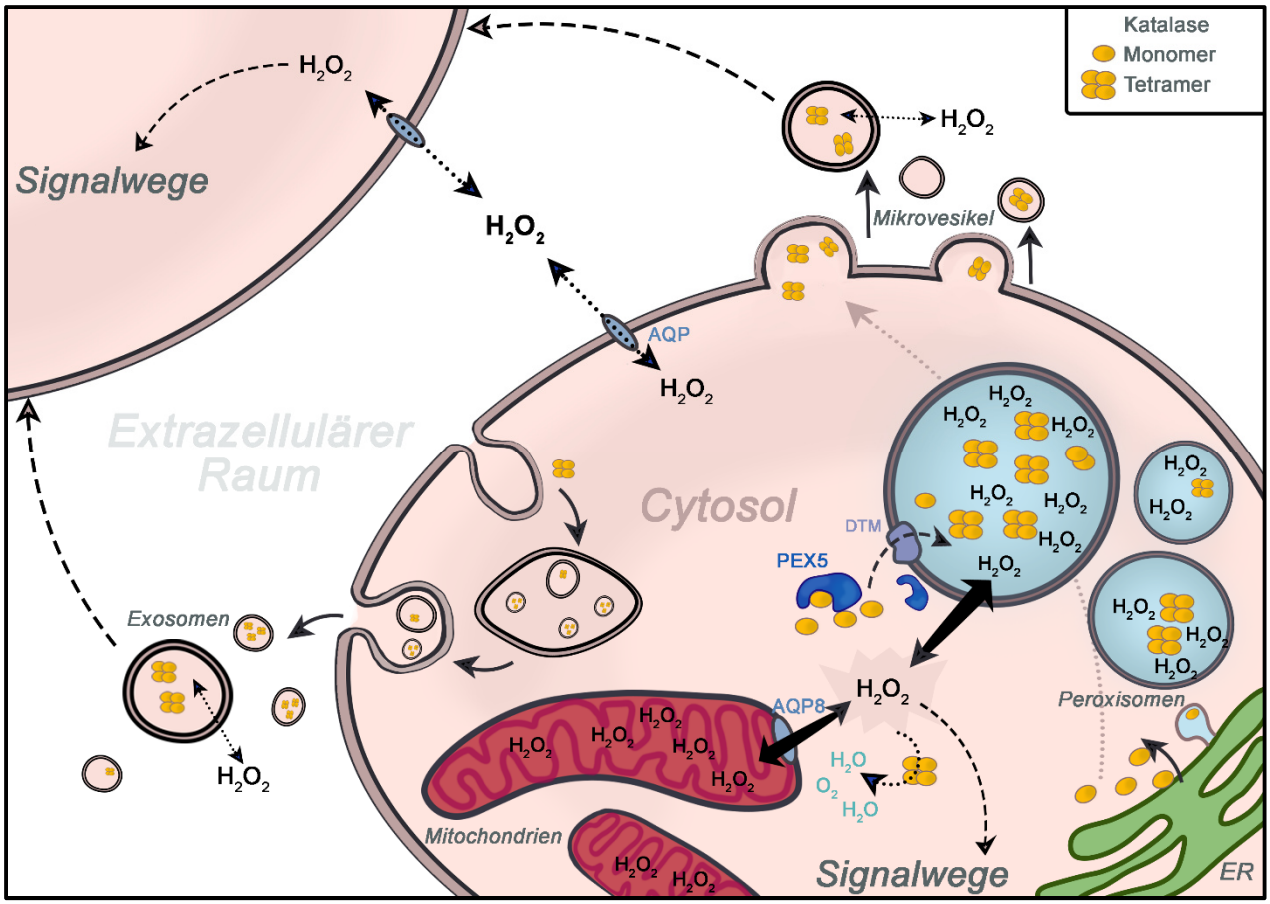


Abbildung 8 Vorkommen von Katalase und H2O2 in ASCs

Um oxidativen Stress in den Spender-ASCs und DFATs zu verringern, wurde Katalase verwendet. Hierbei gilt zu beachten, dass diese Katalase ins Medium gegeben wurde und somit nur extrazellulär wirken kann. Dabei wird erwartet, dass sie durch ihren hohen Substrat-Umsatz das Medium und den Zwischenzellraum effektiv von H_2O_2 befreit. Somit verhindert sie interzelluläre Signale durch das, auch als *Second Messenger* wirkende, H_2O_2.

H_2O_2 – Rolle in Zellen

H_2O_2 ist eine wenig reaktive ROS und findet sich, anders als die hochreaktiven Superoxid-Anionen oder Hydroxyl-Radikale, in basalen Konzentrationen von 1-10 nM in Zellen. Dabei kann H_2O_2 limitiert durch Zellmembranen und in Organelle diffundieren. Auf diese Weise kann es als Second Messenger fungieren und auf diverse Prozesse, wie Zell-Migration, Proliferation, Differenzierung und Apoptose Einfluss nehmen.

In ASCs entsteht H_2O_2 hauptsächlich bei der Atmungskette in den Mitochondrien sowie bei der β-Oxidation von Fettsäuren in Mitochondrien und Peroxisomen. Außerdem entsteht H_2O_2 auch

indirekt durch NADPH-Oxidasen (NOX). Bei den verschiedenen Reaktionen entsteht das hoch reaktive Nebenprodukt, das Superoxid-Anion ($\mathbf{O_2^{-}}$). Dieses $\mathbf{O_2^{-}}$ wird durch Superoxid-Dismutasen (SOD) zu H_2O_2 umgewandelt. In den Mitochondrien ist dafür die mitochondriale SOD (MnSOD) zuständig. Auch einige weitere Proteine können H_2O_2 produzieren [91].

Die Produktion von H_2O_2 durch SODs:

$$\mathbf{2\ O_2^{-} + 2\ H_3O^{+} \rightarrow O_2 +} \ H_2O_2 \ \mathbf{+ 2\ H_2O}$$

Die Konzentrationen von H_2O_2 sind in Peroxisomen und Mitochondrien am höchsten. Um diese ROS abzubauen befinden sich in diesen deswegen besonders viele Antioxidantien wie Peroxiredoxin und Glutathionperoxidase [73]. Die Katalase wird aktiv in die Peroxisomen transportiert (siehe Abschnitt zuvor). In den Mitochondrien ist sie wahrscheinlich nicht vorhanden [26]. Hier übernimmt vor allem die Glutathionperoxidase die Aufgabe des H_2O_2 Abbaus.

In einer Studie mit *Sacheromyces pombe* wurde eine H_2O_2-Konzentration von 3-6nm im Cytosol und von 0,1-0,15 µM in „*steady-state*"-Mitochondrien gemessen [25].

H_2O_2 kann über verschiedene Aquaporine (AQP, unter anderem AQP8) in die Zelle gelangen [123]. In die Mitochondrien gelangt es über AQP8. Wenig H_2O_2 gelangt aus den Mitochondrien ins Cytosol. Dies ist über einen Redox-Gradienten durch das Thioredoxin-System geregelt [83]. Ein Knockdown von AQP8 führt zu H_2O_2 induzierter Depolarisation von Mitochondrien und verringert die Zell-Vitalität, da H_2O_2 nicht mehr aus den Mitochondrien heraus gelangt und sich ansammelt [66].

H_2O_2 reguliert einige Signalwege und Transkriptionsfaktoren, indem es Thiol-Reste bestimmter Proteine dieser Signalkaskaden oxidiert. Diese Proteine dienen somit als Redox-Sensoren. In der folgenden Tabelle sind einige Trankriptionsfaktoren aufgelistet, die durch H_2O_2 reguliert werden können:

Transkriptionsfaktor	Funktion, wenn durch H_2O_2 oxidiert
CREB	Fördert Osteogenese [125]
FOXO	Fördert Osteogenese, fördert Katalase-Expression [7]
AP-1	Proliferation, Apoptose, Immunantwort, epidermale Differenzierung [67]
NRF2	Regulation antioxidative Enzymexpression, verringert Osteogenese [60]
NF-κB	Immunantwort, Proliferation, Apoptose, Knochen-Umbau, Osteoklasten-Bildung, inhibiert Chondrogenese und Osteogenese [15]
HIF-1/VEGF	Angiogenese, Osteoklastogenese, Chondrogenese, Mineralisierung [67]
P53	Proliferation, Zell-Zyklus, DNA-Schadenkontrolle, Zelltod , Knochen-Umbau, Adipogenese [21]
NOTCH	Osteogenese, Mineralisierung, Osteoklastogenese, Knochenheilung, Angiogenese [64]
SP1	Angiogenese [29]

Tabelle 2 Durch H2O2 beeinflusste bekannte Transkriptionsfaktoren

Fragestellung dieser Doktorarbeit

In dieser Arbeit wurde zuerst ein **Vergleich von ASCs und DFATs mit dem Schwerpunkt osteogenes Potential** vorgenommen. Die wenigen Veröffentlichungen hierzu sind widersprüchlich oder nutzen die Zellen von einzelnen Spendern [43, 55, 118].

Des Weiteren lag der Schwerpunkt darauf, das äußerst Spender-abhängige **osteogene Differenzierungspotential mit antioxidativer Katalase zu verbessern**. Es gibt bisher keinerlei Vergleiche zwischen ASCs und DFATs, die mit Katalase behandelt wurden. Mit H_2O_2, dem oxidativen Gegenspieler und Substrat der Katalase, wurde der Einfluss von oxidativem Stress betrachtet. Der Einfluss der Katalase wurde bis auf mitochondriale Ebene untersucht.

Außerdem wurde auch der **Einfluss von Katalase auf die Chondrogenese von ASCs** untersucht.

Material und Methoden

Herkunft des Fettgewebes

Das Fettgewebe stammte entweder von Patienten, die sich einer Bauchlappenoperation unterzogen, oder von Liposuktionen. In allen Fällen handelte es sich um Gewebe aus dem subkutanen Bereich. Die Spender wurden anonymisiert, in den meisten Fällen wurden jedoch Geschlecht, Alter und Art der Operation dokumentiert. Für die meisten der osteogenen Experimente wurden Zellen von n= 9 Spendern verwendet. Das Fettgewebe wurde direkt nach der Operation in DMEM bei 4 °C ins Labor transportiert. Das Lipoaspirat wurde mit der Coleman-Technik entnommen und bei 4 °C transportiert. Die Transportzeit betrug etwa 1 Stunde. Das Gewebe wurde sofort nach Ankunft im Labor verarbeitet. Die Proben wurden mit dem Einverständnis der Spender und in Übereinstimmung mit den Richtlinien der Ethikkommission des Universitätsklinikums Düsseldorf (Studiennummer 3634) und in Übereinstimmung mit den Grundsätzen der Deklaration von Helsinki (2013) verwendet.

Methoden

Isolierung von ASCs und adulten Adipozyten aus Liposuktionsfett

Zuerst wird das Liposuktionsfett in 50 ml Falcons abgefüllt. Gearbeitet wird dabei unter sterilen Bedingungen unter der Sterilbank. Dann wird das abgefüllte Fett für 10 min, bei 1200 U/min (300 *g*) zentrifugiert.

Danach haben sich drei Schichten gebildet. Oben: flüssiges Fett, Mitte: Fettgewebe und Unten: flüssige Phase.

Die obere Schicht wird mit 10 ml Pipetten abgenommen. Dann wird das Fettgewebe, also die mittlere Schicht, mit 25 ml Pipetten in neue 50 ml Falcons überführt, so dass diese etwa halb gefüllt sind.

Bei Fettgewebe-Stücken wird stattdessen das Fettgewebe von der Haut befreit (Skalpell, Schere, Pinzette) und in winzige Stückchen geschnitten. Diese werden bis zur Hälfte in 50 ml Falcons gefüllt.

Die Falcons werden nun bis zur 50ml Markierung mit Kollagenase-Puffer aufgefüllt. Nun werden die Falcons für 1h in einem 37°C warmen Schüttelbad geschüttelt. Zudem werden sie alle 10 min per Hand geschüttelt, um eine Phasenbildung zu vermeiden.

Dann wird in ein neues 50 ml Falcon ein Glastrichter gestellt. In diesen wird ein Filter-Netz gegeben. Das angedaute Fettgewebe wird nun durch diesen Filter gegossen. Dabei bleibt unerwünschtes Bindegewebe hängen.

Diese Falcons werden nun bei 1200 U/min (300 *g*) für 10 min zentrifugiert. Dann wird die oberste durchsichtige gelbe Öl-Phase abpipettiert und verworfen. *Die darunter liegende cremefarbene Phase beinhaltet die adulten Adipozyten. Sie wird vorsichtig abpipettiert und in neue Falcons überführt.* Danach wird die flüssige Phase bis zum Zellpellet abgesaugt. Dieses wird dann in ca. 30 ml NaCl-Lösung (0,9 %) resuspendiert.

Die Falcons werden erneut bei U/min (300 *g*) für 10 min zentrifugiert. Die Flüssigkeit wird abgesaugt und das Zellpellet in ca. 18 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Diese Flüssigkeit wird dann in eine T175-Zellkulturflasche überführt und in den Brutschrank gestellt (37°C, 5% CO_2).

Am nächsten Tag werden die Flaschen gewaschen, da sich noch viele andere Zellen, wie Erythrozyten in den Flaschen befinden.

Durch vorsichtiges Schwenken, lösen sich diese Zellen vom Boden. ASCs sind plastikadhärent und lösen sich nicht. Das Medium wird abgesaugt und die Flaschen vorsichtig mit ca. 10 ml PBS auf der zellfreien Flaschen-Oberseite befüllt. Dann werden die Flaschen vorsichtig geschwenkt, um weitere ungewünschte Zellen zu lösen. Das PBS wird abgenommen und die Flaschen werden mit 18 ml neuem Medium befüllt (wieder vorsichtig auf die gegenüberliegende Flaschenseite).

Danach werden die Flaschen zurück in den Brutschrank gestellt. Sobald die Flaschen vollgewachsen (zu ca. 90% konfluent) sind, können die Zellen geerntet und eingefroren werden. Außerdem können die ASCs auch gesplittet werden. Dazu werden die Zellen geerntet (siehe Abschnitt Zellkultur) und anschließend auf mehrere neue Flaschen verteilt. So lässt sich die Zellzahl erhöhen.

Generierung von DFATs

Die Adipozyten aus dem Isolationsprozess werden in T25er Flaschen ausplattiert. Hierfür wird die „Ceiling Culture“ genutzt, ein Inkubieren der Flaschen über Kopf.

In eine T25er Flasche werden 3 ml Adipozyten pipettiert. Dann wird die Flasche stehend bis zur Oberkante mit Wachstumsmedium befüllt (ca. 50ml) und verschlossen. Luftblasen sollten

dabei vermieden werden. Dann wird die Flasche mit der Unterseite nach oben in den Brutschrank gestellt. Es findet über 10 Tage kein Mediumswechsel statt. Nach 10 Tagen wird die Flasche umgedreht und für 1 h weiter im Brutschrank belassen. In dieser Zeit lösen sich Öl und nicht festgewachsene Zellen vom Boden ab. Das alte Medium wird vollständig entfernt, dabei werden zuerst die oben schwimmenden Öltropfen mit der Pipette abgesaugt. Nun werden die Flaschen mit 5ml Medium befüllt und bis zur Konfluenz inkubiert. Es entwickelt sich ein Fibroblasten-ähnlicher Phänotyp. Nach der Passage wurden in DFATs keine Lipidtröpfchen beobachtet. Modifizierte Methode von [70]. Besonders volle T25er Flaschen DFATs wurden direkt auf T175 gesplittet.

Einfrieren von ASCs und DFATs - Kryokonservierung

Sind die Böden der Zellkulturflaschen mit Zellen vollgewachsen, so kann man diese für die längere Aufbewahrung einfrieren.

Dazu wird zuerst das Medium aus der Flasche entfernt und diese anschließend mit PBS gewaschen. Dann wird Trypsin-Lösung in die Flaschen gegeben (ca. 4 ml bei T75-Flaschen), so dass der Boden bedeckt ist. Nach ca. 5 min im Brutschrank hat das Trypsin die ASCs vom Boden der Flasche gelöst. Dann werden ca. 6 ml Medium dazu gegeben, um die Trypsinierung zu stoppen und so eine Schädigung der Zellen zu vermeiden.

Die Flüssigkeit wird in ein Falcon überführt (davon werden 10 µl für die Ermittlung der Zellzahl abgenommen) und bei 1200 U/min (300 *g*) für 5 min zentrifugiert.

In dieser Zeit wird die Zellzahl ermittelt.

Dann wird die Flüssigkeit abgenommen und das Zellpellet in der entsprechenden Menge Einfriermedium (FCS mit 10 % DMSO) aufgenommen, so dass eine Konzentration von 1.000.000 Zellen /ml entsteht. Davon werden je 1 ml in ein Cryo Tube pipettiert.

Die Cryo-Tubes werden in einen Mr. Frosty™ Freezing Container gegeben und in einen - 80 °C Eisschrank gestellt. Der Container ermöglicht ein langsames Abkühlen der Zellen um - 1° C/min. Am nächsten Tag können die Tubes dann aus dem Container genommen werden. Sie werden bei - 80 °C aufbewahrt.

Zellkultur

Alle Arbeiten mit Zellkulturen finden unter sterilen Verhältnissen statt. Es wird unter einer Sterilbank gearbeitet. Sämtliches Material, welches mit den Zellen in Kontakt kommt, ist steril. Die Zellkulturen werden im Brutschrank bei 37°C und Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre mit 5 % (v/v) CO_2 kultiviert.

Die ASCs werden in Zellkulturflaschen kultiviert. Die Flaschen besitzen 75 cm^2 Fläche und erhalten 18 ml Medium.

Um die Zellen zu ernten wird zuerst das Nährmedium mit einer Messpipette aus der Zellkulturflasche abgenommen. Im nächsten Schritt werden die Zellen mit ca. 10 ml Phosphatpuffer (PBS) abgespült. Das PBS wird wieder aus der Flasche entfernt. Dann werden die Zellen, die am Boden der Flasche eine Schicht bilden, die Monolayer, mithilfe von Trypsin abgelöst. Hierfür werden 2-3 ml einer 0,05%igen Trypsin-EDTA-Lösung verwendet. Nach ca. 5min im Brutschrank bei 37°C lösen sich die Zellen vom Boden, werden abgenommen und in 50 ml Falcons gegeben. Das Falcon wird für 5 min bei 1200 g zentrifugiert. Es bildet sich ein Zell-Pellet am Boden des Röhrchens. Der Überstand wird abgenommen und verworfen. Die Zellen werden in ca. 5 ml frischem Medium resuspendiert.

Um die Zahl der geernteten Zellen zu bestimmen, werden 50 µl der Zellsuspension abgenommen und mit 50 µl Trypanblau gemischt. Der Farbstoff färbt die Zellmembranen aller lebenden Zellen an. Von diesem Gemisch werden 10 µl in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und unter dem Lichtmikroskop die Zellen gezählt. Es werden zwei Großquadrate ausgezählt. Dann wird die ermittelte Zellzahl durch Zwei geteilt, um die durchschnittliche Zahl für ein Großquadrat zu erhalten, dann mal Zwei genommen, um die Verdünnung heraus zu rechnen und anschließend mit dem Kammerfaktor 10.000 multipliziert. Auf diese Weise wird die Zellzahl pro ml Zellsuspension bestimmt. Die Verdünnung kann, je nach Zellzahl auch anders gewählt sein.

Eine definierte Zellzahl wird in frischem Medium eingestellt. Um die gleichmäßige Verteilung der Zellen in den Wells zu garantieren, wird ein Eppendorf Dispenser genutzt und der CellTiter-Blue® Assay vor Beginn des Versuchs durchgeführt (also nach 72 h).Die Platten werden bei 37°C und 5% CO_2 bebrütet und nach ca. 72h für die Versuche zur Differenzierung eingesetzt. Die Zellen befanden sich, wenn nicht anders indiziert, bei den Versuchen in der Passage 3.

Besatz der Well-Platten mit ASCs oder DFATs

Well-Platte	Medium pro Well	Zellen pro ml
6	2 ml	100.000
12	1 ml	50.000
24	0,5 ml	20.000

Tabelle 3 Besatz der Well-Platten mit Zellen

Bestimmung der Lebendzellzahl mit CellTiter-Blue®

CellTiter-Blue ist ein Zeiger für metabolisch aktive Zellen. Der Redoxfarbstoff Resazurin wird durch die Zellen zum pinken Fluoreszenzfarbstoff Resorufin umgesetzt. Sind die Zellen am Absterben oder tot, so wird von ihnen kein Farbumschlag erzeugt. Die pinke Färbung des Mediums ist proportional zur Menge an lebenden Zellen.

Zuerst wird das alte Medium aus den Wells der Platte abgenommen. Dann wird es durch frisches Medium ersetzt, dem im Verhältnis 1:20 CellTiter-Blue zugesetzt wurde. Die Platte wird für 60 min zurück in den Brutschrank gestellt.

Dann wird die Fluoreszenzemission der Wells im Multilabel Reader, bei 540 nm Anregungswellenlänge, bestimmt. Die Werte werden als counts/s angegeben (also als, durch den Detektor gezählte, Photonen pro Sekunde).

Die Ergebnisse der Messung werden im Excel-Format gespeichert.

Osteogene Differenzierung

Drei Tage nach Aussaat der Zellen, sind die ASCs und DFATs in den Wells konfluent und können differenziert werden.

Das osteogene Differenzierungsmedium enthält unter anderem 100nM Dexamethason, welches die Osteogenese fördert, L-Ascorbinsäure-2-phosphat welches die Adipogenese hemmt und β-Glycerophosphat als Lieferant von Phosphat für die Kalzifizierung. Die ASCs und DFATs werden 14 Tage lang mit osteogenem Differenzierungsmedium inkubiert. Mediumswechsel erfolgt an Tag 0, 3, 7 und 10. An Tag 7 und 14 wird ausgewertet

Beschichtung von Well-Platten mit Gelatine für die Adipogene Differenzierung

Die durch vorheriges Erwärmen flüssige Gelatinelösung (1 %) wird in die Wells der Platten pipettiert. Es wird drauf geachtet, dass die Böden der Wells vollständig beschichtet sind.

Nach 1h bei 37°C sind die Böden der Wells mit einer dünnen Schicht Gelatine beschichtet. Die überständige Lösung wird abgesaugt.

Die Platten werden zeitnah verwendet, damit die Gelatine nicht austrocknet.

Adipogene Differenzierung

Zwei Tage nach Aussaat der Zellen, sind die ASCs und DFATs in den Wells zu ca. 80 % konfluent, das heißt, sie bedecken ca. 80 % des Bodens der Wells und können nun differenziert werden.

Damit die Zellen zu Adipozyten differenzieren können, braucht das Differenzierungsmedium bestimmte Zusätze. Das sind Insulin, welches obligat für die Lipogenese ist. 1µM Dexamethason inhibiert chondro- und osteogene Differenzierung der ASCs und erhöht die Adipogenese. Triiodthyronin aktiviert Enzyme die für die Lipogenese zuständig sind. Transferrin und Pioglitazon fördern ebenfalls die Adipogenese. Am ersten Tag der adipogenen Differenzierung wird zudem IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthin) zugesetzt. Ein unspezifischer Hemmer für Phosphodiesterasen. Diese bauen cAMP und cGMP ab.

Die ASCs und DFATs werden 14 Tage lang mit adipogenem Differenzierungsmedium inkubiert. Mediumswechsel erfolgt an Tag 0, 3, 7 und 10. An Tag 14 wird ausgewertet.

Chondrogene Differenzierung

Drei Tage nach Aussaat der Zellen, sind die ASCs und DFATs in den Wells konfluent, und können nun differenziert werden.

Damit die Zellen zu Chondrozyten differenzieren können, braucht das Differenzierungsmedium bestimmte Zusätze. Das Zytokin TGF-β (*Transforming growth-factor β*) ist hier besonders wichtig. Es induziert maßgeblich die Chondrogenese. Geringe Mengen an Ascorbinsäure erhöhen die Synthese von Kollagen-haltiger EZM. Außerdem wird Insulin hinzugefügt, welches das Wachstum von Hypertrophen Zonen steigert. Zugaben von 1% FCS (fetales Kälberserum) stellt weitere Faktoren für die Chondrogenese zur Verfügung.

Die ASCs werden 24 Tage lang mit chondrogenem Differenzierungsmedium inkubiert. Mediumswechsel erfolgt an Tag 0, 3, 7, 10, 14, 17 und 21. An Tag 24wird ausgewertet.

Proteinisolation und Konzentrationsbestimmung

Da für den Western Blot Protein-Proben miteinander verglichen werden, muss zuerst die Proteinkonzentration bestimmt werden. Beim Western Blot wird dann von jeder Probe gleich viel Protein eingesetzt.

Zuerst werden die Proteine aus den Zellen isoliert. Dafür werden die Zellen in den Well-Plates geerntet. Hierfür wird die Rückseite einer 1ml Pipettenspitze benutzt. Als erstes wird das Medium entfernt. Dann werden die Zellen mit PBS gewaschen. Mit der Pipettenspitze werden die Zellen vom Boden geschabt und in PBS aufgenommen. In 50 ml Falcons werden die Proben für 5 min bei 1200 U/min (800 *g*) zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in 20-30 µl RIPA-Puffer aufgenommen und in ein 1,5 ml Eppi überführt. Nun können die Proben entweder direkt für die Konzentrationsbestimmung genutzt werden oder sie werden bei -80°C gelagert.

Die Proben werden auf Eis gestellt und nun, zum Aufbrechen der Zellen, mehrmals sonifiziert. Anschließend wird die Proteinkonzentration mittels BCA-Assay bestimmt.

Dafür wird ein BSA-Standard in den Konzentrationen von 0-2 µg/µl angesetzt. Dann werden je 10 µl Standard bzw. Probe, in Duplikaten, in eine 96 well Platte pipettiert. Dann werden 200µl BCA-Arbeits-Reagenz hinzugefügt und die Platte kurz auf den Schüttler gestellt. Die Platte wird mit einer Klebefolie verschlossen und für 30 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Dann wird im Multilabel Reader, die Absorption bei 562 nm, bestimmt.

Mit dem Programm Work Out 2.0 wird mit den Ergebnissen des Standards eine Eichgrade erstellt mit der die Proteinkonzentrationen der Proben bestimmt werden.

RIPA-Puffer	50 mM Tris (pH=8) 150 mM NaCl 1 % NP-40 0,5 % Na-deoxycholat 0,1 % SDS in Wasser
BCA-Arbeits-Reagenz	Reagenz A 50 : 1 Reagenz B

Tabelle 4 Lösungen für die Proteinisolation

Western Blot

Der Western Blot ist eine quantitative Nachweismethode für Proteine. Die zu untersuchenden Zelllysate werden in einem Polyacrylamid-Gel unter Einfluss eines elektrischen Felds, in seine verschiedenen Proteine, der Größe nach getrennt. Dabei hat die Konzentration des Gels Einfluss auf die Laufgeschwindigkeit. Kleine Proteine laufen schneller durch das Gel in Richtung Anode, während größere Proteine langsamer durch die Poren des Gels laufen. Die natürliche Ladung der Proteine wird durch die Zugabe von SDS (Natriumdodecylsulfat) zu einer gleichmäßigen negativen Ladung geändert. So dass die Proteine wirklich nur nach ihrer Größe und nicht durch ihre unterschiedlichen Ladungen getrennt werden.

Nun erfolgt der eigentliche Blot. Die Proteine werden aus dem Gel auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Dies gelingt wieder über das Anlegen eines elektrischen Felds. Dabei liegt die Anode unter der Nitrocellulose-Membran. Auf dieser liegt das Gel, in dem sich die Proteine befinden und darüber liegt die Kathode. Durch den gleichmäßigen Druck auf die Fläche des Gels und das elektrische Feld, wandern die negativ geladenen Proteine nun in die Membran.

Der Nachweis von spezifischen Proteinen in dieser Membran erfolgt mittels Immunmarkierung. Dabei wird ein Protein-spezifischer primärer Antikörper, z.B. ein Maus Antikörper, benutzt, der an das Protein bindet. Dann wird ein auf den primären Antikörper spezifischer sekundärer Antikörper, z.B. ein anti-Maus-Antikörper hinzugefügt. Dieser bindet an den primären Antikörper. Zudem besitzt der sekundäre Antikörper eine Bindung zu einem fluoreszierenden Protein, einem Fluorochrom oder einem Enzym, dass, im Nachhinein hinzugefügtes Substrat, zu einem fluoreszierenden Produkt umwandelt. Diese fluoreszierenden Stoffe zeigen, nach Anregung durch UV-Licht, auf Kameraaufnahmen ein Lichtsignal an Stelle des gesuchten Proteins. Es zeigt sich eine Protein-spezifische Bande. Je dicker diese ist, desto mehr Protein liegt vor.

Lösungen und Puffer	***Zusammensetzung***
Laufpuffer	25mM Tris (pH=8,3-8,8) 192 mM Glycin 0,1% SDS in Wasser
Transferpuffer	12 mM Tris 96 mM Glycin in Wasser
Blotting-Puffer	25 mM Tris 192 mM Glycin

	1:10 Methanol in Wasser
Trenngelpuffer	1500 mM Tris 0,4 % SDS in Wasser
4 x Sammelgelpuffer	500 mM Tris (pH=6,8) 0,4 % SDS in Wasser
Ponceau S	0,1 % Ponceau 3 % Trichloressigsäure in Wasser
TBS	7,7 mM Tris (pH=7,5) 150 mM Natriumchlorid in Wasser
TBST	7,7 mM Tris (pH=7,5) 0,1 % Tween 150 mM Natriumchlorid in Wasser
4 x Laemmli Puffer	252 mM Tris-HCl 40 % Glycerol 8 % SDS 0,01 % Bromphenolblau in Wasser <u>Vor Gebrauch:</u> Zusatz von 20 % Mercaptoethanol
Stripping-Puffer	62,5 mM Tris (pH=6,8) 2 % SDS In Wasser <u>Vor Gebrauch:</u> Zusatz von 100 mM Mercaptoethanol

Tabelle 5 Lösungen für Western Blots

Sammelgel (für 1 Gel)	***Trenngel (für 1 Gel, 10 %)***
650 µl Acrylamid (30 %)	2,5 ml Acrylamid (30 %)
3 ml Wasser	3,125 ml Wasser
1,25 ml 4 x Sammelgelpuffer	1,875 ml 4 x Trenngelpuffer
10 µl TEMED	10 µl TEMED
25 µl APS (10 %)	25 µl APS (10 %)

Tabelle 6 Sammel- und Trenngel

Zuerst werden Trenn- und Sammelgel gegossen. Das Trenngel wird zuerst ca. 2/3 hoch zwischen die Glasplatten (1mm Abstand) gefüllt. Dann wird es mit Isopropanol beschichtet, um eine glatte Oberkante zu schaffen. Nach ca. 20 min ist das Gel fest und das Isopropanol wird durch Sammelgel ersetzt, das bis zur Oberkante der Glasplatten gefüllt wird. Oben wird ein Kamm eingesetzt, der die Taschen formt, in die später die Protein-Proben gefüllt werden. Nach 30 min ist das Gel ausgehärtet.

SDS-Page

Das Gel wird in eine Trennkammer eingespannt. Diese wird mit Laufpuffer gefüllt. Nun werden die Proben, die 1:4 mit Laemmli-Puffer versetzt sind, in die Taschen pipettiert. Dann werden Anode und Kathode angeschlossen. Bei 60 V Spannung wandern die Proteine in ca. 20 min aus den Taschen bis zum Ende des Sammelgels (sichtbar an der blauen Bande des Bromphenolblau). Dann wird die Spannung auf 110-130 V erhöht. Nach ca. 1-1,5 h ist der Lauf fertig. Das erste Bromphenolblau ist an der Unterkante des Gels angekommen.

Western Blot

Die Proteine die sich im Gel befinden müssen nun auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen werden. Dazu wird ein Blotter benutzt. Membran und Blotting-Papier werden in Blotting-Puffer getaucht.

Dann wird zuerst ein Blotting-Papier auf die Anode gelegt, darauf dann das Gel, auf dieses die Membran und darüber wieder ein Blotting-Papier. Luftblasen werden entfernt. Dann wird der Deckel (Kathode) aufgesetzt und geschlossen. Das Blotting-Programm wird gestartet. Nach 30 min ist der Blot beendet. Die Membran enthält nun die Proteine.

Um vor den weiteren Schritten zu überprüfen, ob der Blot geglückt ist, wird die Membran für 3 min in Ponceau S Lösung gelegt. Proteine erscheinen als rote Banden auf der Membran. Anschließend wird das Gel mit TBST entfärbt.

Immunmarkierung

Zuerst wird die Membran in einem 50 ml Falcon auf dem Taumelschwenker in TBST mit 5 % Milchpulver oder 5 % BSA (Bovines Serum-Albumin) blockiert. Dabei werden vor allem die Stellen der Membran, auf denen keine Proteine sitzen, mit Milch- oder BSA-Proteinen besetzt. Entweder geschieht dies für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C.

Dann wird der primäre Antikörper (Konzentration, siehe Tabelle) in 4 ml Blocking-Lösung in das Falcon gegeben (vorher wurde die alte Blocking-Lösung entfernt). Auf dem Taumelschwenker erfolgt die Inkubation mit dem ersten Antikörper entweder bei RT für 2 h oder über Nacht bei 4°C.

Es erfolgt ein Wasch-Schritt. Es wird 3 x 5 min mit TBST auf dem Schwenker gewaschen.

Der sekundäre Antikörper wird ebenfalls in 4ml Blocking-Lösung ins Falcon gegeben. Zusätzlich wird Anti-Western-Antikörper (1:4000) hinzugegeben, um die Protein-Leiter zu markieren. Das Falcon wird nun im Dunkeln für 1 h geschwenkt. Der sekundäre Antikörper ist an das Enzym HRP (*horse raddish peroxidase*) gekoppelt.

Es erfolgt ein weiterer Wasch-Schritt. Es wird 3 x 5 min mit TBST auf dem Schwenker im Dunkeln gewaschen.

Fluoreszenzdetektion

Die Membran wird gleichmäßig mit Luminol-Wasserstoffperoxid-Mischung benetzt. Das HRP-Enzym des sekundär Antikörpers setzt das Gemisch zu 3‘-Aminophtalat um. Das 3‘-Aminophtalat wird nun im Gel Doc™ mit UV-Licht angeregt. Es emittiert Licht im Bereich von 425-510 nm. Dieses Licht wird detektiert. Es werden Fotos aufgenommen. Auf diesen sieht man die Banden des gesuchten Proteins.

Blot-Stripping

Um gebundene Antikörper von der Nitrocellulose-Membran zu entfernen (Stripping) wird die Membran für ca. 30 min bei 60°C in Stripping-Puffer, unter Schütteln, inkubiert. Danach wird die Membran fünfmal mit PBS gewaschen. Dann kann die Membran erneut geblockt werden und mit dem nächsten Antikörper inkubiert werden.

Auswertung mit dem Programm Image Lab

ASC-DFATs Experimente

Anhand der Bandendicke kann die Menge an Protein in der Probe mit anderen Proben verglichen werden. Um die Menge an Protein auf die Menge an Gesamtprotein zu beziehen, wird dieses mit einem, gleichmäßig in den Zellen exprimierten, Housekeeping Protein verglichen. Es wurde GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase), genutzt. Die Banden wurden mit dem Banden-Tool markiert und die Werte anschließend auf die Werte der GAPDH Bande der jeweiligen Probe bezogen.

Spätere Experimente

Anstatt die Banden auf ein Housekeeping Protein zu beziehen, wurden in späteren Experimenten diese Banden auf die Gesamtproteinmenge pro Probe bezogen. Dafür wurden zum einen gekaufte fertig gegossene Gele von BioRad verwendet (Stain-Free Gel) zum anderen wurde **vor** dem Blotting ein Foto von diesem Gel gemacht. Das Gel enthält eine Trihalogen-Verbindung, welche mit Tryptophan-Resten der Proteine unter UV-Anregung ein Fluoreszensignal emittiert. Dieses zeigt sämtliche Proteinbanden an, die in dem Gel vorhanden sind. Diese Technologie erlaubt deutlich verlässlichere Ladekontrollen, als das Verwenden von Housekeeping Proteinen.

Antikörper	***Konzentration***
mouse α-human Katalase monoclonal	1:1000
mouse-α-Cytc monoclonal	1:1000
rabbit α-human RUNX2 polyclonal	1:1000
mouse-α-human OPN monoclonal	1:500
rabbit-α-OCN polyclonal	1:100
mouse-α-human UCP1 monoclonal	1:1000
rabbit-α- human MnSOD polyclonal	1:2000
mouse-α- human CD137 monoclonal	1:500
goat-α-TBX1 polyclonal	1:1000
rabbit-α-human PPARy polyclonal	1:1000

Tabelle 7 Antikörper für Western Blots

Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie wird die Beschaffenheit von einzelnen Zellen gemessen. Dabei werden einzelne Zellen einer Zellsuspension an einem Laserstrahl vorbeigeleitet. Die Zelle reflektiert oder emittiert nun Licht, das von Detektoren gemessen wird und Rückschluss auf Größe, Granularität und Anfärbung von Zellbestandteilen gibt. Die Detektoren quantifizieren Streulicht und Fluoreszenzemission der Zellen. Spezifische Komponenten der Zelle, wie Oberflächenantigene oder Lipidvesikel, können mittels fluoreszenzmarkierten Antikörpern oder Fluoreszenzfarbstoffen detektierbar gemacht werden. Der FSC Detektor (*forward scatter*=Streuung), misst die Größe der Zellen und der SSC Detektor (*side scatter*) die Granularität und Membranfaltung. Verschiedene FL-Detektoren (Fluoreszenz-Detektor), können die Intensität der Fluoreszenzemissionen der Zellen detektieren.

Färbung der ASCs und DFATs

Die Zellen (ca.1x10^6) werden in Passage 2 geerntet, und auf mehrere Zentrifugenröhrchen verteilt und dann abzentrifugiert (4min, 300 g). Jedes Zellpellet wird in CellWash Puffer resuspendiert und erneut abzentrifugiert bzw. gewaschen.

Direkte Färbung

Das Pellet wird in 50µl CellWash-Lösung (+10% FCS) aufgenommen. Dazu wird 1µl des konjugierten Primär Antikörpers gegeben. Die Proben werden für 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Danach erfolgt ein Wasch-Schritt mit 3 ml Cell Wash für 4 min bei 300 g. Das Zellpellet wird in 200µl Cell Wash Puffer resuspendiert und kann dann im Durchflusszytometer analysiert werden. Es werden jeweils 10.000 Zellen gemessen.

Intrazelluläre Färbung

Fixieren: Das Pellet wird in 500µl Cellfix (1:10 mit Wasser) aufgenommen (15min im Dunkeln). Dann werden die Zellen gewaschen (s.o.). Permeabilisieren: Das Pellet wird in 300µl Cellwash (0,2% Triton) resuspendiert (15min im Dunkeln). Dann werden die Zellen 4min bei 1200rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wird in 100µl Cellwash (0,2% Triton) resuspendiert und es wird 0,5 µl primärer Antikörper hinzugefügt (30min im Dunkeln). Danach wird 3 mal mit Cellwash (0,2% Triton)gewaschen (jeweils 4min abzentrifungiert, 300 g). Das Zellpellet wird in 100µl Cellwash (0,2% Triton) resuspendiert und 1µl sekundärer Antikörper (gekoppelt mit Fluorophor) hinzugefügt (Inkubation:30min im Dunkeln). Es wird 4ml Cellwash dazu

gegeben und abzentrifugiert (4 min, 300 g). Das Zellpellet wird in 200µl Cellwash aufgenommen und kann dann gemessen werden.

In der Tabelle ist die Kombination der verschiedenen Antikörper zu sehen. In einem Röhrchen werden bis zu 3 verschiedene Antikörper gegeben. Deren Fluoreszenzemissionen können dann in den Fluoreszenzdetektoren 1, 2 und 4 detektiert werden. Röhrchen 1 und 9 dienen als ungefärbte Kontrollen.

Röhrchen	***FL4 APC***	***FL2 PE***	***FL1 Fitc***	***Art der Färbung***
1	ungefärbt			direkt
2	CD44	HLA-DR	CD45	
3	CD90	CD29	CD14	
4	CD105		CD19	
5	CD146	CD73		
6	ALK6	ALK3		
7	TGFβ RI	TGFβ RII		
8	PPARy	CD31	CD34	direkt+intrazellulär
9	2.AK			

Tabelle 8 Antikörper für Durchflusszytometrie

Fluoreszenzmikroskopie

Bei der Fluoreszenzmikroskopie werden Zellstrukturen mittels Fluorophoren angefärbt und anschließend mittels eines Fluoreszenzmikroskops (Zeiss Axiovert) begutachtet. Das Mikroskop beleuchtet die Probe auf Deckgläschen und Objekträger mit Licht einer bestimmten Wellenlänge im Anregungsspektrum. Der an die Zellstrukturen gebundene Fluorophor wird durch das Licht angeregt und emittiert daraufhin Licht einer längeren Wellenlänge. Dieses emittierte Licht wird durch Prismen geleitet, die nur für Licht in diesem Emissionsspektrum durchlässig sind und anschließend auf einem Detektor detektiert.

Beispiel: Das Fluorophor Hoechst32342 färbt DNA an (Zellkern), indem es in diese interkaliert. Mit dem Licht im Bereich von 350 nm wird das im Zellkern gebundene Hoechst angeregt. Dadurch emittiert es nun Licht im Bereich von 454 nm. Dazu wird im Mikroskop der DAPI-Filter eingeschoben. Dieser lässt nur im Anregungsspektrum von 357±44 nm Licht auf die Probe fallen. Die Emission wird dann nur im Emissionsfilter-Bereich von 447±60 nm detektiert.

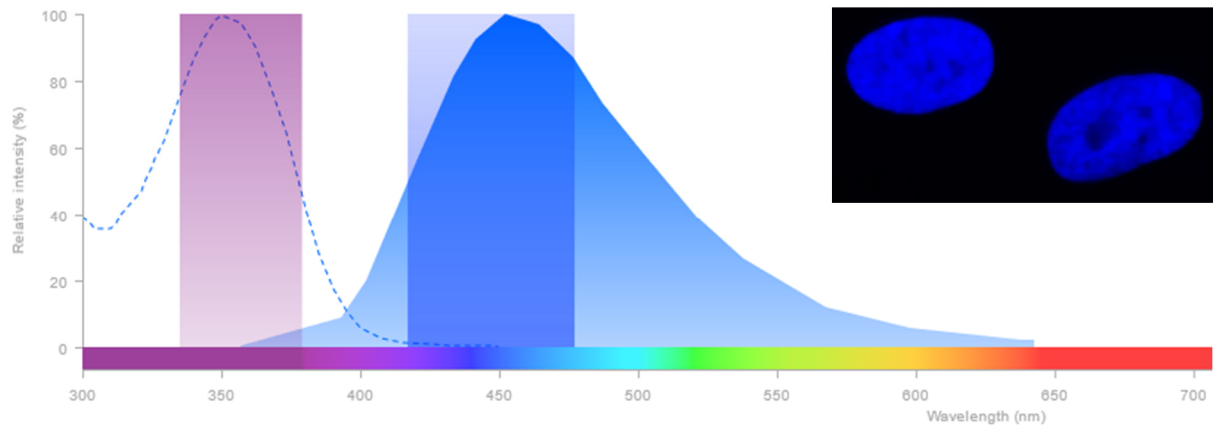


Abbildung 9 Anregungs- und Emissionsspektrum von Hoechst33342. *Die gestrichelten Kurven zeigen das Anregungsspektrum, die blaue Kurve das Emissionsspektrum von Hoechst. Lila Bereich: DAPI-Anregungsfilter, hellblauer Bereich: DAPI-Emissionsfilter. Bild zeigt Fluoreszenzaufnahme von mit Hoechst gefärbten Nuclei [Quelle:https://www.thermofisher.com/order/fluorescence-spectraviewer#!/].*

Färbung mit Fluoreszenzfarbstoffen

Hoechst

Hoechst interkaliert in die DNA und dient als Färbung für Zellkerne und so auch als Maß für die Zellzahl. Die Zellen werden, nach dem Fixieren mit 4 % PFA, für 5min mit einer 1:1000 Verdünnung Hoechst gefärbt. Es folgen 3 Waschschritte mit PBS für je 5min. Bei Mehrfachfärbungen wird Hoechst zuletzt gefärbt und z.B. für die letzten 5 min der Färbung mit auf die Zellen getropft.

Nilrot Färbung und Auswertung mit Microplate Reader

Der lipophile fluoreszierende Phenoxazin-Farbstoff Nilrot färbt Lipide in den Zellen an. Er färbt sowohl Phospholipide als auch Lipidvesikel. Die Phospholipide emittieren allerdings Licht anderer Wellenlänge, als die Lipidvesikel. Seine Emissionswellenlänge hängt zudem stark vom Lösemittel ab. In PBS besitzt Nilrot, das an Lipidvesikel gebunden hat eine Anregungswellenlänge von 450-500nm und eine Emissionswellenlänge von 525-605nm, emittiert also im Gelb-Gold-Bereich. Nilrot dient als Maß für die Menge an Lipidvesikeln in den Zellen und zeigt somit den Grad der Adipogenese an. Nilrot wird im Wasser (bzw. PBS) gequenched und stört somit nicht die Messung der Zellen.

Zuerst wird von den 24-well-Platten mit den adipogen-differenzierten Zellen das Medium abgenommen. Dann wird zweimal mit PBS gewaschen. Danach werden die Zellen mit 4%igem PFA 10min bei RT fixiert. Das PFA wird entfernt und zweimal mit PBS gewaschen.

Die Wells werden mit je 200µl PBS beschichtet und die Hintergrund-Fluoreszenzemission mit dem Nilrot- sowie dem Hoechst-Setting im Multilabel Reader gemessen. Die Ergebnisse werden als Excel-Datei gespeichert.

Das PBS wird abgenommen und pro Well 200µl Färbelösung (PBS mit 2µg/ml Nilrot und 2,5µg/ml Hoechst) hinzugegeben. Die Platte wird 15min bei RT im Dunkeln inkubiert.

Die Lösung wird entfernt und dreimal mit PBS gewaschen. Die Wells werden mit je 200µl PBS gefüllt und im Multilabel Reader erneut die Fluoreszenzemissionen gemessen.

Die Hintergrund-Fluoreszenz-Werte werden in Excel von diesen Werten abgezogen. Das Ergebnis sind die reellen Werte der Fluoreszenzemission pro Well.

Die Werte der Nilrot-Fluoreszenzemission werden abschließend auf die Werte der Hoechst-Fluoreszenzemission normiert, um die Menge an Triglyzeriden in den Zellen auf die Zellzahl zu beziehen. Alternativ kann die Nilrot-Fluoreszenzemission auch auf die Fluoreszenzemission von CellTiter Blue normiert werden.

	Multilabel Reader Setting		***Multilabel Reader Setting***
Hoechst33342	355/460 nm	Nilrot	485/535nm

Tabelle 9 Wellenlängen-Einstellungen des Multilabel Readers für den Nachweis der Adipogenese

JC-1

Der Farbstoff JC-1 hat spezielle Eigenschaften, die es ermöglichen, die Polarisierung der Mitochondrienmembranen darzustellen. Das kationische JC-1 ist Membran-permeabel und formt in hohen Konzentrationen (>0,1µM) im Mitochondrium Aggregate, welche im roten Fluoreszenzspektrum (~590 nm) emittieren. Dazu muss das Mitochondrium ein hohes Membranpotential besitzen. Ist das Membranpotential niedrig bzw. depolarisiert, so findet sich JC-1 kaum im Mitochondrium, sondern als Monomer im Zytoplasma und emittiert dort Licht im grünen Fluoreszenzspektrum (~ 530 nm).

Es werden 6-Well Platten mit je 3 Deckgläschen pro Well bestückt. Dann werden $5x10^4$ ASCs pro Well ausgesät mit 3ml Wachstumsmedium. Drei Tage später wird auf osteogenes Differenzierungsmedium mit den Zusätzen (siehe Tabelle 14) gewechselt. 48 h später, an Tag 2 werden die ASCs mit JC-1 gefärbt:

Das Medium wird abgesaugt und die Wells vorsichtig mit PBS gespült. Die Deckgläschen mit den ASCs werden mit 2µg/ml JC-1 in PBS bedeckt und für 20 min im Brutschrank inkubiert.

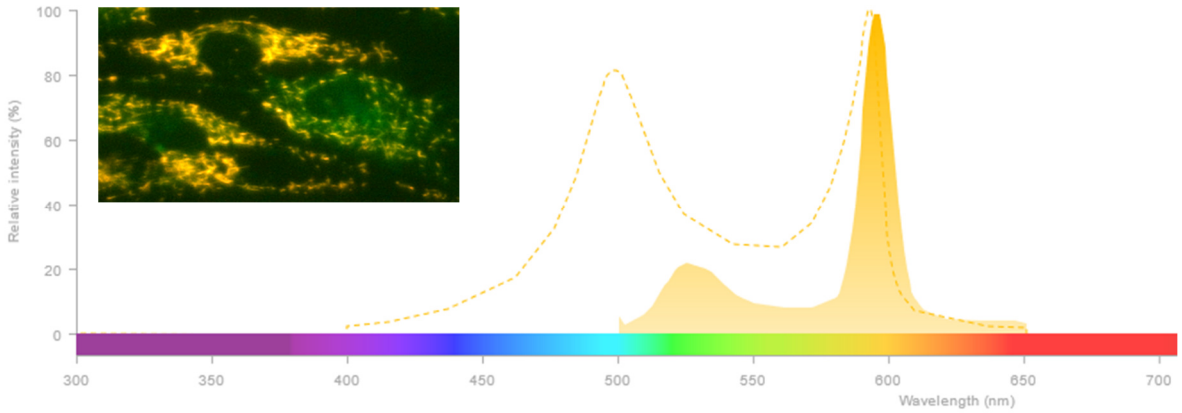


Abbildung 10 Anregungs- und Emissionsspektrum von JC-1. *Die gestrichelten Kurven zeigen das Anregungsspektrum, die gelbe Kurve das Emissionsspektrum. Foto zeigt JC-1 gefärbte Mitochondrien [Quelle:https://www.thermofisher.com/order/fluorescence-spectraviewer#!/].*

	Filter	***Anregungsspektrum***	***Beamsplitter***	***Emissionsspektrum***
Hoechst33342	DAPI	360 ±51 nm	FT440	460 nm
Nilrot	FL1 - Fitc	470 ±22 nm	FT500	520 nm
JC-1	FL2 - PE	545 ±25 nm	FT 570	520, 600 nm

Tabelle 10 Filter-Einstellungen für Fluorophore

Immunfluoreszenzfärbung

Es werden 6-Well Platten mit je 3 Deckgläschen pro Well bestückt. Dann werden $5x10^4$ ASCs pro Well ausgesät mit 3ml Wachstumsmedium. Drei Tage später wird auf osteogenes Differenzierungsmedium mit den Zusätzen (siehe Tabelle 14) gewechselt.

(Je nach Versuch wurden die Zellen an unterschiedlichen Tagen gefärbt)

Das Medium wird entfernt und die Deckgläschen kurz mit PBS gewaschen. Dann werden die Deckgläschen für 10 min mit PFA (4%) bedeckt und die Zellen so fixiert. Dann werden die Deckgläschen 3-mal mit PBS abgespült. Darauf werden die Deckgläschen für 10 min mit 0,2% Triton in PBS bedeckt und so die Zellen permeabilisiert. Danach werden die Deckgläschen für 1h in PBS mit 3% BSA, bei 37°C, geblockt. Danach werden die Platten 3-mal für je 5min mit PBS gewaschen.

Nun werden die Deckgläschen einzeln auf Parafilm gelegt und dort die Zellen gefärbt.

Die Primären Antikörper werden in PBS-T (PBS mit 0.1 % Tween-20) gelöst. Dann wird auf jedes Deckgläschen ein Tropfen der Antikörperlösung getropft und dieses mit einer Pinzette

umgedreht auf den Parafilm (beschriftet!) gelegt. Die Inkubation erfolgt über 2h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C.

Nach 3 maligem waschen mit PBS für je 5 min, wird die Lösung mit dem Sekundärantikörpern auf die nach oben zeigenden Deckgläser getropft. Die Lösung besteht aus PBS-T und dem 2. Antikörper. Die Deckgläschen werden 1h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

Für die letzten 5 min wird zudem Hoechst zur Nucleus-Färbung aufgetropft (als Lösung in PBS-T). Soll auch mit Phalloidin gefärbt werden, so wird dieses als Lösung in PBS-T, 20 min vor Ende aufgetropft.

Nach 3 maligem waschen für je 5min mit PBS werden die Deckgläser abgetropft und dann mit Fluorescence Mounting Medium auf die Objektträger geklebt.

1. AK	***Filter***	***Hersteller***	***Produkt-Name***	***Verdünnung***
α UCP1-mouse	monoclonal	Santa Cruz	sc-518024	1:500
α SOX9-rabbit	monoclonal	Abcam		1:250
α Cyt-c-rabbit	monoclonal	Abcam		1:100
α Col2-rabbit	polyclonal	Santa Cruz	sc-52658	1:1000

2. AK	***Filter***	***Anregungs-spektrum***	***Beamsplitter***	***Emissions-spektrum***	***Verdünnung***
goat α-mouse-Fitc, Abcam	FL1 - Fitc	470 ±22 nm	FT500	520 nm	1:1000
donkey α-rabbit-Northernlights NL557, R&D	FL2 - PE	545 ± 25 nm	FT 570	600 nm	1:750
α Actin Alexa Fluor 488 Phalloidin, Abcam	FL1 - Fitc	470 ±22 nm	FT500	520 nm	1:1000
Hoechst33342, Sigma-Aldrich	DAPI	360 ±51 nm	FT440	460 nm	1:1000

Tabelle 11 Fluorophor-gekoppelte Antikörper

Färbung mit Alizarinrot - Osteogenese

Die Mineralisierung osteogen differenzierter ASC- und DFATs-Kulturen wird mit der Alizarinrot-Färbung quantifiziert. Zur Analyse werden die Zellen zweimal vorsichtig mit PBS gewaschen und 15 Minuten lang mit einer 4 %igen PFA in PBS-Lösung fixiert. Alizarinrot-Lösung (1 % Alizarinrot S in *Aqua dest*) wird sanft auf die fixierte Zellschicht pipettiert. Die Zellen werden 20 Minuten lang bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird der Farbstoff Alizarinrot entfernt und die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen, bis der Überstand klar ist. Für die fotografische Dokumentation wurden die gefärbten Zellen mit PBS beschichtet.

Zur Quantifizierung der Färbung werden 500 µl 10%ige Cetylpyridiniumchloridlösung (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) in jedes Well gegeben und die Platte bei Raumtemperatur 1-2 Stunden inkubiert, bis die gesamte Färbung ausgewaschen (extrahiert) ist. Das farbige Extrakt wird dann in eine Semi-Mikroküvette überführt und bei 600 nm (OD600) in einem Photometer (Eppendorf BioPhotometer plus, Hamburg) analysiert. Bei zu hohen Farbkonzentrationen wird das Extrakt 1:10 mit Aqua dest. verdünnt (die Verdünnung mit 10%iger Cetylpyridiniumchloridlösung bringt gleiche Ergebnisse, wie die Verdünnung mit A. dest.). Die Werte werden in Excel Tabellen übertragen.

Färbung mit Alcianblau - Chondrogenese

Als Nachweis der chondrogenen Differenzierung wird die Färbung von Proteoglykan mit Alcianblau benutzt. Proteoglykane sind ein Hauptbestandteil der EZM des Knorpels.

Zuerst wird von den 24-well-Platten mit den chondrogen differenzierten Zellen das Medium abgenommen. Dann werden die Wells zweimal mit PBS gewaschen. Danach wird der Boden der Wells mit 4%igem PFA bedeckt und die Zellen 30min bei RT fixiert. Das PFA wird entfernt und die Wells werden zweimal mit PBS gewaschen.

Dann werden die Wells mit Alcianblau-Färbelösung befüllt. Für die 24-Well-Platten werden pro Well 500 µl eingesetzt. Die Zellen werden über Nacht bei Raumtemperatur im Dunkeln mit dem Farbstoff inkubiert.

Dann wird die Alcianblau-Lösung abgenommen und die Wells werden dreimal mit PBS gewaschen, bis sich kein überschüssiger Farbstoff mehr in den Wells befindet.

Die Zellen werden mit PBS beschichtet. Dann werden lichtmikroskopische Aufnahmen der Zellen gemacht.

Anschließend wird das PBS entfernt und der, in das saure Proteoglykan der Zellen, eingelagerte blaue Farbstoff kann wieder rückgelöst werden.

Dazu wird eine zuvor hergestellte Lösung aus einem Teil Isopropanol und drei Teilen konzentrierter Salzsäure benutzt.

In jedes Well werden 500 µl dieser Lösung gegeben. Die Platte wird anschließend mit selbstklebender Folie zugeklebt. Dann wird die Patte bei Raumtemperatur im Dunkeln für mindestens vier Stunden gerüttelt.

Anschließend wird die Lösung aus jedem Well photometrisch bestimmt. Es wird die Extinktion (bzw. Optische Dichte)bei 600 nm gemessen. Hierzu wird ein herkömmliches Photometer mit Küvette genutzt, da der Säure-Anteil der Lösung den Multilabel Reader, mit dem eine Messung auch möglich wäre, angreift.

Die Werte werden zuerst aufgeschrieben, dann in Excel übertragen und gespeichert. Sie werden durch die Werte des CellTiter Blues geteilt, um die Menge des Proteoglykans auf die Zellzahl beziehen zu können.

Alkalische Phosphatase Assay

Die Alkalische Phosphatase (ALP) Aktivität ist bei der Osteogenese erhöht und so ein zusätzlicher Nachweis für die osteogene Differenzierung. Phosphate der entstehenden Knochenmatrix werden durch ALP produziert. Der ALP Assay nutzt eine farblose p-Nitrophenylphosphat Lösung, welche durch ALP dephosphoryliert wird und sich so gelb verfärbt.

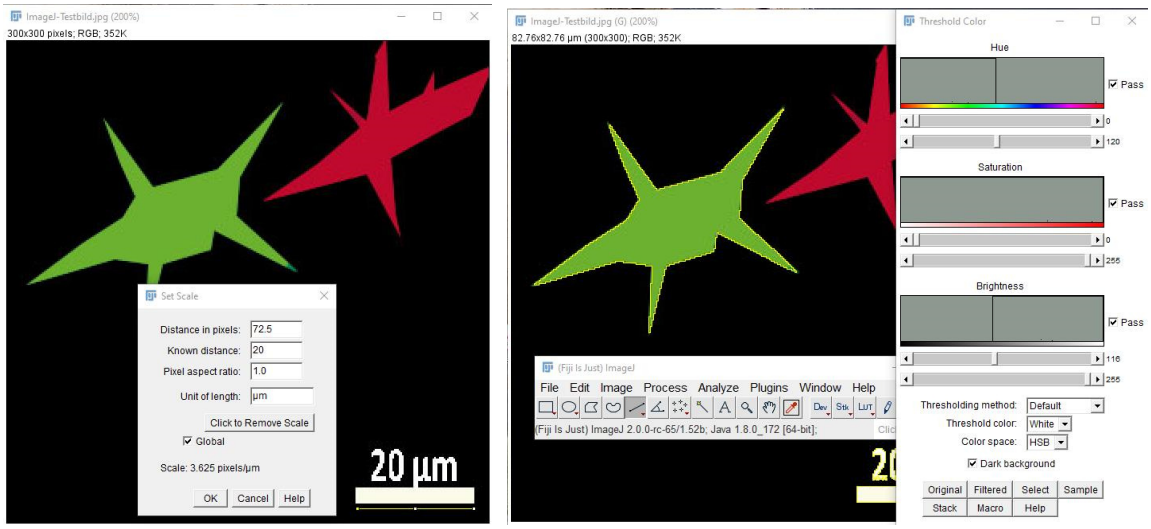
An den Tagen 3, 7, 10 und 14 werden die osteogen differenzierten 24-Well-Platten von PBS befreit. Dann wird 300µl p-Nitrophenylphosphat Lösung pro Well pipettiert. Der Rest der Lösung wird als Blank genutzt. Nach 15 min im Dunkeln werden pro Well jeweils zweimal 10 µl der nun gelblichen Lösung in eine neue 96-Well Platte pipettiert (zweifach Bestimmung) und mit je 90µl Aqua dest. verdünnt (1:10 Verdünnung). Die Absorption der Platte wird im Multilabel Counter bei 405 nm (OD450) gemessen.

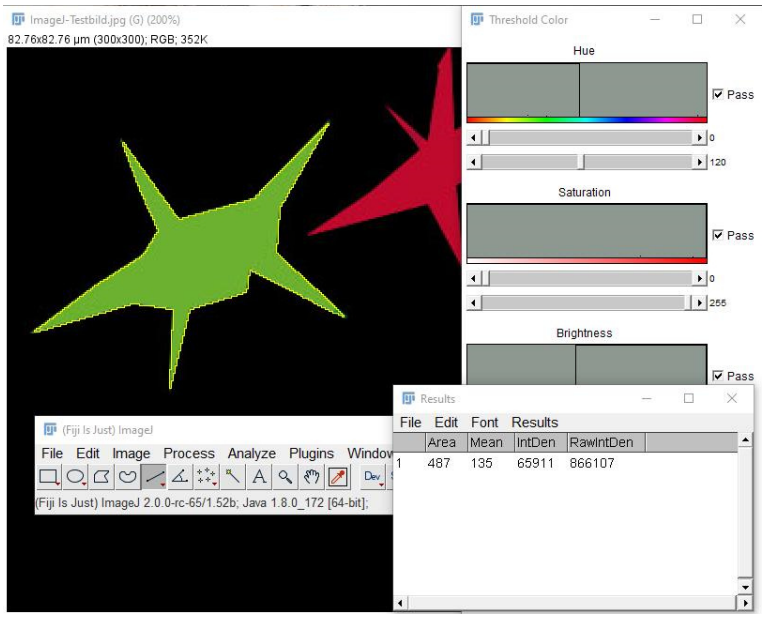
Auswertung mit ImageJ

Das Programm ImageJ (Fiji) wurde zum Auswerten von mikroskopisch aufgenommenen Bildern genutzt. Es wurde zum Auswerten von Fluoreszenzfärbungen von Osteopontin, Collagen II, Aggrecan und SOX9 verwendet sowie Nilrot-Färbungen von Lipiden. Außerdem zum Zählen von Zellkernen und zur Auswertung der JC-1 Färbungen.

Messung von grün fluoreszierenden Flächen

Diese Art der Messung wird genauso auch für rote Flächen genutzt, nur wird für diese im Color Threshold Panel der Schieber „Hue“ auf den roten Bereich verstellt.

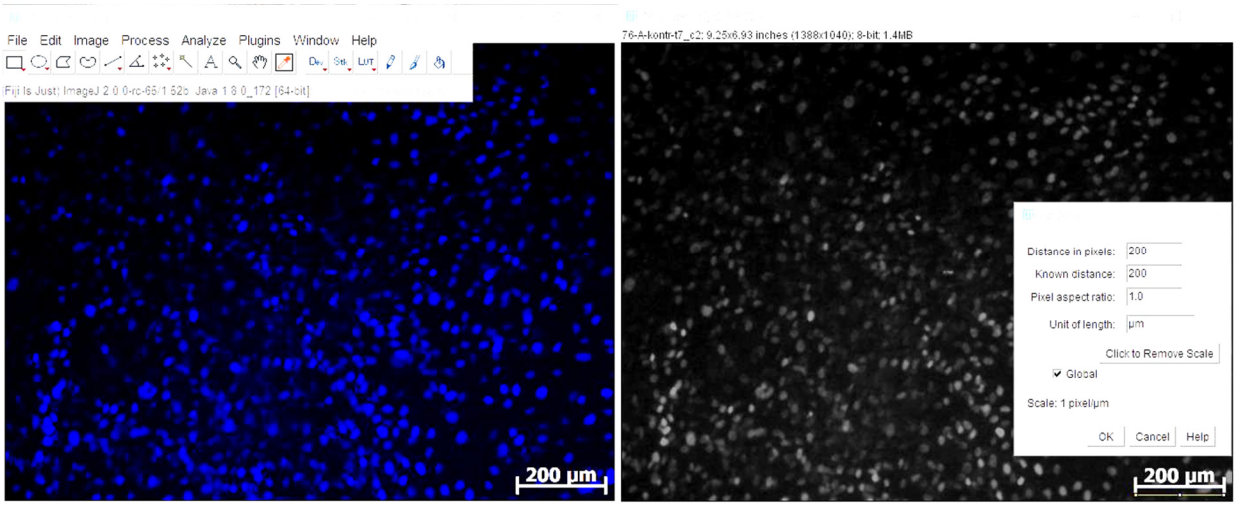




1. Bild öffnen und Linie zeichnen, an Scale Bar. Dann „Set Scale“ und die Pixel-µM-Ratio einstellen. „Global“ anhaken.
2. Dann unter „Threshold Color“ den grün gefärbten Bereich markieren und mit „Select“ auswählen. Diese Einstellungen für alle Bilder des Versuchs beibehalten.
3. Mit „Measure“ kann nun die Raw IntDen gemessen werden.

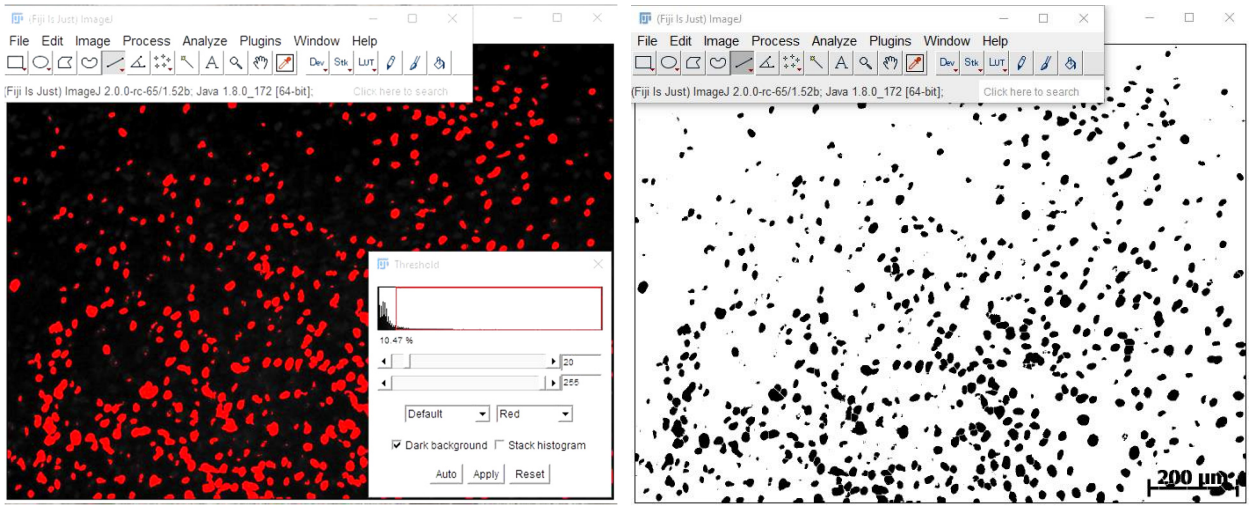
Zellkerne zählen

1. Farbiges Bild in 8-bit Image umwandeln. Dann „Set Scale“ wie in vorigen Messungen.

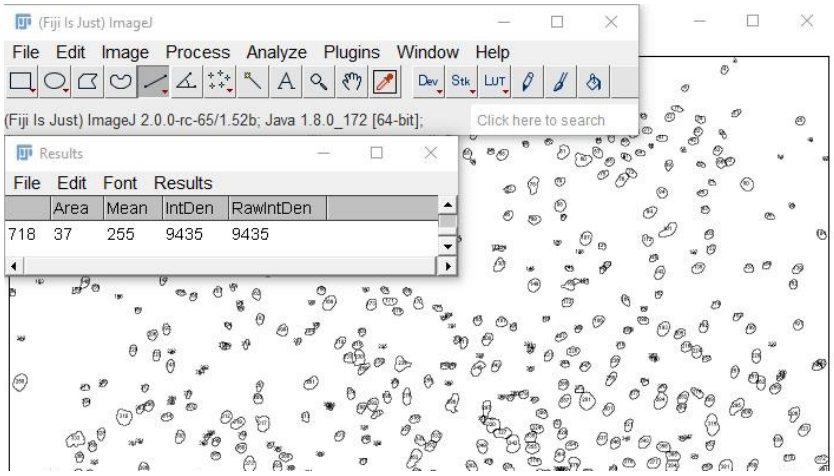


2. Dann den „Threshold“ einstellen, so dass möglichst alle Zellkerne ausgewählt sind.

3. Unter „Process>Binary>Watershed“ können Zellkerne, die als einer umrandet sind, unterteilt werden.

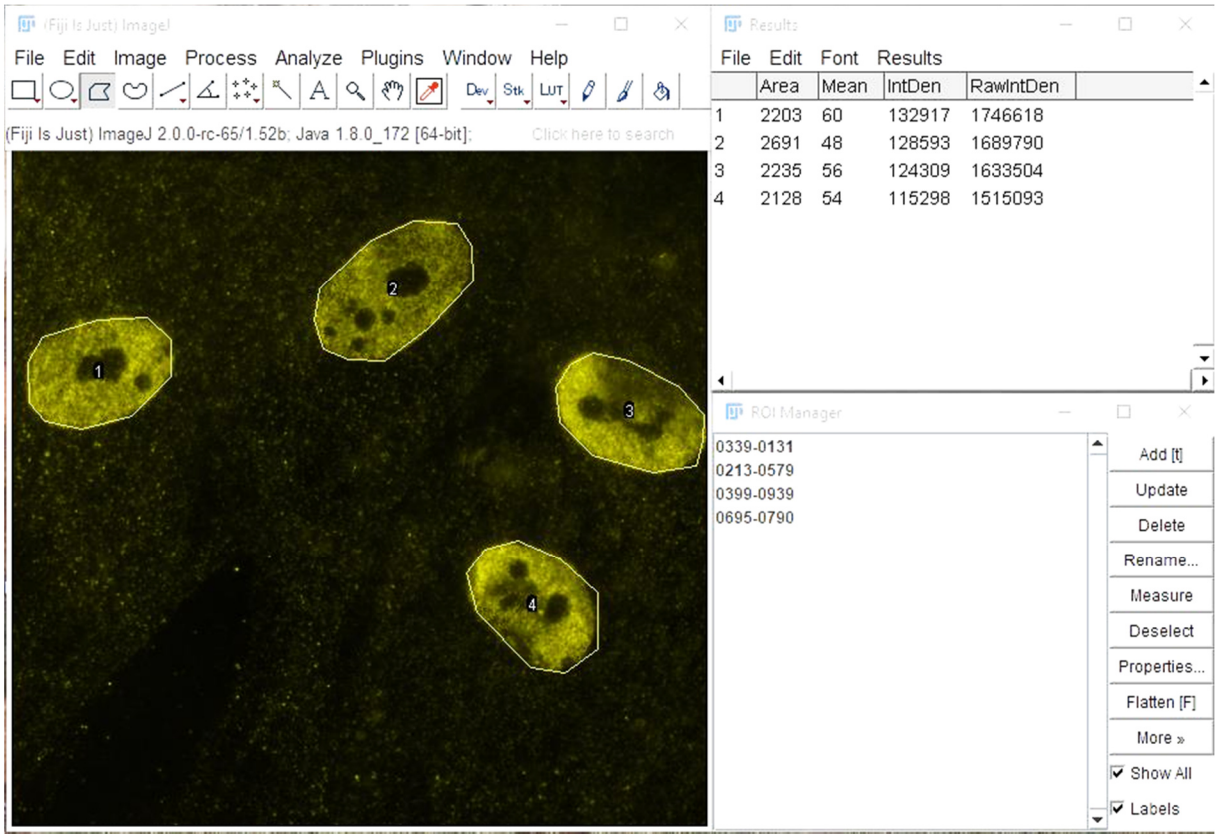


4. „Measure Particles“ zeigt nun und der ersten Spalte die Anzahl der Nuclei im Bild an. Da die Scale Bar auch als einige Partikel gezählt wird, kann man diese davon abziehen.



Messung von SOX9 im Zellkern

1. „Set Scale“ wie in Schritt 1 von „*Messung von grün fluoreszierenden Flächen“*
2. „ROI Manager“ öffnen. Dann händisch den ersten Zellkern umkreisen. Im ROI Manager „Add“ drücken.
3. Alle Zellkerne auf diese Weise hinzufügen.
4. Mit „Measure“ kann die RawIntDen für jeden Nucleus abgelesen werden.



Allgemeines zur ImageJ Auswertung

Die Einheit „Raw Integrated Density ist die Summe aller Pixel-Intensitäten in der festgelegten Fläche (μm_2). Sie ist somit ein Maß für die Fluoreszenz-Intensität der gefärbten Zellen. Ist die Raw Integrated Density hoch, so ist besonders viel Protein vorhanden, wie z.B. SOX9 im Nucleus.

Alle Bilder wurden auf gleiche Weise aufgenommen und ausgewertet, um Fehlerquellen zu minimieren. Für quantitative Ergebnisse wurden mehrere Bilder pro Zusatz (zB. Katalase) ausgewertet und/oder Übersichtsbilder mit großem Ausschnitt und dementsprechend viel Fläche (bei der jeweiligen Färbung finden sich dazu mehr Infos).

Messungen mit Agilents Seahorse XF96 Analyzer

Die Beeinflussung der mitochondrialen Atmung und die Glykolyse lassen sich mit Hilfe des Seahorse XF Analyzer untersuchen.

Der Sauerstoffverbrauch OCR (oxygen consumption rate) sowie die extrazelluläre Ansäuerung ECAR (extracellular acidification rate) werden durch Sensoren für Sauerstoff und pH in jedem Well gemessen.

Das Gerät ist für eine 96-Well Platte gebaut. Auf dieser 96-Well Platte werden die ASCs ausplattiert ($1x10^4$ Zellen /Well). Nach 3 Tagen wird der Deckel der Platte mit dem Bio-Sensor-Cartridge Deckel getauscht.

Der Bio-Sensor-Cartdridge enthält für jedes Well einen Pinn/Hülse mit Sensor für O_2 und Protonen. Es handelt sich dabei um ins Polymer eingegossene Fluorophore. Die Sensoren ragen bis 200µm über den Zellen ins Well, so dass sich eine Micro-Kammer von 2-6 µl zwischen Pinn und ASC-Monolayer bildet. In dieser Kammer lassen sich O_2 und Protonen genau bestimmen.

Dazu wird vom Analyzer in jeden Pinn/Hülse ein Glasfaserbündel abgesenkt, welches Lichter zweier Wellenlängen emittiert, welche die beiden eingegossenen Fluorophore anregen. Der eine Fluorophor wird durch O_2 gequenched und emittiert somit stärker, wenn weniger O_2 vorhanden ist. Der zweite Fluorophor ist sensitiv gegen Protonen und emittiert stärker, wenn von diesen mehr vorhanden sind.

Jedes Well des Bio-Sensor-Cartridge enthält außerdem noch 4 Injektions-Öffnungen, in welche mittels Pipette verschiedene Substanzen gegeben werden können. Damit lassen sich verschiedene Test durchführen:

Mitochondrien Stress Test

Mit diesem Test wird die mitochondriale Atmung untersucht. Durch zeitlich aufeinander folgende Einspritzungen von 4 Chemikalien lässt sich die Atmungskette gezielt ansteuern:

Zuerst misst der Analyzer im Zeitraum von 14,2 min 3 mal die basale Respiration (als OCR). *Der 12. Messwert wird vom 3. Abgezogen, um den Wert der basalen Respiration zu ermitteln.*

Dann wird Oligomycin eigespritzt. Dieses inhibiert die ATP Synthase (Komplex V). Der Sauerstoffverbrauch (OCR) sinkt, da der Verbrauch durch die ATP-Produktion wegfällt. Bis zur 33,7 min finden 3 weitere Messungen statt. *Der 6. Messwert wird vom 3. Abgezogen, um*

die ATP-Produktion der ATP Synthase zu ermitteln. Der 12. Messwert wird vom 6. abgezogen, um den OCR-Wert des Protonen Leak zu ermitteln.

Nun wird FCCP (Carbonylcyanid-4 (trifluoromethoxy) phenylhydrazon) eingespritzt. Dieses entkoppelt die Atmungskette durch eine Permeabilisierung der Mitochondrienmembran für Protonen. Protonen können in die Mitochondrienmatrix strömen und führen zu einer maximalen Atmung. Bis zur 53,2 min finden 3 Messungen statt. *Der 6. Messwert wird vom 9. abgezogen, um den Wert der maximalen Respiration zu ermitteln. Der 3. Messwert wird vom 9. abgezogen, um den Wert der zusätzlichen Atemkapazität zu ermitteln.*

Im letzten Schritt wird eine Kombination aus Rotenon (Inhibitor Komplex I) und Antimycin A (Inhibitor Komplex III) gespritzt. Diese inhibieren die Atmungskette vollständig. Es wird nur noch ein nicht-mitochondrialer Sauerstoffverbrauch gemessen. In drei Messungen *(10, 11 und 12)* bis zur 72,8 Minute.

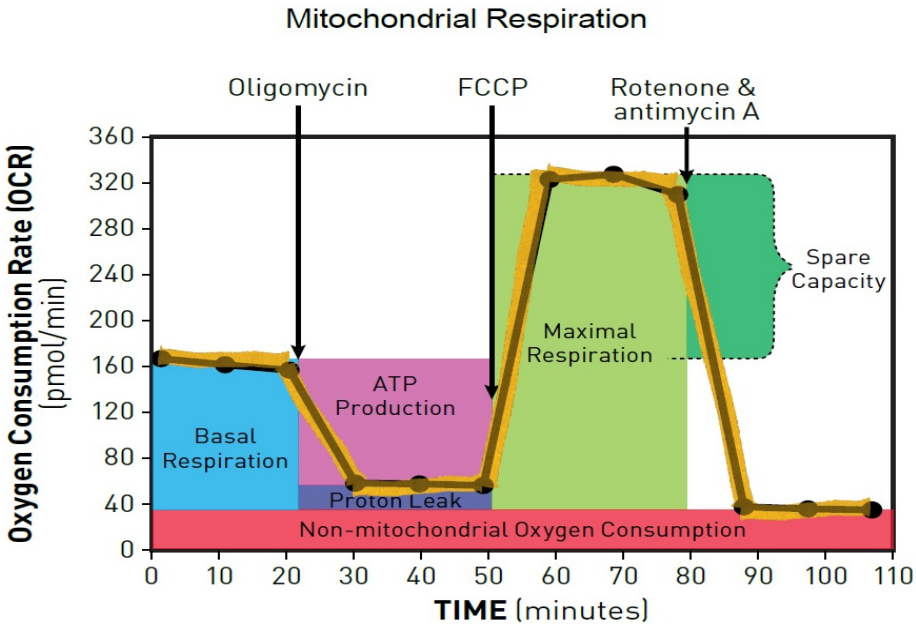


Abbildung 11: Beispielkurve für den Sauerstoffverbrauch bei der mitochondrialen Atmung ermittelt durch den Mitochondrien Stress Test. Abbildung aus Agilents Seahorse Report Generator

Glykolyse Stress Test

Mit diesem Test wird die zelluläre Glykolyse untersucht. Durch zeitlich aufeinander folgende Einspritzungen von 3 Chemikalien lässt sich diese gezielt beeinflussen:

Zuerst misst der Analyzer im Zeitraum von 14,2 min 3 mal die extrazelluläre Ansäuerung (als ECAR) ohne Zugabe von Glukose oder Pyruvat im Medium.

Dann wird eine gesättigte Lösung von Glukose eingespritzt. Diese wird als Substrat der Glykolyse genutzt. Neben Pyruvat, ATP, NADH und Wasser, entstehen Protonen, die ins Medium abgegeben, durch die gesteigerte ECAR dargestellt werden. Dies stellt die ECAR der basalen Glykolyse dar. Es erfolgen 3 Messungen bis zur 33,7 min. *Der ECAR Wert der 3. Messung (die nicht-glykolytische-Ansäuerung) wird von dem Wert der 6. Messung abgezogen, dies ist dann der ECAR der Glykolyse.*

Dann wird Oligomycin eingespritzt. Dieses inhibiert die ATP Synthase-Aktivität. Die Energie-Produktion ist nun allein über die Glykolyse möglich. Die maximale Glykolyse Kapazität wird durch einen stark erhöhten ECAR sichtbar. Bis zur 53,2 min finden 3 Messungen statt. *Der ECAR Wert der 3. Messung (die nicht-glykolytische-Ansäuerung) wird von dem Wert der 9. Messung abgezogen, dies ist dann der ECAR der Glykolytischen Kapazität.*

Im letzten Schritt wird das Glucose-Analog 2-Deoxy-Glucose (2-DG) eingespritzt. Dieses inhibiert die Glukose-Hexokinase, das erste Enzym des Glykolyse-Zyklus. Es wird nur ECAR gemessen, der nicht mit der Glykolyse zu tun hat. In drei Messungen bis zur 72,8 Minute. *Der ECAR Wert der 9. Messung (die Glykolytische Kapazität) wird von dem Wert der 12. Messung abgezogen, dies ist dann der ECAR der Glykolytischen Reserve.*

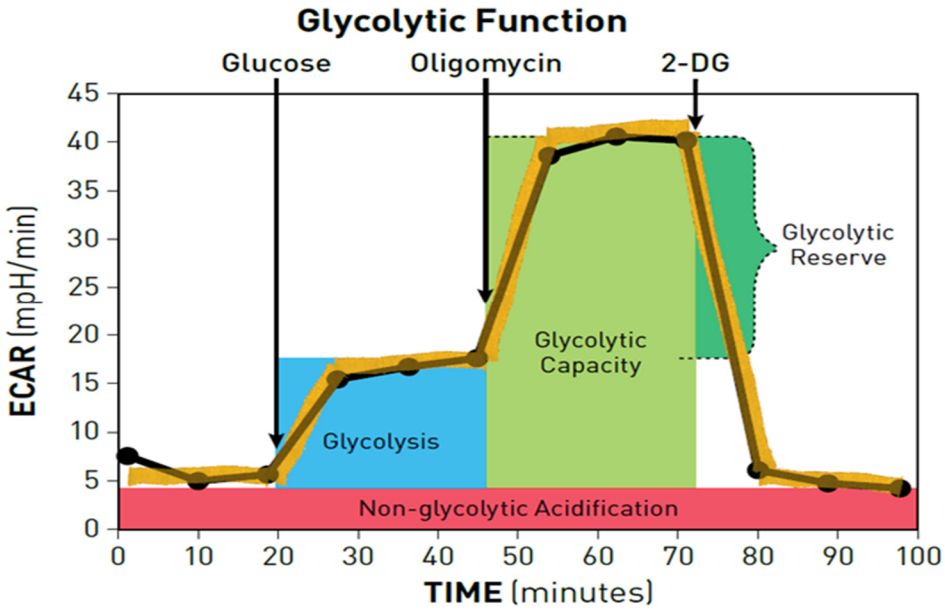


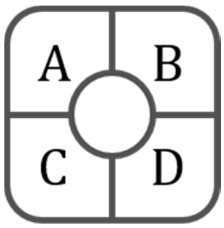
Abbildung 12 Beispielkurve für die extrazelluläre Ansäuerung bei der Glykolyse ermittelt durch den Glykolyse Stress Test. Abbildung aus Agilents Seahorse Report Generator.

Vorbereitungen der Zellen für die Tests

Die ASCs und DFATs werden für diese Versuche jeweils aus 3 Spendern gepoolt. Es werden $1x10^4$ Zellen pro Well auf die 96 Well Agilent Platten ausplattiert. Die 36 leeren Background-Wells erhalten nur Medium. Über 24h bei 37°C (5% CO_2) dürfen die Zellen anwachsen. Dann werden in jeweils 30 Wells mit Zellen 250 U Katalase oder 30mM Lactat hinzugegeben. Weitere 30 Wells mit Zellen dienen als Kontrolle. Die Platten werden für weitere 24h inkubiert. In diesen 24 h werden auch die Bio-Sensor Cartridges hydriert. Dafür werden sie in sterilem Wasser in ihre Utility-Platten (untere Platte) gesteckt und bei 37°C (ohne CO_2) inkubiert. Zudem werden je Platte 15 ml XF Calibrant-Lösung in ein Falcon Tube gefüllt und im gleichen Brutschrank inkubiert.

Am nächsten Tag wird das Wasser der Platten gegen das XF Calibrant ausgewechselt (200µl/Well) und für 1h unter gleichen Bedingungen inkubiert.

Es wird das Assay-Medium (Seahorse XF DMEM Medium, pH 7.4) mit 2mM Glutamin auf 37°C erwärmt. Außerdem werden die Lösungen für die Injektions-Öffnungen der Bio-Sensor Cartridge vorbereitet.



Bio-Sensor Cartridge Befüllung der Injektions-Öffnungen für die Tests:

Test	***A***	***B***	***C***	***D***
Glyco-Stress	Glucose 10 mM	Oligomycin 1µM	2-DG 50 mM	-
Mito-Stress	Oligomycin 1,5µM	FCCP 1 µM	Rotenon/AntimycinA 0,5µM	-

Tabelle 12 Bio-Sensor-Cartridge Befüllung

Das Medium der 96 Well Platten wird gegen das erwärmte Assay-Medium getauscht (180µl/Well). Die Platten werden für 1 h bei 37°C (ohne CO_2) inkubiert. In der Zeit wird die Bio-Sensor Cartridge befüllt. Dann kommt diese mit ihrer Utility-Platte in den Analyzer. Die Kalibrierung mit der Software Wave dauert 15-30 min. Danach wird die Utility-Platte gegen die Platte mit den Zellen ausgetauscht und der Assay gestartet.

Mit der Software Seahorse Wave, Excel und dem damit gekoppelten Report Generator werden die Daten ausgewertet.

Zellkulturmedien und Materialien

Medium für:	***Medium***	***Zusatz***	
Wachstum	DMEM high Glucose	FCS	*10%*
		L-Glutamin	*4mM*
		FGF2	*2ng/ml*
		Pen/Strep	*1%*
Adipogene Differenzierung	DMEM:F12	nur für 1.Woche: IBMX	*0,5mM*
		Insulin	*66nM*
		Dexamethason	*10^{-6}M*
		Triiodthyronin	*1nm*
		Transferrin	*10µg/ml*
		Pioglitazon	*0,1µg/ml*
		Pen/Strep	*1%*
Chondrogene Differenzierung	DMEM high Glucose	FCS	*1%*
		TGF-β	*10ng/ml*
		L-Ascorbinsäure	*50nM*
		Insulin	*1,125µM*
		Pen/Strep	*1%*
Osteogene Differenzierung	DMEM high Glucose	FCS	*10%*
		Dexamethason	*100nM*
		L-Ascorbinsäure	*50µM*
		Glycerophosphat	*10mM*
		Pen/Strep	*1%*

Tabelle 13 Zusammensetzungen der Zellkulturmedien

Die Zellen werden mit dem gleichen Differenzierungsmedium inkubiert. Allerdings enthält das Medium verschiedene Zusätze, deren Wirkung auf die Zellen überprüft werden soll. Die genutzten Konzentrationen in den Medien wurden zuvor auf ihre Wirksamkeit recherchiert. Sie

wurden in allen Versuchen beibehalten, außer, wenn andere Konzentrationen in den Graphiken angegeben sind.

Bezugsfirma für alle Zusätze ist: Sigma-Aldrich, Steinheim.

Abkürzung	***Name***	***Funktion***	***Genutzte Konzentrationen***
Kat	Katalase	Antioxidatives Enzym mit H_2O_2 als Substrat	250 U
H_2O_2	Wasserstoffperoxid	ROS, Substrat der Katalase, diverse Funktionen als Second Messenger	100 µM
Lac	L-Lactat	Substrat für Citrat-Zyklus, über Pyruvat, induziert außerdem „Browning“ der ASCs	30 mM
CT-98014	2‘,5‘-Dideoxyadenosin	GSK3 Inhibitor, induziert Adipogenese	1 µM
For	Forskolin	Adenylatcyclase-Aktivator, induziert "Browning“ der ASCs	20 µM

Tabelle 14 Zusätze zu den Zellkulturmedien.

Medium	***Beschreibung***	***Bezugsquelle***
DMEM high und low Glucose (4,5 g oder 1 g /L)	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	Gibco,Thermo Fisher, Waltham, USA
DMEM:F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nährstoffmischung F-12	Gibco,Thermo Fisher, Waltham, USA
FCS	fetales Kälberserum	PAN-Biotech, Aidenbach

Tabelle 15 Zellkulturmedien

Chemikalien/ Antikörper	***Beschreibung***	***Bezugsquelle***
PBS	pH= 7,4 GIBCO	Invitrogen, Darmstadt
Trypsin/EDTA	0,05% / 0,02%	BioChrom, Berlin
L-Glutamin		
Trypanblau		Sigma-Aldrich, Steinheim
Nilrot	Fluoreszenzfarbstoff für Lipide	
Hoechst	Fluoreszenzfarbstoff für DNA	
Alcianblau	Farbstoff für Proteoglycan	
Ascorbinsäure		
Insulin		
CellTiter-Blue		Promega, Mannheim
Ethanol		Merck, Darmstadt
CellWash		
Sodiumdodecylsulfat	SDS	
PFA, Paraformaldehyd		Roth, Karlsruhe
Isopropanol		
Salzsäure		
Acrylamid	30%	
Glycin		
Milchpulver		
Mercaptoethanol		
Roti-Mark Proteinmarker	Anti-Western	
Tetramethylethylendiamin	TEMED	
Ponceau S		SERVA, Invitrogen, Karlsruhe
Antikörper für Westernblots, IF und FACS		Santa Cruz Biotechnology, oder Abcam
Tween 20		Sigma-Aldrich
Trypsin/EDTA	in PBS,ohne Ca2+, Mg2+	Biochrom, Berlin
Kollagenase Typ I	NB5 von Serva	Sigma-Aldrich oder SERVA
L-Lactat	Natrium-L-lactat	Sigma-Aldrich
Citrat	Natriumcitrat-Dihydrat	Sigma-Aldrich
Fluorescence Mounting Medium		Agilent, Dako, Waldbronn

Tabelle 16 Chemikalien

Gebrauchsmaterial	***Beschreibung***
12, 24,96 well-Microtitierplatten	CytoOne 12/24-well TC plate Greiner 96 –Well CELLSTAR®
Eppendorf Tubes	Eppendorf Safe-Lock Tubes™ 1,5ml
Cryo Tubes	Greiner bio-one Cryo.s ™ Einfrierröhrchen 2ml™
Falcons	GREINER 15, 50 ml
Pasteurpipetten	BRAND GmbH + CO KG Pasteurpipetten ISO 7712

Stripetten	Costar® 5/10/25 ml shorty Stripette® Serological Pipets
Zellschaber	GREINER BioOne Cell Scraper, blue, 40cm
Zellkulturflaschen	CELLSTAR® Cell Culture Flasks 75cm^2 red filter cap
Zentrifugenröhrchen	15ml, 50ml
Dispenser-Tips	Eppendorff
Adhesive Plate Seals	SelbstklebendeFoliefür Well-Platten
Glasfaserfilter	PreprintFiltermat
Sterilfilter	Millipor, 0,2µm

Tabelle 17 Gebrauchsmaterial.

Geräte	***Beschreibung***
Analysewaage	
Abzug	Waldner
Multilabel Reader	Perkin Elmer Victor3^{TM} V Multilabel Counter model 1420
Brutschrank	Thermo elctron Corporation HERAcell®150
Durchflusszytometer	FACSCalibur BD Biosciences
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss Axiovision
Fluoreszenz/Lichtmikroskop	Zeiss Axiovert40
Wasserbad	Fisher Scientific drybath
Pipetten	Eppendorf Research®fix
Steril-Werkbank	Thermo Electron Corporation HERAsafe®
Zentrifugen	Thermo Scientific Haraeus Pico 17 Microcentrifuge
	Thermo Scientific Haraeus Megafuge 16 R
Multipette, Dispenser	Eppendorf Multipette
Pipettierhilfe	Pipettboy
Zählkammer	Neubauer
Kühlschrank	6°C
Mr. Frosty™ Freezing Container	Thermo Scientific
Gefrierschrank	-20 °C , -80 °C
Seahorse XF96 Analyzer	Agilent Technologies

Tabelle 18 Geräte

Ergebnisse

ASCs und DFATs lassen sich aus humanem Fettgewebe gewinnen und kultivieren

Aus dem Fettgewebe sämtlicher Spender war es stets möglich, sowohl ASCs zu isolieren, als auch Adipozyten. Die Adipozyten wurden daraufhin mittels Ceiling-Culture erfolgreich zu DFATs dedifferenziert. Beide Zelltypen weisen eine typische Fibroblasten-ähnliche Morphologie auf (Abb. 13). Adipozyten sind zum Beginn der Kultur frei im Medium oben schwimmend zu finden. Die Zellen sind Kugel-förmig und mit einer großen Lipidvakuole gefüllt, wie die Färbung mit dem Lipid-Farbstoff Nilrot zeigt (siehe Abb. 14). Die Fettzellen haben Kontakt zur oberen Plastikfläche, da die Kulturflasche ganz gefüllt ist und sie mit ihrem Fettanteil leichter sind, als das wässrige Medium. Der Plastikkontakt ist als Reiz für die Dedifferenzierung ausreichend. Am zehnten Tag sind die Adipozyten fast vollständig dedifferenziert. Zellen die bis dahin noch nicht fest gewachsen sind, werden beim Umdrehen der Kulturflasche und anschließendem Mediumswechsel entfernt. An Tag 10 werden die DFATs zudem meist schon gesplittet, um die Zellen weiter zu vermehren.

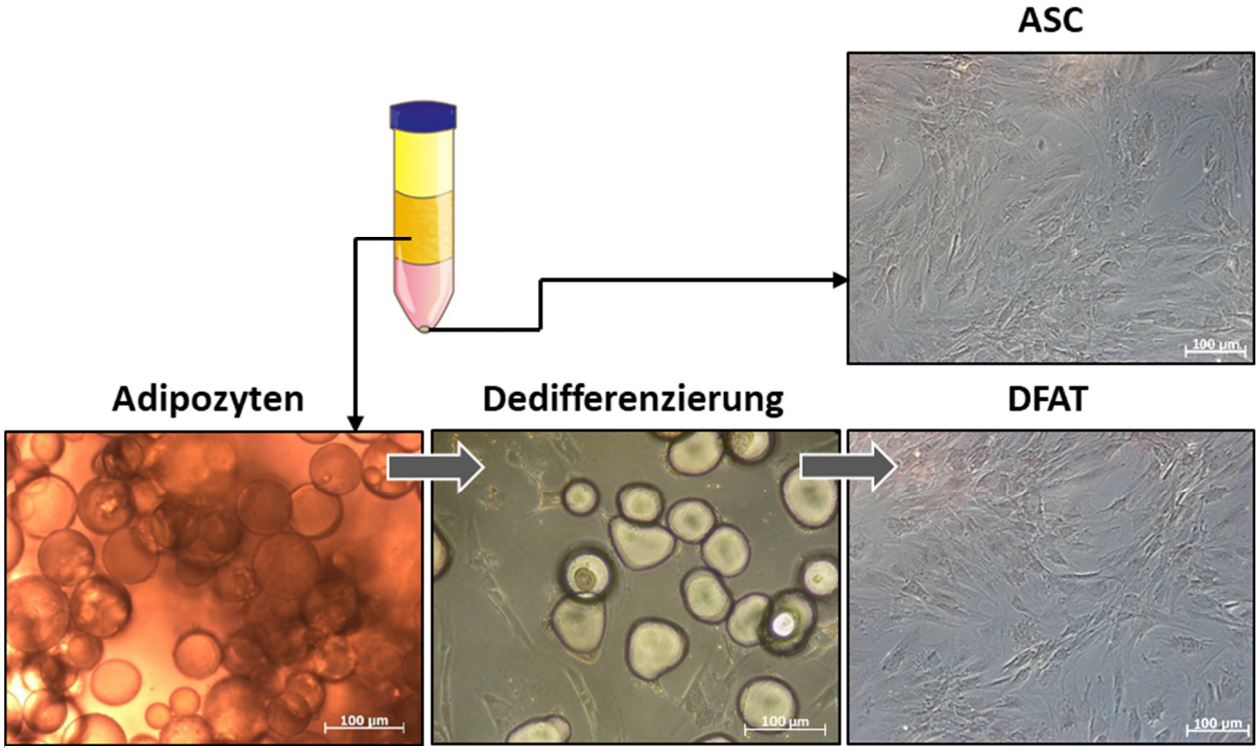


Abbildung 13 ASCs und DFATs aus der Isolation aus Fettgewebe. Linkes Bild zeigt frei schwimmende Adipozyten im rötlichen Medium. Die anderen Bilder zeigen Aufnahmen von Plastik-adhärenten Zellen im Phasenkontrast

Die Abb. 14 zeigt den Prozess der Dedifferenzierung von zuvor markierten Adipozyten. Hierbei ist zunächst eine Streckung der Zellen in zwei Richtungen erkennbar, kombiniert mit einer Splittung der großen Lipid-Vakuole in viele Kleinere. Es findet entweder asymmetrische Zellteilung statt, wobei entweder eine Zelle mehr Lipidvakuole behält (Zelle 2) oder die Vakuolen ähnlich groß in ihrem Volumen sind (Zelle 4). Mit der Zeit verlieren die meisten Zellen ihr gespeichertes Fett und bekommen einen Fibroblasten-Phänotyp (z B. bei Zelle 2). Zellen 1 und 3 zeigen auch nach 10 Tagen noch dominante Vakuolen. Um sie herum ist bereits die gesamte Fläche mit DFATs zugewachsen. Es wurden zudem mehrfach Zellteilungen auch von Zellen mit großen Lipid-Vakuolen beobachtet (siehe Zelle 4).

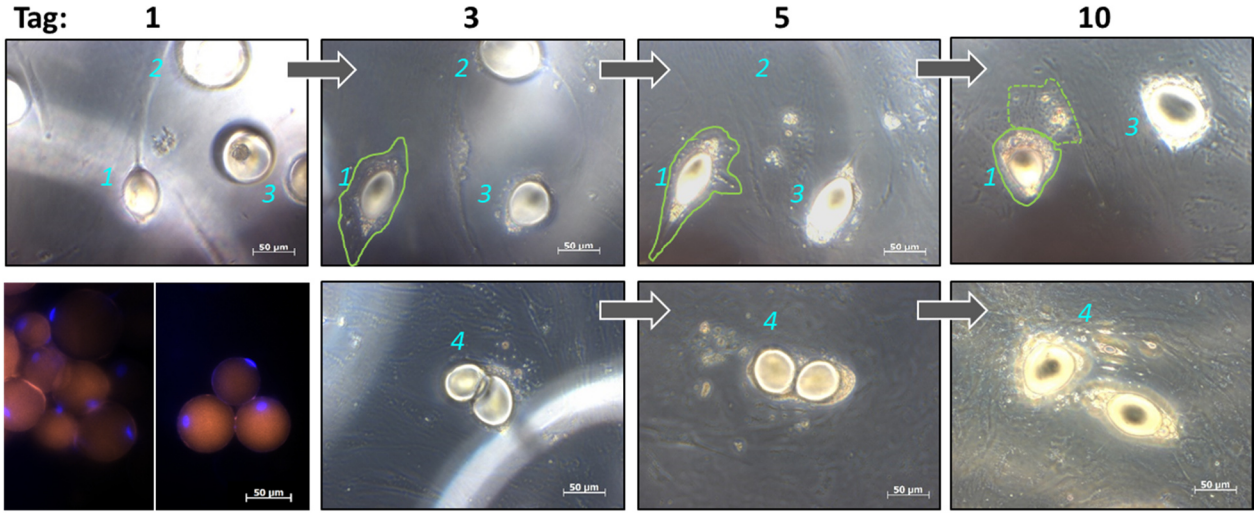


Abbildung 14 Dedifferenzierung von Adipozyten im Zeitverlauf. Die blauen Nummern identifizieren einzelne Zellen. Hellgrün umrandet ist Zelle 1, die sich im Verlauf teilt. Unten links: Fluoreszenzfärbung von frei in Medium schwimmenden univakuolären Adipozyten mit Lipidvakuole (Nilrot-orange) und Zellkern (Hoechst-blau).

ASCs und DFATs lassen sich in Knorpel-, Knochen- und Fettzellen differenzieren und exprimieren typische mesenchymale Stammzell-Marker

Sowohl ASCs als auch DFATs ließen sich experimentell in alle drei Zelltypen differenzieren, die als Kriterium für mesenchymale Stammzellen zählen. Die Chondrogenese wurde über einen Zeitraum von 24 Tagen induziert. Knorpelgewebe-typische Extrazelluläre Matrix (EZM) wurde mit dem Farbstoff Alcianblau angefärbt. Beide Zelltypen waren somit im Stande zu Chondrozyten zu differenzieren, welche diese EZM bilden. Beide Zelltypen ließen sich problemlos über 21 Tage in Adipozyten differenzieren. Die Redifferenzierung der DFATs in ihre Ursprungszellen war somit möglich. Adipozyten wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Nilrot gefärbt. Dieser färbt mit Lipiden gefüllte Vesikel oder Vakuolen an.

ASCs und DFATs ließen sich über 14 Tage mit deutlichen Spender-Unterschieden osteogen differenzieren. Die Osteogenese und somit die Bildung von Osteozyten wurde mittels Alizarinrot-Färbung nachgewiesen. Dieser Farbstoff färbt kalzifizierte EZM rot an. Beide Zelltypen zeigen sich stark ähnelnde mesenchymale Stammzellmarker-Profile in Passage 2. Einige ASCs zeigten kleine Restbestände an Zellen, die positiv für CD34 sind. Dieses Antigen ist unter anderem auf vaskulären Endothelzellen zu finden. Eine leichte Verunreinigung der ASCs mit solchen Subpopulationen ist nicht ungewöhnlich. Bei anderen Versuchen war es uns möglich aus dieser Subpopulation mikrovaskuläre Endothelzellen zu isolieren. DFATs sind deutlich homogener in ihrem CD-Marker-Profil. Beide Zelltypen waren zudem für BMP1 und TGFβ Rezeptoren negativ, welche eine wichtige Rolle bei Osteo- und Chondrogenese spielen. Der für Fettzellen typische Rezeptor PPARγ war jedoch deutlich bei beiden Zelltypen zu finden. Anhand dieser Ergebnisse zeigt sich eine große Ähnlichkeit von ASCs und DFATs.

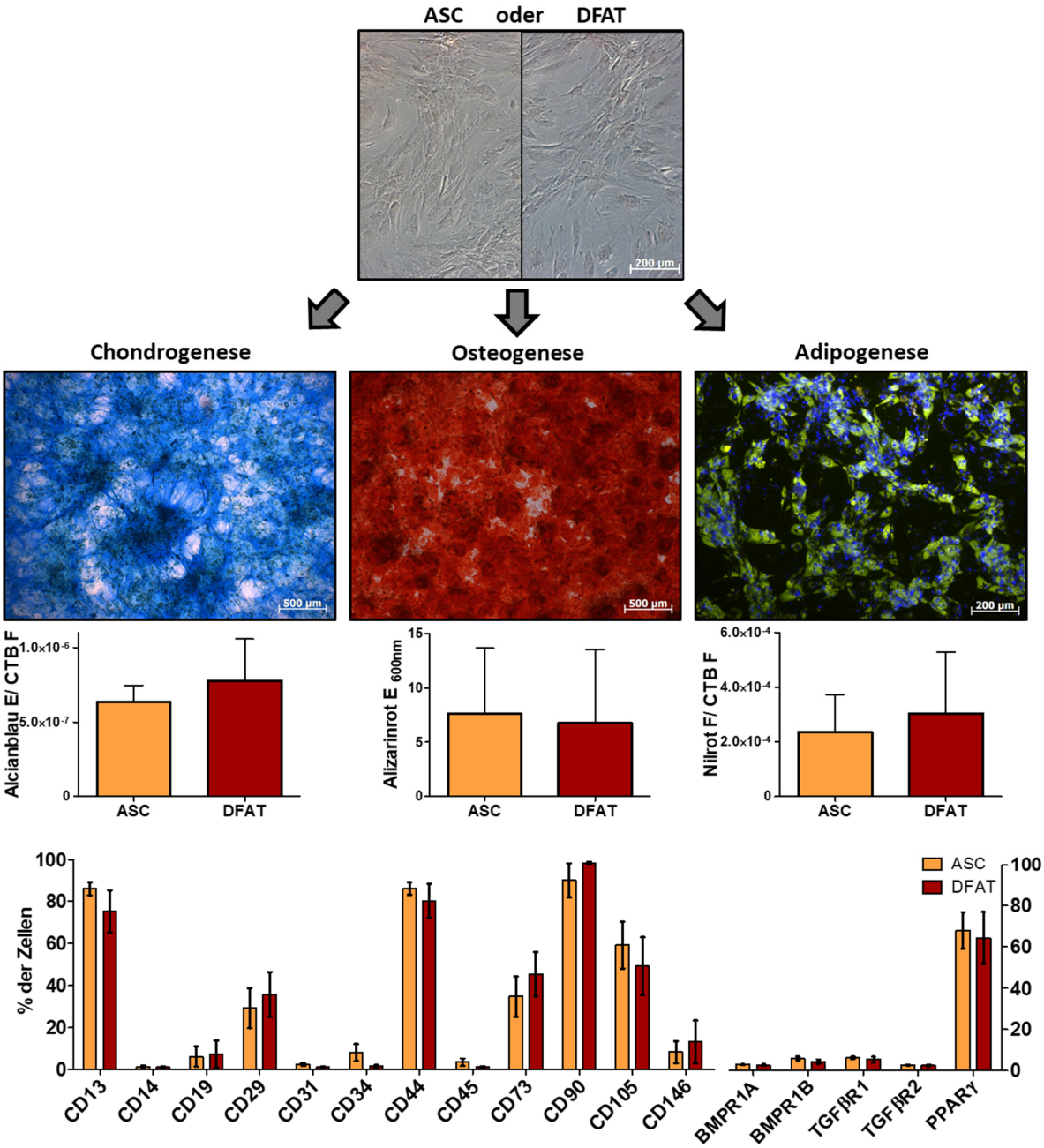


Abbildung 15: Drei-Linien-Differenzierungspotenzial von ASCs und DFATs. Chondrogenese angefärbt mit Alcianblau an Tag24, darunter die Alcianblau Emission normiert auf CTB Fluoreszenz. Osteogenese an Tag14 angefärbt mit Alizarinrot, darunter die Alizarinrot Emission. Adipogenese an Tag21 angefärbt mit Nilrot (grün), Zellkerne mit Hoechst (blau). Darunter die Nilrot Fluoreszenz normiert auf CTB F. CTB als Maß für die Zellzahl. Adipo- u. Chondrogenese n=6, Osteogenese n=15 MW ± SD. Unterer Graph: FACS von n=6 mit ±SEM.

Das osteogene Potential von ASCs und DFATs jedes Spenders ist unterschiedlich

Bei der osteogenen Differenzierung konnte eine Bandbreite an verschiedenen osteogenen Potentialen der verschiedenen Spenderzellen festgestellt werden. Innerhalb von 14 Tagen konnten die Zellen eines Spenders gar nicht oder kaum differenzieren, während die ASCs und DFATs eines anderen Spenders sogar schon am Tag 7 deutlich differenziert waren. Im weiteren Verlauf bis Tag 14 zeigten solche Spender sehr stark differenzierte Zellen, die durch die stark rote Färbung mit Alizarinrot deutlich wird. Meistens reagierten ASCs und DFATs eines Spenders gleich, es gab aber auch Ausnahmen (siehe Abb. 16 Low-Responder). Zellen die schlecht differenzierten werden als Low-Responder bezeichnet, gut differenzierende Zellen als High-Responder.

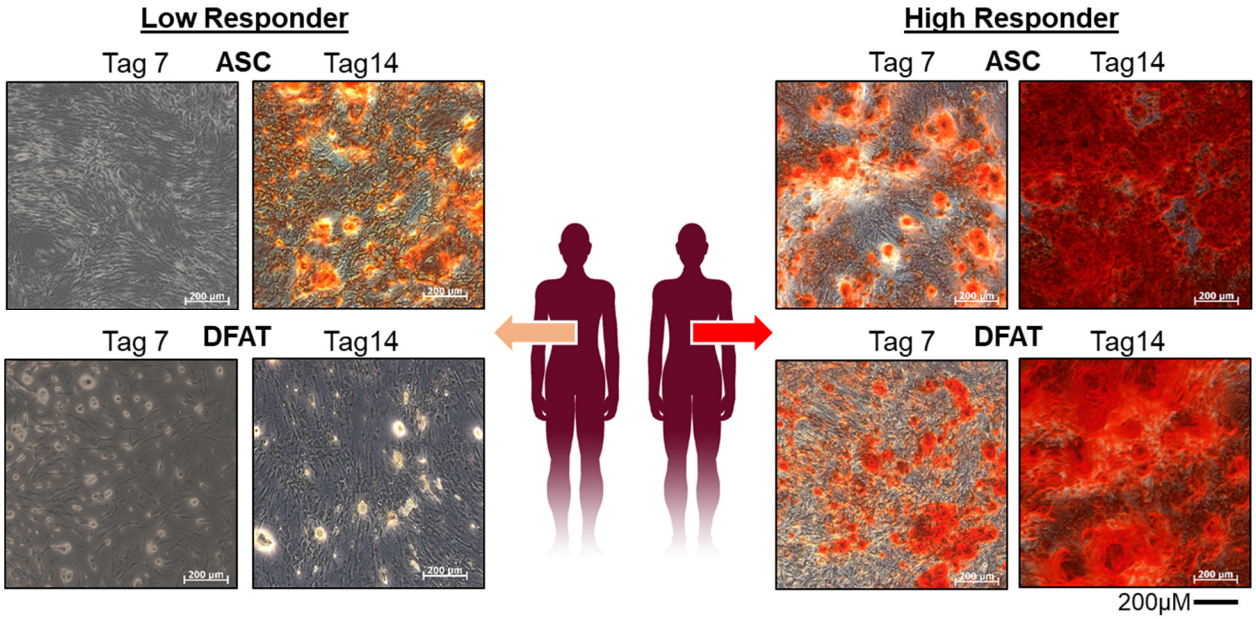


Abbildung 16: Osteogenese von ASCs und DFATs von einem Low- und einem High Responder Spender. Alizarinrot färbt kalzifizierte EZM rot. Aufnahmen im Phasenkontrast 1.

Oxidativer Stress durch H_2O_2 als möglicher Grund für die unterschiedliche Performance von Spender Zellen

H_2O_2 Zugaben haben entscheidenden Einfluss auf die osteogene Differenzierung. Mit steigenden Konzentrationen sinkt auch die Osteogenese von ASCs und DFATs. Bei einer Konzentration von 100 µM findet schon eine um ca. 50% verringerte Osteogenese statt (Abb. 17A). Mit höheren Konzentrationen kann die Osteogenese vollständig gehemmt werden. Allerdings haben höhere H_2O_2 Konzentrationen Auswirkung auf die Zellvitalität. So ist eine Zugabe von 200 µM H_2O_2 schon mit erheblicher Minderung der Zellvitalität und somit Zellzahl

einhergehend (Abb. 17B). Eine Konzentration von 100µM verringerte die Zellzahl der ASCs kaum und bei DFATs konnte bis Tag 14 sogar weiteres Zellwachstum beobachtet werden. Für die weiteren Experimente wurde deswegen die Konzentration von 100 µM H_2O_2 gewählt. Die Wirkung von H_2O_2 hemmte zudem sowohl bei Low- als auch bei High-Respondern die Osteogenese (Abb. 17C).

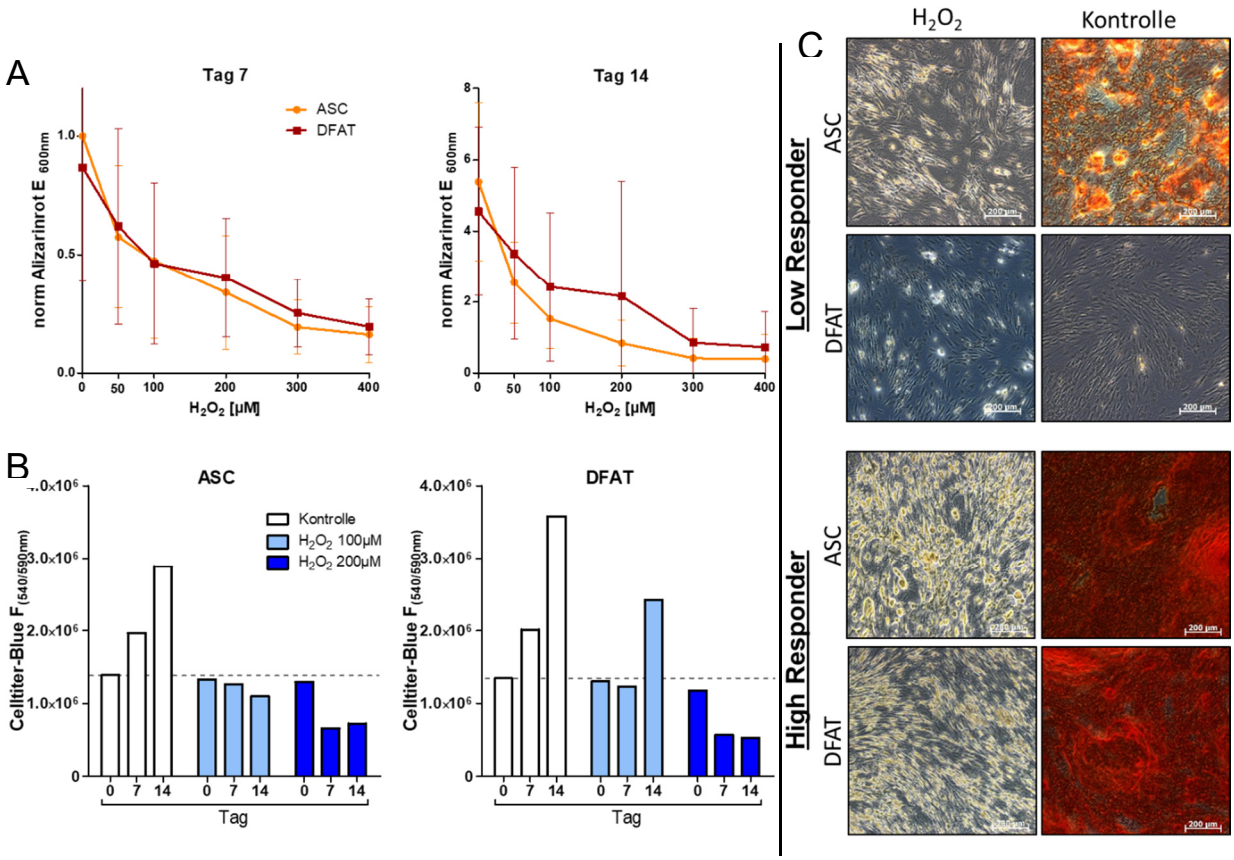


Abbildung 17: Der Einfluss von H_2O_2 auf die Osteogenese. A: mit steigender H_2O_2-Konzentration sinkt die Osteogenese-Fähigkeit von ASCs und DFATs, gemessen an Alizarinrot Emission, normiert auf Tag 0 ohne H_2O_2 Zusatz, n=9 ± SD. B: H_2O_2 hat Einfluss auf die CelltiterBlue Fluoreszenz, ein Maß für die Zellzahl. Diese wurde während der osteogenen Differenzierung an Tag 0, 7 und 14 gemessen. C: H_2O_2 (100µM) führt zu einem Ausbleiben an Osteogenese bei Low- und High Responder, Alizarinrot Färbung an Tag14 zeigt kalzifizierte EZM an.

Der Zusatz von Katalase steigert die Osteogenese von ASCs und DFATs

Die Zugabe des antioxidativen Enzyms Katalase zum osteogenen Differenzierungsmedium führte zu einem Anstieg der Differenzierung. Schon ab Tag 7 konnte eine erhöhte Rotfärbung der Kulturen gezeigt werden (Abb. 18A,B). Über einen Verlauf von 14 Tagen konnte der signifikant positive Effekt von Katalase deutlich gezeigt werden. Katalase konnte die Osteogenese um das 2-fache bis 2,5-fache erhöhen. Auch die Kombination von Katalase mit H_2O_2 konnte diesen Effekt nicht abmildern. Katalase fängt den Effekt von H_2O_2 komplett ab und steigert die Osteogenese in ähnlicher Weise, wie eine alleinige Zugabe von Katalase. Mit H_2O_2 inkubierte Kulturen zeigten stattdessen deutlich verringerte Alizarinrot Färbung und somit Osteogenese. Die Aktivität von ALP zeigte hingegen keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrolle und Katalase, über den Zeitverlauf von 14 Tagen steigt die Aktivität kontinuierlich an (Abb. 18C). Nur H_2O_2 Zugabe verringerte die ALP Aktivität etwas.

Die Abbildung 16 zeigt die Ergebnisse der Alizarinrot-Färbung von ASCs und DFATs an Tag 7 und 14. Die Werte jedes Spenders sind auf dessen ASC Kontrolle an Tag 7 normiert. Somit ist dieser Wert 1. So kann die Auswirkung der Zusätze und die Unterschiede von ASCs und DFATs gezeigt werden, ohne dass die Unterschiede zwischen den Spendern (siehe Low- und High-Responder (Abb. 16) zum Tragen kommen. Wenn man den Graph ASCs Tag 7 betrachtet, so sieht man hier für den Zusatz von Katalase, dass die Kalzifikation im Vergleich zur Kontrolle (nur mit Osteo-Medium inkubiert) signifikant ansteigt. Das gleiche gilt auch für die Kombination von Katalase und H_2O_2. Die alleinige Zugabe von H_2O_2 führt hingegen zu signifikanter Verringerung der Kalzifikation. Auch die Unterschiede zwischen der Kombination Katalase+ H_2O_2 und H_2O_2 sind höchst signifikant. Katalase kann den negativen Effekt auf die Osteogenese auffangen. Der Graph DFATs Tag 7 zeigt ein ähnliches Bild. Die Kontrolle ist hier deswegen nicht 1, da sich auch jeder DFATs-Wert auf die ASC Tag 7 Kontrolle bezieht. So können Unterschiede zwischen ASCs und DFATs gezeigt werden. Die Unterschiede zwischen den beiden Kontrollen sind jedoch nicht signifikant. Die Zusätze von Katalase oder der Kombination (Kat + H_2O_2) sind signifikant höher als die DFATs Kontrolle. H_2O_2 alleine verringert die Kalzifikation signifikant zur DFATs Kontrolle. Gleiches spielt sich auch an Tag 14 für beide Zellarten ab. Ein Augenmerk sollte hier auf die y-Achse gerichtet werden, die um das 10-fache nach oben skaliert wurde.

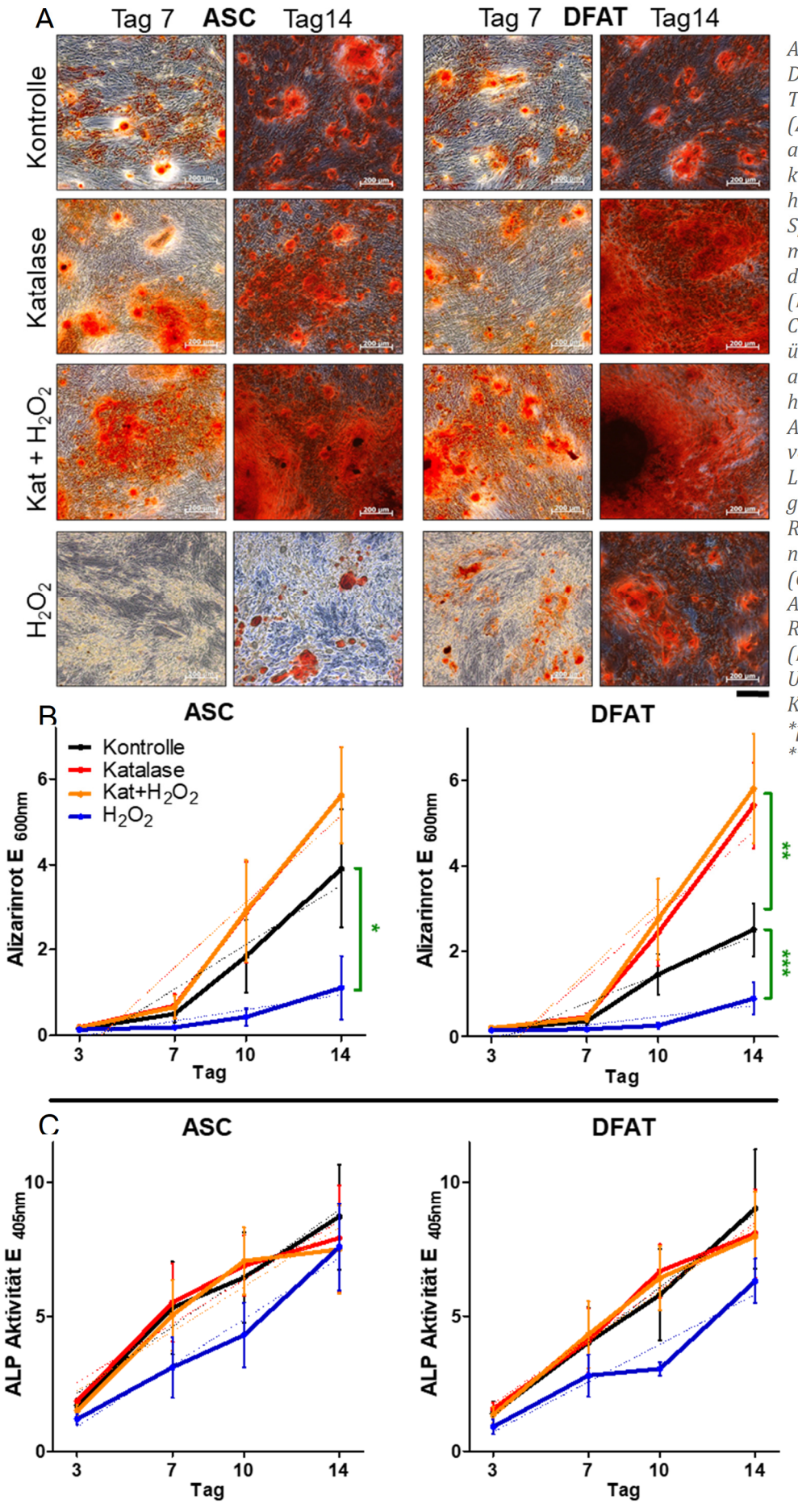


Abbildung 18 Osteogene Differenzierung über 14 Tage.
(A) Alizarinrot Färbung an Tag 7 u. 14 zeigt kalzifizierte EZM an. Es handelt sich um Spenderzellen, die mittelstark differenzieren.
(B) Zeitverlauf der Calcium Akkumulation über 14 Tage, angezeigt an der Extinktion des heraus gelösten Alizarinrot nach vorheriger Färbung. Lineare Regression mit gepunkteten Regressionslinien ±SEM, n=8.
(C) Zeitverlauf der ALP Aktivität. Lineare Regression ±SEM, n=3.
*(B+C) signifikante Unterschiede zwischen Katalase und H_2O_2, mit *p ≤ 0.01, **p ≤ 0.001, ***p ≤ 0.0001.*

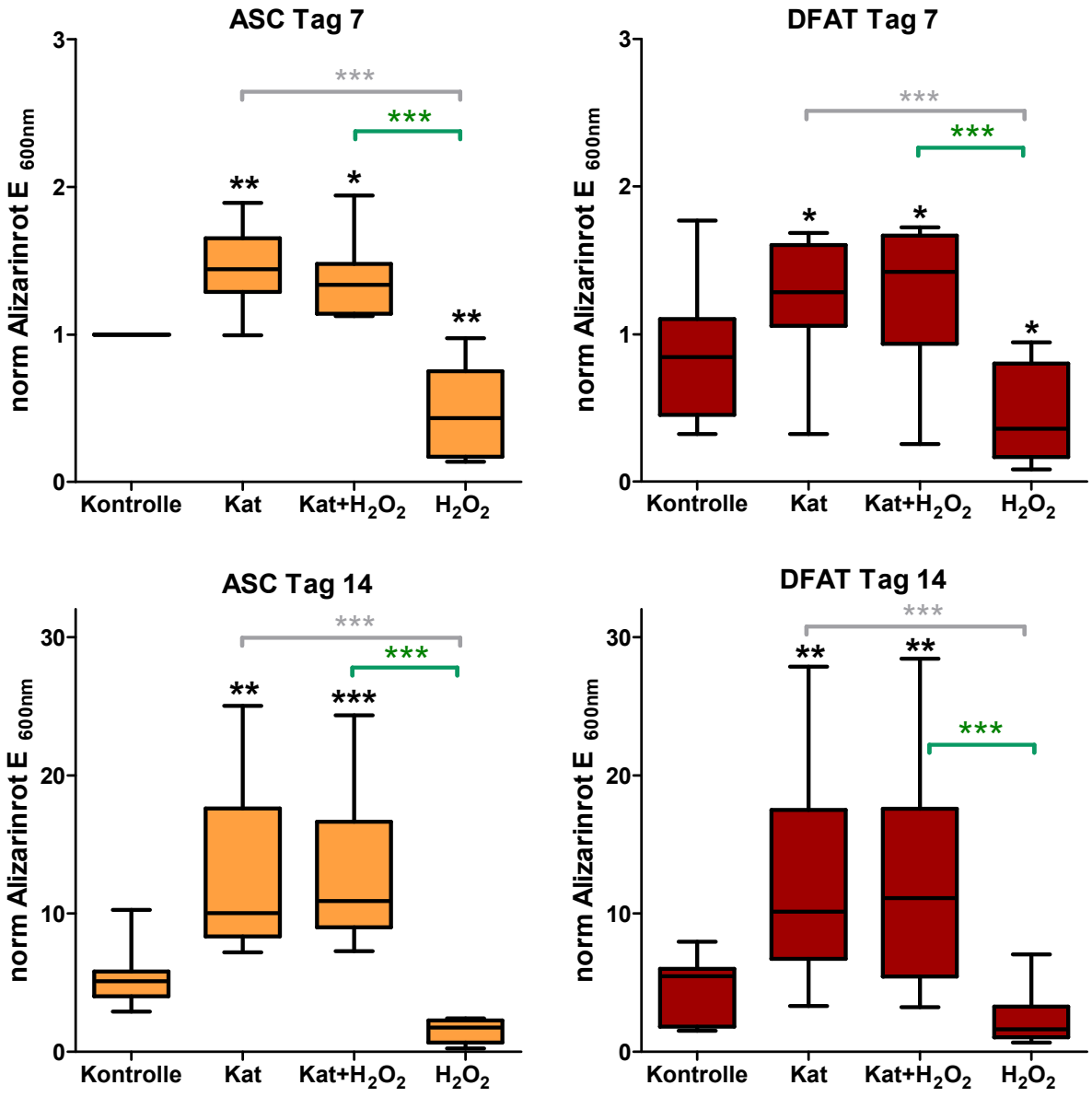


*Abbildung 19 Vergleich der Calcium Akkumulation in ASCs und DFATs Kulturen an Tag 7 und 14 der osteogenen Differenzierung, angezeigt an der Extinktion des heraus gelösten Alizarinrot nach vorheriger Färbung. Boxplots mit Whiskers Min bis Max. 1-way Anova, Tukey Test mit *p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01, ***p ≤ 0.001, n=8. Schwarze *: im Vergleich zur Kontrolle, grüne *: im Vergleich zwischen Kat+*H2O2 *und* H2O2*. Graue * Vergleich Kat mit* H2O2*.*

Der Zusatz von H_2O_2 führt hier nicht mehr zu signifikant unterschiedlichen Werten im Vergleich zu den Kontrollen, der Einfluss auf die Osteogenese ist aber sichtbar negativ. Der gepaarte t-Test zeigt hier signifikante Unterschiede (ASCs Tag 14 Kontrolle zu H_2O_2 p=0,004 und DFATs Tag 14 Kontrolle zu H_2O_2 p=0,0058). Der Mittelwert für den Katalase-Zusatz an Tag 14 ist 12,92 im Vergleich zur Kontrolle mit einem Mittelwert von 5,39. Katalase erhöht die Kalzifikation somit auf 240 %. Ähnliche Werte ergeben sich auch für DFATs (268 %). H_2O_2 verringert hingegen die Werte auf 1,53 für ASCs (28 %) und 2,42 für DFATs (53 %). In der folgenden Tabelle 1 sind diese Werte noch einmal zu sehen.

	Tag 7 ($\bar{X} \pm SD$)		*Tag 14 ($\bar{X} \pm SD$)*		*Tag 14 (%)*	
	ASC	**DFATs**	**ASC**	**DFATs**	**ASC**	**DFATs**
Kontrolle	1	0.87 ± 0.48	5.39 ± 2.2	4.56 ± 2.36	100	100
Katalase	1.45 ± 0.27	1.24 ± 0.44	12.92 ± 6.17	12.23 ± 7.85	240	268
Kat+H_2O_2	1.37 ± 0.27	1.26 ± 0.5	13.22 ± 5.63	12.48 ± 8.28	245	274
H_2O_2	0.47 ± 0.33	0.46 ± 0.34	1.53 ± 0.84	2.42 ± 2.09	28	53

Tabelle 19 Mittelwerte ± Standardabweichung der Abbildung 19. Rechte 2 Spalten Mittelwerte in % mit Kontrollen als 100 %.

Katalase erhöht die osteogenen Potentiale aller Spender egal ob von Low- oder High-Respondern

Der positive osteogene Effekt von Katalase wirkt bei ASCs und DFATs aller Spender. Die Abb. 20 zeigt deutlich die individuellen Unterschiede im osteogenen Potential der Spender. Die Low-Responder werden ab jetzt definiert als Spender, dessen ASC Kontrollen an Tag 14 einen Alizarin Rücklösungs-Wert von $E_{600nm} \leq 2$ haben. Alle Spender mit $E_{600nm} > 2$ werden als High-Responder bezeichnet. Der in Abb. 20 markierte Low-Responder zeigt selbst nach 14 Tagen kaum Differenzierung. So hat die ASC Kontrolle einen Wert von E_{600nm}=0,5 (siehe Tab.20). Dies lässt sich durch die Zugabe von Katalase auf 1,5 verdreifachen. Der markierte High-Responder differenziert auch ohne Zugabe von Katalase mit E_{600nm}=7,3 sehr gut und Katalase steigert die Kalzifikation der ASCs um das 2,4 fache auf 17,6. Auch wird bei dem High-Responder eine gewisse Robustheit gegenüber H_2O_2 Zusatz ersichtlich. Dies ist eine wichtige Beobachtung und sollte für den weiteren Verlauf dieser Arbeit im Hinterkopf behalten werden.

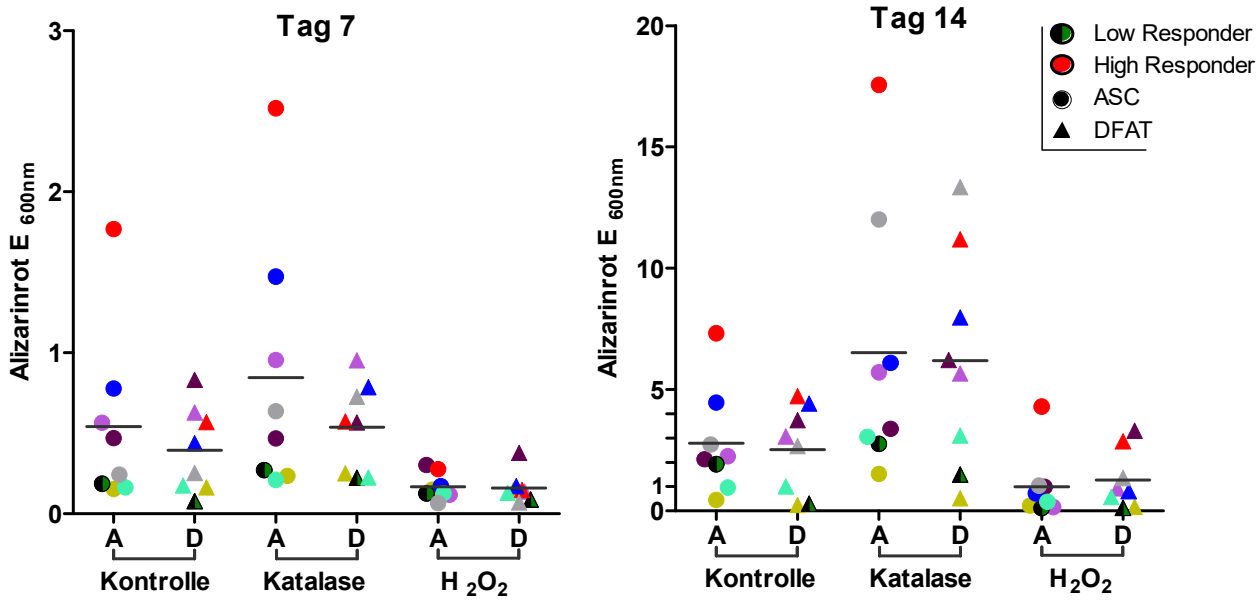


Abbildung 20 Calcium Akkumulation an Tag 7 und 14, angezeigt an der Extinktion des heraus gelösten Alizarinrot nach vorheriger Färbung. 8 Spender einzeln als Punkte aufgetragen. Je eine Farbe pro Spender. Jeweils ein High Responder (rot) und ein Low Responder (schwarz-grün) markiert.

	Tag 7						*Tag 14*					
	Kontrolle		**Katalase**		H_2O_2		**Kontrolle**		**Katalase**		H_2O_2	
	ASC	**DFAT**	**ASC**	**DFAT**	**ASC**	**DFAT**	**ASC**	**DFAT**	**ASC**	**DFAT**	**ASC**	**DFAT**
Low Resp	0.2	0.2	0.2	0.3	0.2	0.1	**0.5**	**0.2**	**1.5**	**0.5**	0.2	0.2
High Resp	1.8	0.6	2.5	0.6	0.3	0.1	**7.3**	**4.7**	**17.6**	**11.2**	4.3	2.9

Tabelle 20 Alizarinrot Werte für die in Abb. 8 markierten Low- und High-Responder. Grün für Low, rot für High Responder.

Die Unterschiede zwischen Low- und High-Responder

Zwischen den Low- (ASC Kontrolle an Tag 14 mit $E_{600nm} \leq 2$) und High-Respondern ($E_{600nm} > 2$) lassen sich zwei wichtige Unterschiede feststellen: Die Low-Responder differenzieren deutlich langsamer und schlechter als die High-Responder (Abb. 21A und 22B). Des Weiteren zeigen die High-Responder auch mit H_2O_2 Zusatz deutliche Kalzifizierung der EZM. Dies ist an der Rotfärbung in den Bildern der untersten Reihe der Abb. 21C, und 22D zu erkennen. Wichtig ist hier auch, dass durch die Trennung nach Responder-Typ die Unterschiede zwischen Kontrolle und Katalase signifikant werden.

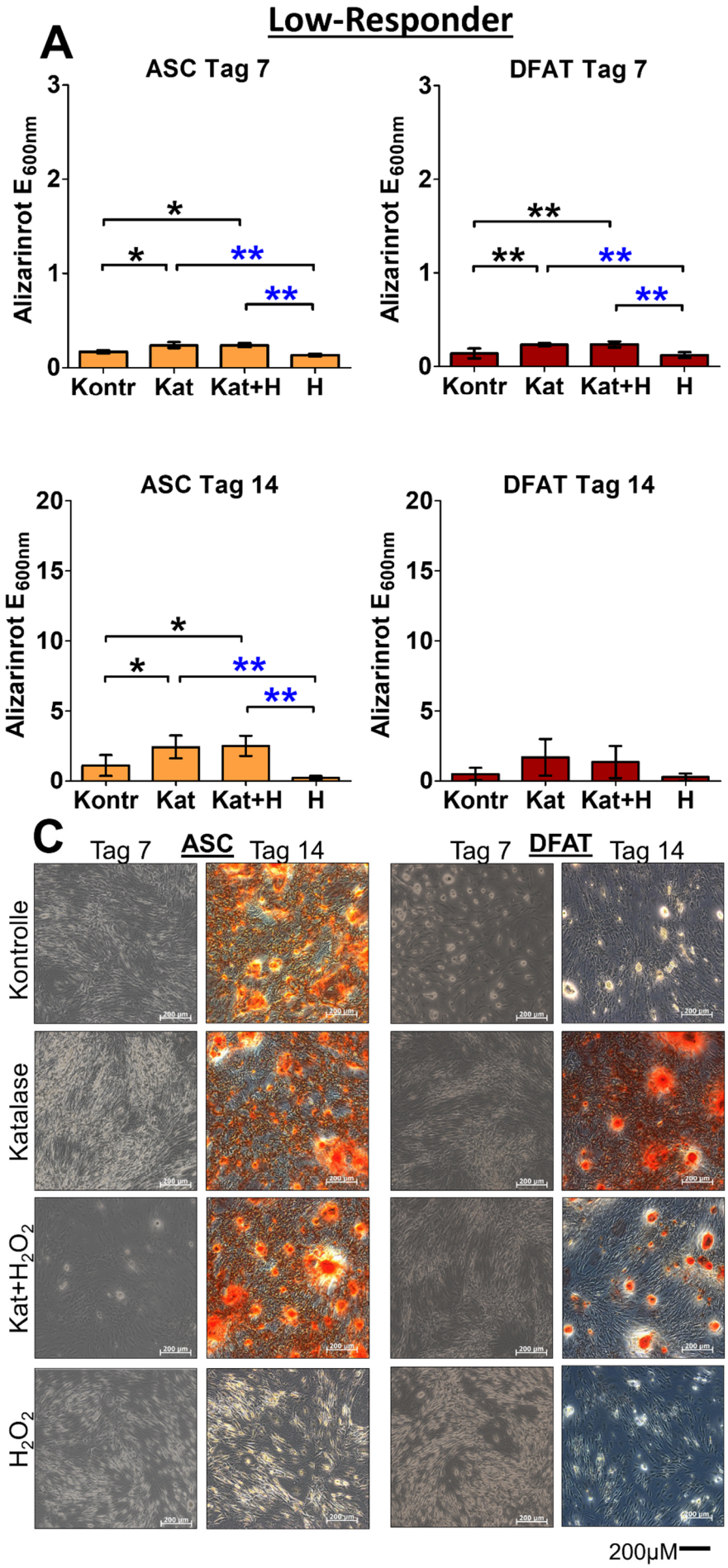


*Abbildung 21 Low-Responder (A+C). Calcium Akkumulation in ASCs und DFATs Kulturen an Tag 7 und 14 der osteogenen Differenzierung, angezeigt an der Extinktion des heraus gelösten Alizarinrot nach vorheriger Färbung (A) n=3, Boxplots mit Whiskers Min bis Max. 1-way Anova, Tukey Test mit *p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01, ***p ≤ 0.001. Fotos zeigen einen repräsentativen Spender, rot gefärbte Areale zeigen die Calcium Akkumulationen, gefärbt mit Alizarinrot.*

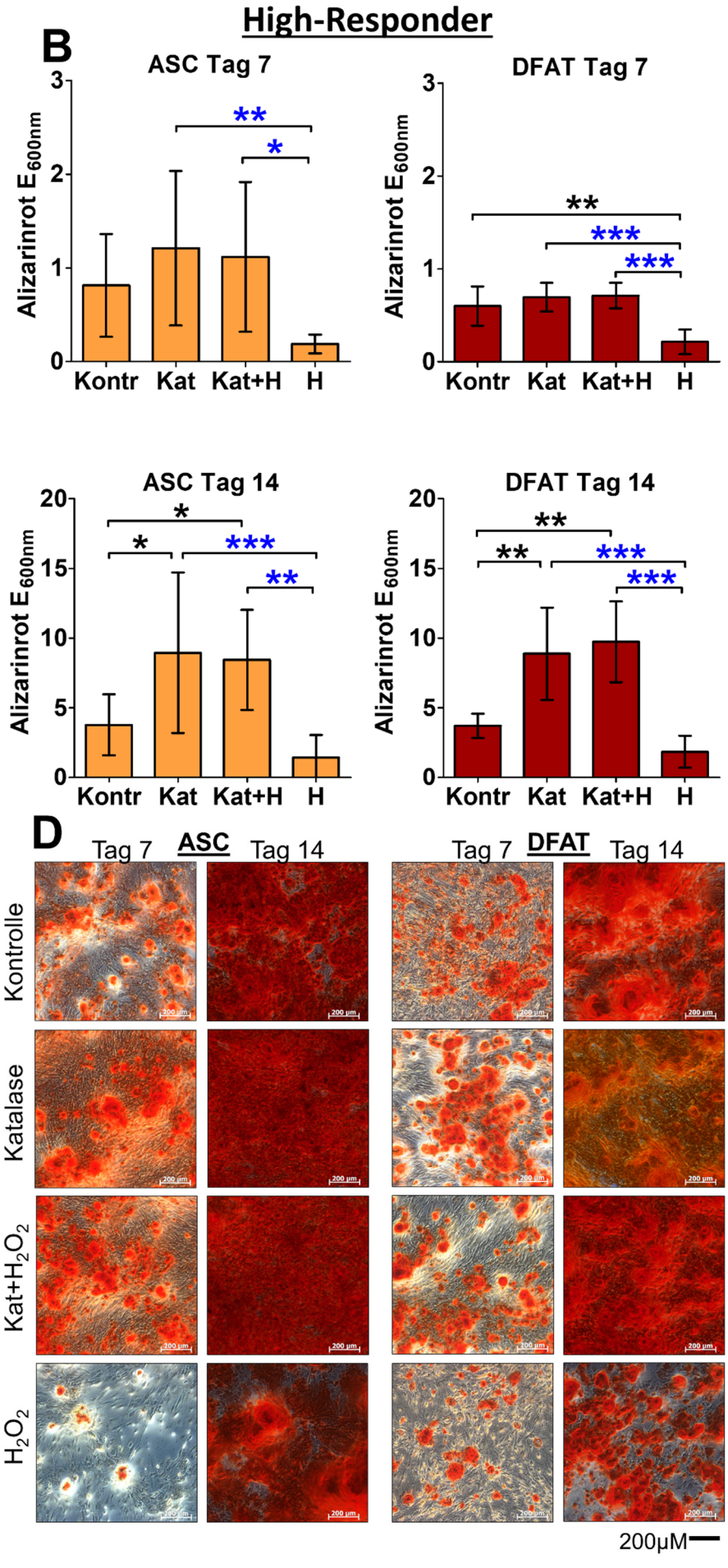


*Abbildung 22 High Responder (B+D). Calcium Akkumulation in ASCs und DFATs Kulturen an Tag 7 und 14 der osteogenen Differenzierung, angezeigt an der Extinktion des heraus gelösten Alizarinrot nach vorheriger Färbung (B) n=5. Boxplots mit Whiskers Min bis Max. 1-way Anova, Tukey Test mit *p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01, ***p ≤ 0.001. Fotos zeigen einen repräsentativen, rot gefärbte Areale zeigen die Calcium Akkumulationen, gefärbt mit Alizarinrot.*

ASCs expremieren mehr PPARy und FOXO1 als DFATs und H_2O_2 hat Einfluss auf Proteinexpression von MnSOD und OPN

Die Ergebnisse der Western Blots (Abb.24) zeigen höhere Mengen des Fettzell-Markers PPARγ in ASCs in Vergleich zu den DFATs. Obwohl es sich bei DFATs um dedifferenzierte Fettzellen handelt, ist in diesen die PPARγ Expression deutlich niedriger. Ähnlich verhält es sich auch bei dem osteogenen Differenzierung-förderndem FoxO1, welcher ebenfalls in ASCs signifikant höher exprimiert wird als in DFATs. Die Expression von PPARγ, als auch FoxO1 sind an Tag 14 deutlich herunter reguliert.

Besonders interessant wird es nun bei MnSOD. Die MnSOD Proteinexpression wird durch die Katalase Zugabe erhöht. Signifikante Unterschiede werden so zwischen Katalase+H_2O_2 im Vergleich zur Kontrolle oder im Vergleich zur alleinigen H_2O_2-Zugabe sichtbar. Zwischen ASCs und DFATs sind hingegen kaum Unterschiede festzustellen. Die tendenziell höheren Werte unter Katalase-Einfluss werden in späteren Versuchen bestätigt und durch die höheren n-Zahlen dann auch signifikant.

Immunfloreszenz-Färbungen an Tag 7 (Abb. 23) zeigen zudem, dass der osteogene Marker Osteopontin (OPN) in Kontrolle und mit Katalase-Zusatz deutlich stärker vorhanden ist als mit dem Zusatz von H_2O_2. Diese erhöhte OPN Expression wird auch in späteren Experimenten durch Western Blots bestätigt.

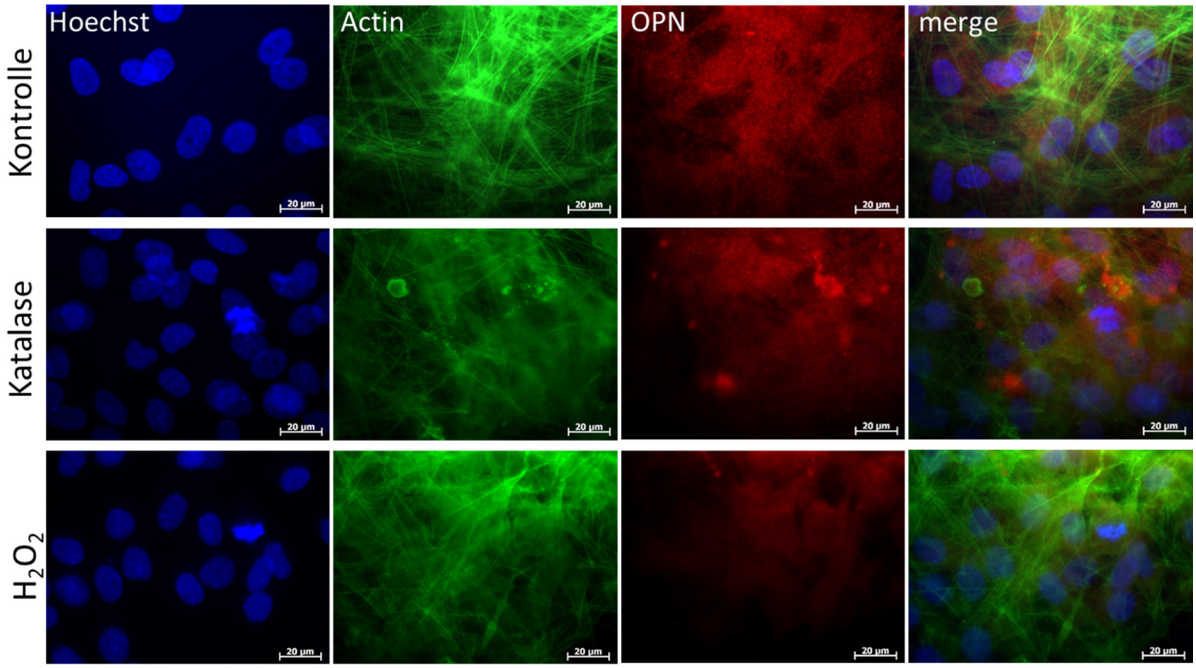


Abbildung 23 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen an Tag 7 der osteogenen Differenzierung

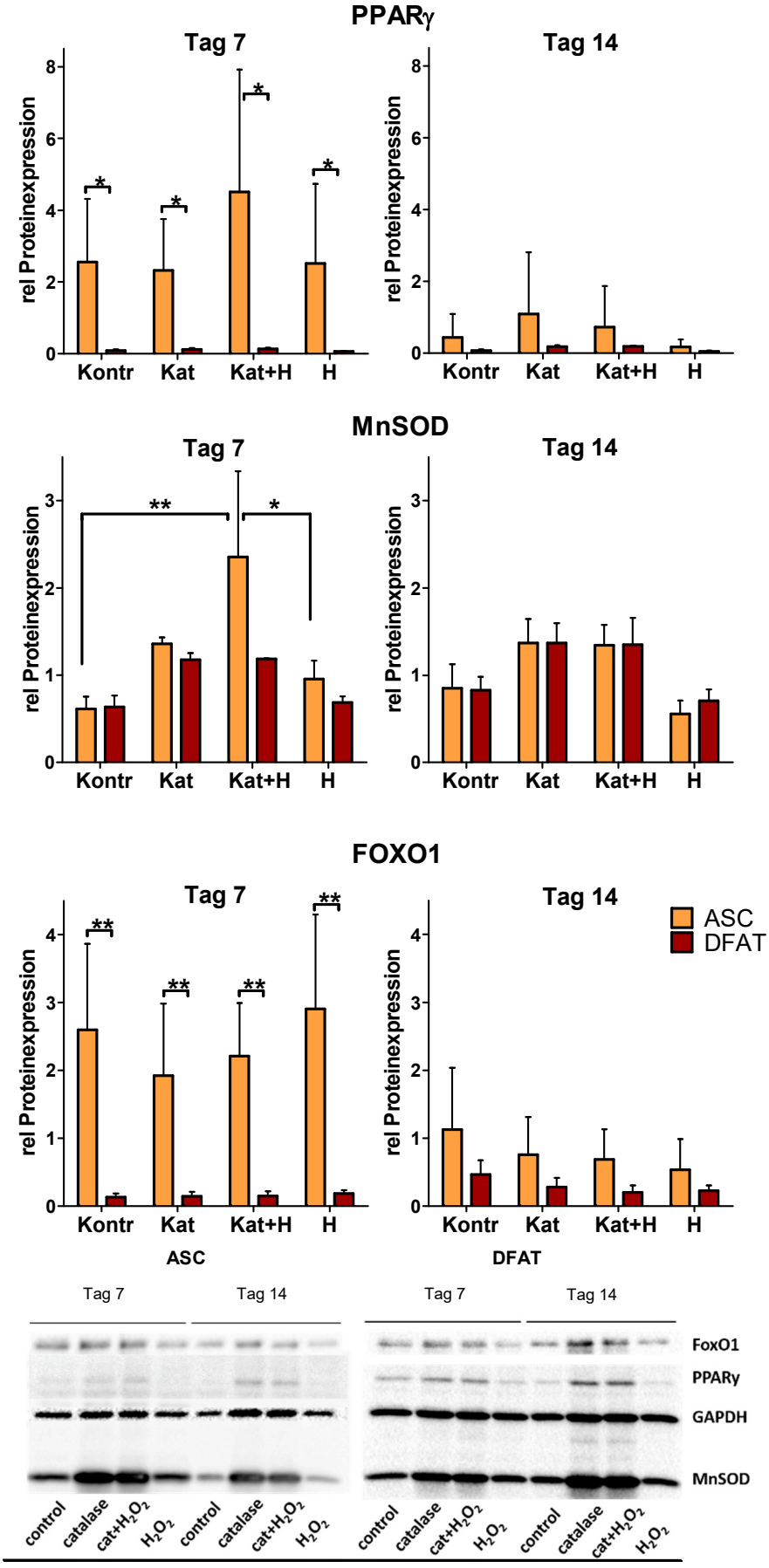


*Abbildung 24 Western Blots von ASC (gelb) und DFAT (rot) an Tag 7 und 14. 2-way Anova, Bonferroni-Test mit *p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01. SEM von n=4.*

-Folgend wurden nur noch ASCs untersucht-

H_2O_2-Zusatz führt zu vermehrter Adipogenese von ASCs unter osteogenen Bedingungen

Eine Beobachtung nach H_2O_2 Zugabe war, dass ASCs (wie auch DFATs) vermehrt zu Adipozyten differenzieren und das trotz des osteogenen Differenzierungsmediums (Abb. 25). Angefärbt mit dem Fluoreszenzfarbstoff Nilrot sind Lipidvakuolen in einzelnen Zellen erkennbar. Einige wenige sind auch in den Kontrollen zu finden. Der Zusatz von Katalase führte nicht nur zur Osteogenese, sondern auch zu weniger sichtbaren Lipidvakuolen. Katalase scheint somit vor einer „Fehldifferenzierung" zu schützen.

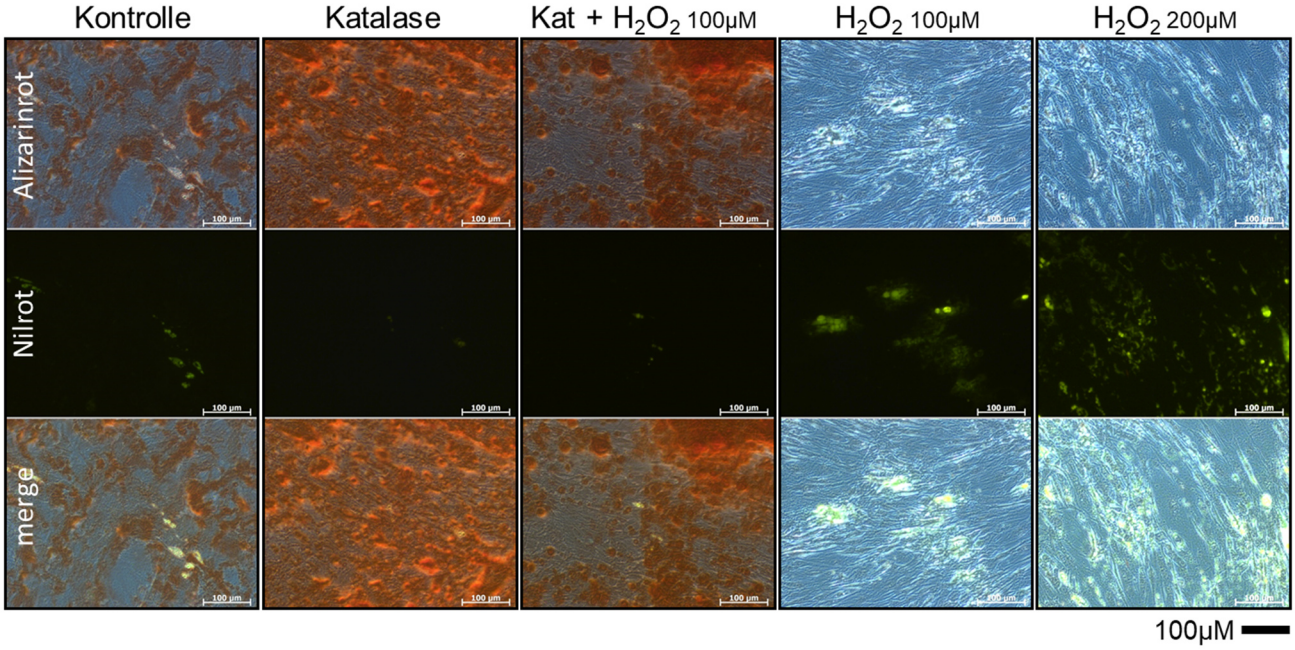


Abbildung 25 Lipidvakuolen in osteogen differenzierten ASCs an Tag 14. Rot gefärbte Areale zeigen die Calcium Akkumulationen, gefärbt mit Alizarinrot, Phasenkontrast. Grüne Fluoreszenzfärbung mit Nilrot färbt Lipidvakuolen an.

Durch Wnt-Inhibitor CT-98014 induzierte Adipogenese verringert die Osteogenese der ASCs

Um den Effekt einer starken Adipogenese in osteogen differenzierenden ASCs zu zeigen, wurde der Wnt/ GSK-3α/β-Inhibitor CT-98014 genutzt, welcher ein starker Induktor der Adipogenese von MSCs ist (Abb.26). Er führte zur starken adipogenen Differenzierung der ASCs und zu einem völligen Ausbleiben der Kalzifizierung (keine Rotfärbung sichtbar) der behandelten Zellen. Die simultane Zugabe von Katalase konnte diesen Effekt abmildern. Die Nilrotfärbung fällt deutlich schwächer aus und leichte osteogene Differenzierung ist zu erkennen. Vergleichbar, wenn auch deutlich schwächer ist der Effekt von H_2O_2. Ebenfalls steigt hier die Adipogenese und die Osteogenese ist verringert. Simultane Zugabe von Katalase verringert die Adipogenese und verstärkt die Osteogenese.

Ist nun die Fehldifferenzierung zu Adipozyten der Grund für die ausbleibende Osteogenese oder ist der Einfluss der ROS H_2O_2 komplexer?

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen mit dem Lipidfarbstoff Nilrot zeigen Auffälligkeiten bei stärkerer Vergrößerung von H_2O_2 behandelten adipogen differenzierenden ASCs. Im Versuch über 14 Tage mit adipogenem Differenzierungsmedium zeigten die entstehenden Adipozyten einen Phänotyp, der von der Kontrolle abweicht. Im FL-1 Filter (E= 520 nm) erscheinen neutrale Lipide grün. Die Kontrolle zeigt große Fettzellen von 50-100 µm Durchmesser und mit multiplen größeren runden Lipidvakuolen. Die mit H_2O_2 behandelten Zellen zeigen hingegen deutlich kleinere Adipozyten von 25-50 µm. Zudem beinhalten diese Zellen deutlich kleinere Lipidvakuolen, die zudem eine grüngelbe bis orange Farbe aufweisen. Dieser Phänotyp ähnelt sehr dem der beigen Adipozyten, welcher unter anderem mit Forskolin induziert werden kann. Das rechte Bild zeigt diese beigen Adipozyten eines früheren Versuchs.

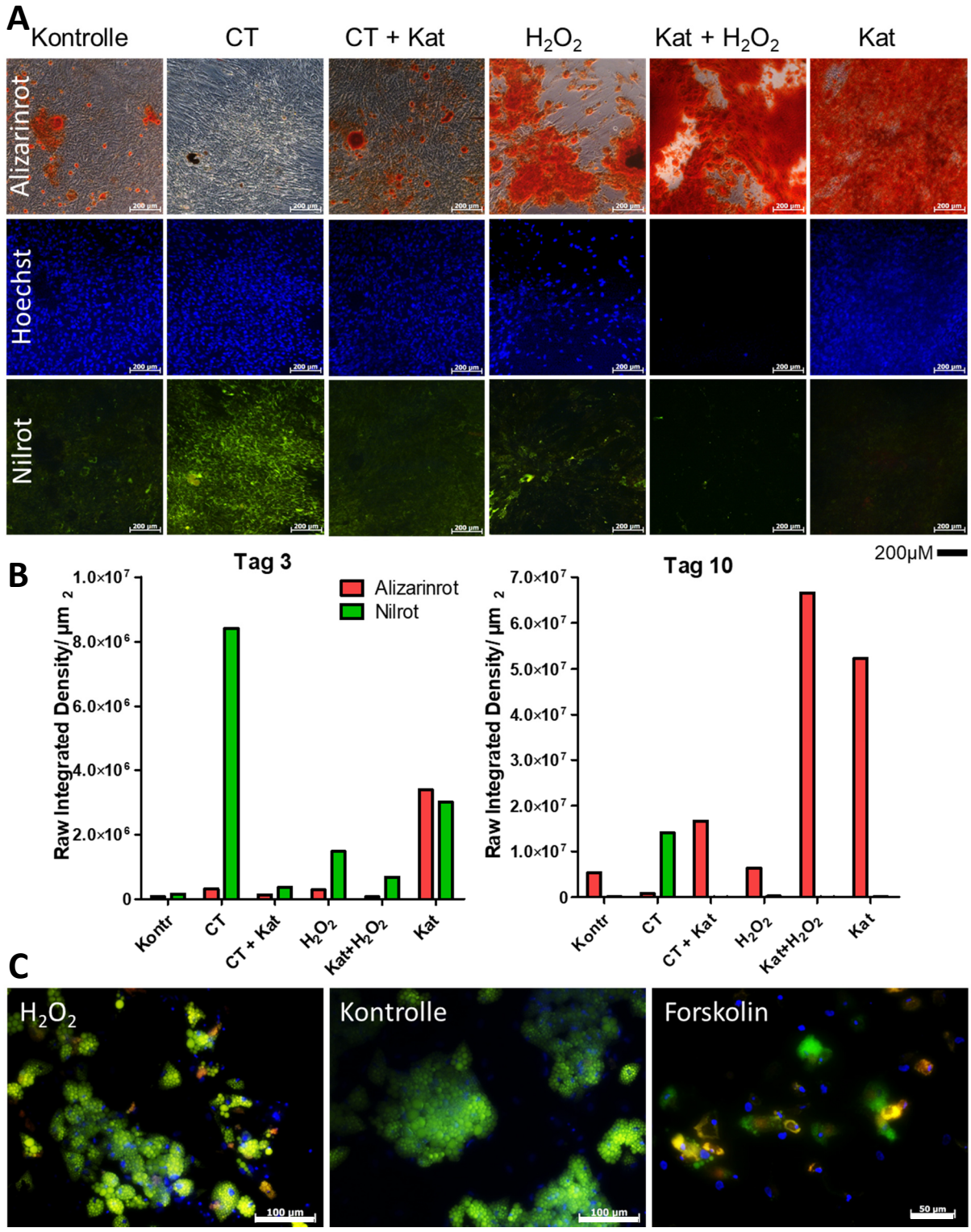


Abbildung 26 Osteogene Differenzierung von ASCs über 10 Tage zur Überprüfung der stattfindenden Adipogenese. (A) Fotos an Tag 10. Rot gefärbte Areale zeigen die Calcium Akkumulationen, gefärbt mit Alizarinrot, Phasenkontrast. Grüne Fluoreszenzfärbung mit Nilrot färbt Lipidvakuolen an. Hoechst in blau zeigt die Zellkerne. (B) Auswertung der Bilder von Tag 3 und Tag 10 mittels ImageJ. Die Einheit „Raw Integrated Density" ist die Summe aller Pixel Intensitäten. C: Phänotyp der aus den ASCs differenzierten Adipozyten. Grün bis orange zeigen gefärbte Lipide. Forskolin-Bild aus früherem Versuch zeigt beige Adipozyten in orange. Skala H_2O_2 und Kontrolle 100µm, Forskolin 50µm.

Katalase steigert die Zellvitalität während der Osteogenese aber nicht die Zellzahl

Eine weitere Besonderheit lässt sich beim Zusatz von Katalase während der Osteogenese der ASCs feststellen. Eine Färbung der Nuclei an Tag 7 mit dem Farbstoff Hoechst zeigt eine ähnliche Anzahl dieser im Vergleich zur Kontrolle oder H_2O_2 (Abb.28 C). Spätere Färbungen sind Aufgrund der Kalzifizierung der EZM nicht mehr aussagekräftig. Der CellTiter-Blue Assay, welcher häufig als Maß für die Zellzahl genutzt wird, zeigt jedoch eine deutliche Steigerung der Fluoreszenz bei Katalase-Zusatz. CellTiter-Blue zeigt eigentlich die Zellvitalität an (welche bei vielen Zellen dann auch die Zellzahl darstellen kann, wenn sich diese „normal" verhalten) und diese ist hier deutlich erhöht. Dies ist auch in weiteren Experimenten zu sehen (Abbildungen 29 und 32). Das Substrat des CellTiterBlue ist Resazurin, welches durch die reduzierende Diaphorase und Oxidation von NADH/NADPH zum roten fluoreszierenden Farbstoff Resorufin umgesetzt wird. Die hohen CTB-Werte mit Katalase sind somit ein Zeichen für einen verstärkten Zellstoffwechsel. Dies könnte z.B. NADH oder FADH Konzentrationen erhöhen. Da diese vermehrt beim Citrat-Zyklus in den Mitochondrien entstehen, fällt somit der Fokus immer mehr auf diese Organellen. Dass hier auf Mitochondrien-Ebene etwas passiert, zeigt auch die MnSOD-Expression an Tag 7, welche bei Katalase-Zusatz signifikant erhöht ist.

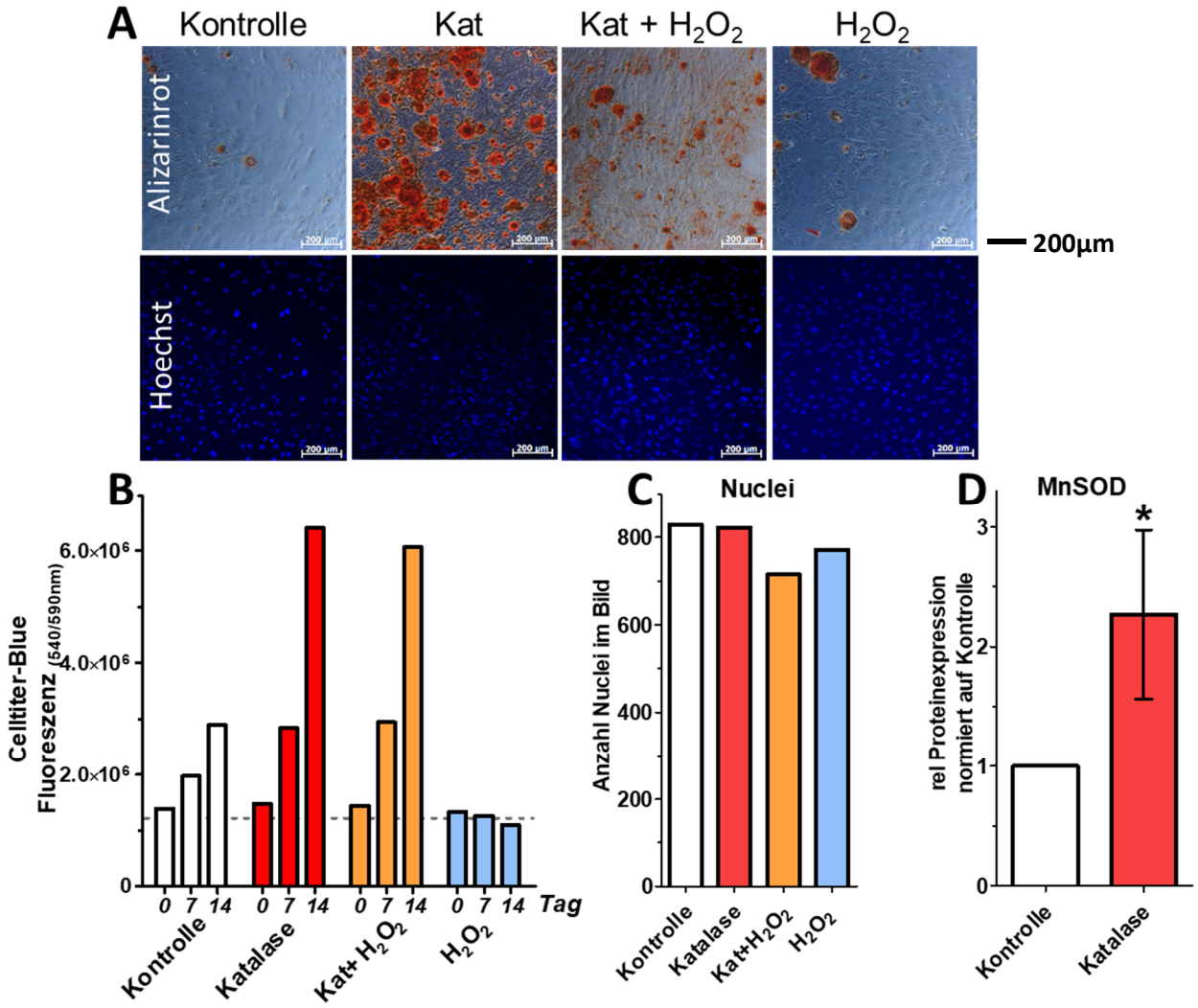


*Abbildung 28 Osteogene Differenzierung von ASCs über 14 Tage. (A) Fotos an Tag 7. Rot gefärbte Areale zeigen die Calcium Akkumulationen, gefärbt mit Alizarinrot, Phasenkontrast. Hoechst in blau zeigt die Zellkerne. (B) CelltiterBlue Werte des gleichen Spenders, an Tag 0,7 und 14 gemessen. (C) Anzahl der Nuclei von A gezählt mittels ImageJ. (D) Proteinexpression von MnSOD an Tag 7, n=7 t-Test, * p<0,05.*

Citrat als Substrat des Citrat-Zyklus erhöht weder Zellvitalität noch Osteogenese

Um zu klären ob die Katalase den Citrat-Zyklus erhöht und so die NADH-Produktion „verstärkt“, wurde Citrat genutzt. Aus einem Molekül Citrat werden durch den Citrat-Zyklus drei Moleküle NADH produziert. Wären also die CellTiterBlue-Werte durch den Zusatz von Citrat erhöht, würde dies Rückschlüsse auf mehr NADH durch den Citrat-Zyklus geben. Dies ließ sich allerdings nicht feststellen. Die CellTiterBlue-Werte mit Citrat-Zusatz lassen sich mit denen der Kontrolle vergleichen. Die Osteogenese ist durch Citrat nicht signifikant erhöht, es lässt sich sogar eine leichte Verzögerung der Osteogenese an Tag 7 erkennen.

Vermutlich ist der CTB nicht erhöht (trotz Citrat-Zusatz) da der Citrat-Zyklus sich in diesen osteogen differenzierenden ASCs nicht verstärken lässt. Dies wäre möglich, wenn dieser schon auf Anschlag läuft. Im Umkehrschluss bedeutet dies aber auch, dass Katalase vermutlich nicht den Citrat-Zyklus erhöht und so mehr NADH und $FADH_2$ entsteht, welches den Ausschlag der CelltiterBlue Werte durch Katalase erklärt.

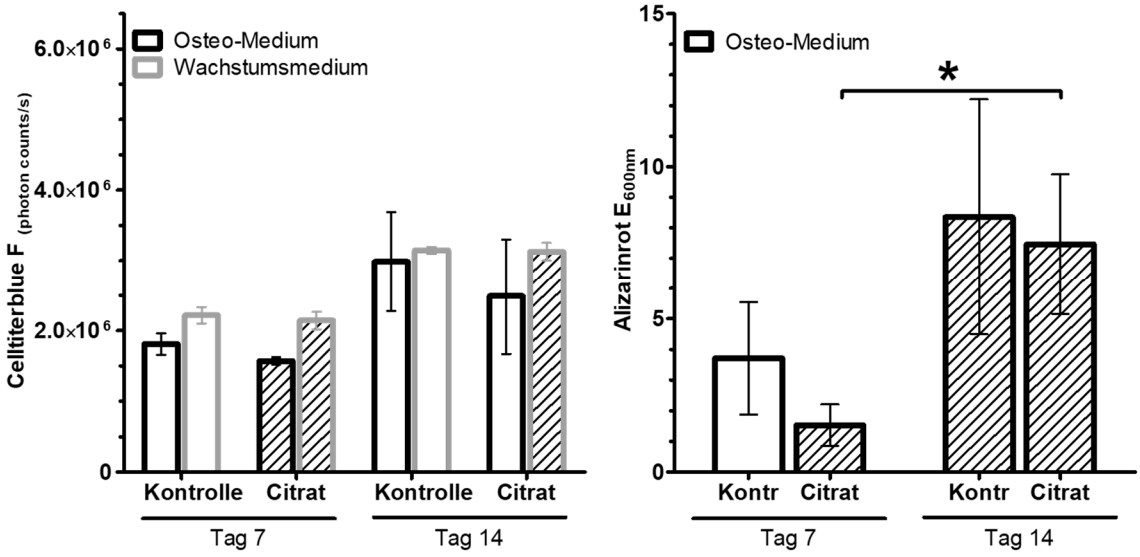


*Abbildung 29 Osteogene Differenzierung von ASCs über 14Tage mit dem Zusatz von Citrat (30mM). Linker Graph CelltiterBlue Assay, rechter Graph Alizarinrot-Messung für Osteogenese, hier keine Wachstumsmedium-Balken, welche sich bei um die 0 befinden. One-way Anova mit n=5 mit SEM und 1way-Anova mit Friedman Test,*p≤0,05.*

Durch H_2O_2 *„fehl-differenzieren“ die ASCs während der Osteogenese zum Teil zu Adipozyten, welche den beigen Adipozyten ähneln. Osteogenese findet nur schlecht oder begrenzt statt. Die CTB-Werte sind eher niedrig.*

Katalase hingegen unterdrückt Fehldifferenzierung und die ASCs differenzieren nicht nur hervorragend osteogen, sie haben auch einen gesteigerten Stoffwechsel. Die hohen CTB-Werte sind aber nicht mit erhöhter Zellzahl verbunden und auch nicht durch einen verstärkten Citrat-Zyklus zu erklären.

Im Folgenden wird der Einfluss von L-Lactat (30mM) auf die Osteogenese von ASCs untersucht. Der Zusatz von L-Lactat induziert bei ASCs und Präadipozyten unter adipogener Differenzierungsmethode das „Browning", wodurch beige Adipozyten entstehen.

Lactat inhibiert Osteogenese und verhindert auch die durch Katalase verstärkt induzierte Osteogenese

L-Lactat ist ein Induktor für das „Browning" von Adipozyten. Es induziert also einen beigen Adipozyten-Phänotyp (vgl. Abb 26C). Das Verhalten von osteogen differenzierenden ASCs unter Zugabe von 30mM L-Lactat und Katalase wird deswegen in folgenden Versuchen untersucht.

Nach 7 Tagen lässt sich bereits feststellen, dass Lactat die Osteogenese deutlich verringert. Es ist kaum gefärbte EZM zu sehen.

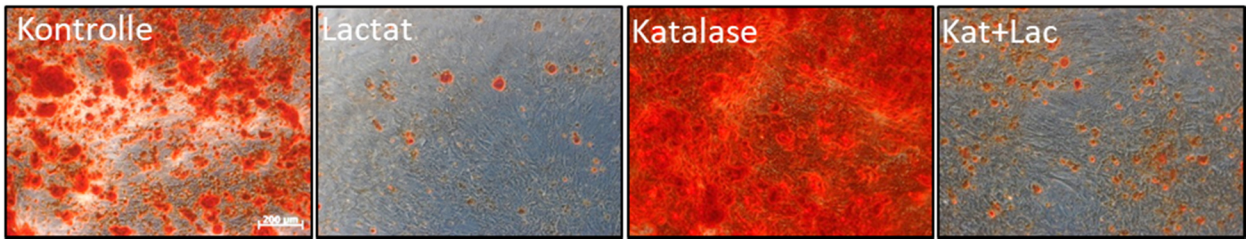


Abbildung 30 Osteogene Differenzierung von ASCs über 7 Tage mit dem Zusatz von L-Lactat (30mM) . Rot gefärbte Areale zeigen die Calcium Akkumulationen, gefärbt mit Alizarinrot, Phasenkontrast.

Lactat inhibiert Osteogenese und führt zu vermehrter Produktion von Lipidvakuolen

Um mögliche Adipogenese der ASCs zu zeigen, wurden diese nach 14 Tagen osteogener Differenzierung neben der Alizarinrot-Färbung auch mit dem Lipidfarbstoff Nilrot gefärbt. Lactat induzierte hier die Entstehung von Lipidvakuolen, auch in Kombination mit Katalase. Es konnte auch die durch Katalase induzierte starke Osteogenese unterbinden. Eine Auswertung der Bilder zeigt die Intensität der Fluoreszenz von Nilrot pro μm^2. Die Fluoreszenz ist mit Lactat tendenziell stärker, es hat somit verstärkte Lipogenese stattgefunden.

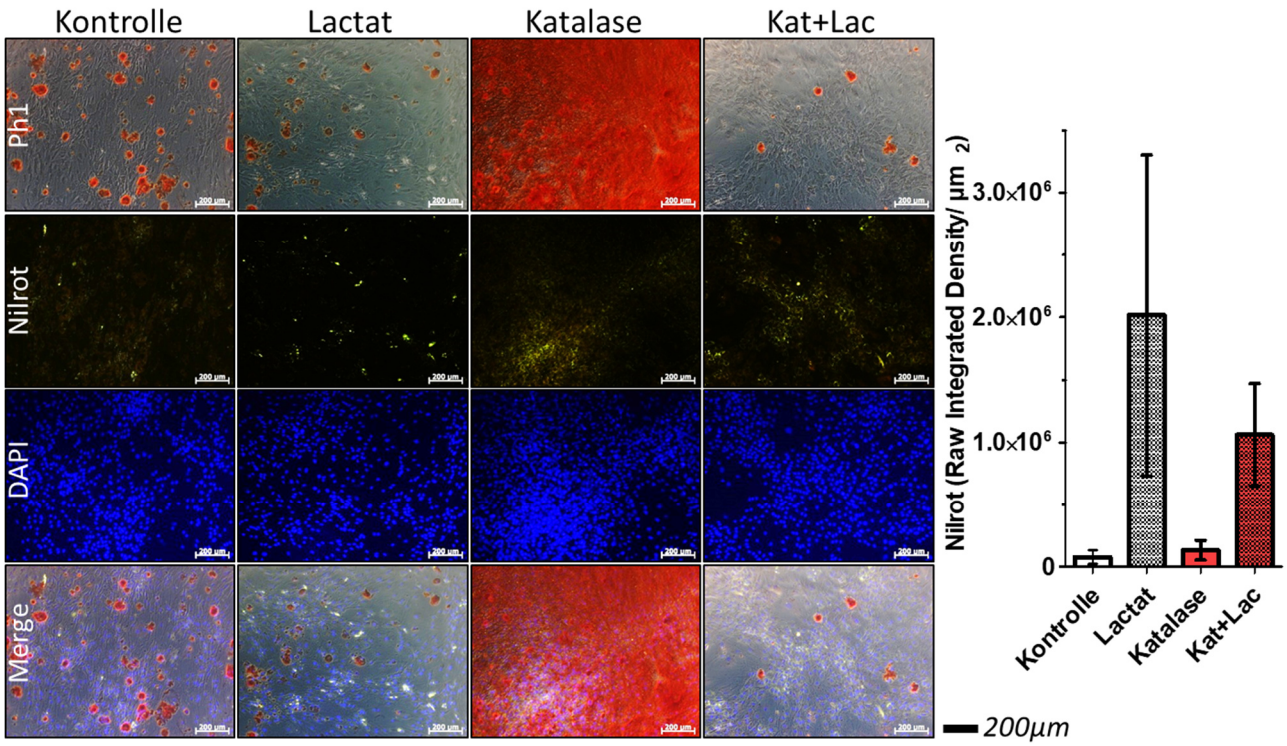


Abbildung 31 Osteogene Differenzierung von ASCs über 14 Tage zur Überprüfung der stattfindenden Adipogenese. Fotos an Tag 14. Rot gefärbte Areale zeigen die Calcium Akkumulationen, gefärbt mit Alizarinrot, Phasenkontrast. Grüne Fluoreszenzfärbung mit Nilrot färbt Lipidvakuolen an. Hoechst in blau zeigt die Zellkerne. Graph zeigt die Auswertung der Bilder von Tag 14 mittels ImageJ, n=4 mit SEM. Die Einheit „Raw Integrated Density" ist die Summe aller Pixel Intensitäten.

Lactat hat keinen signifikanten Einfluss auf die Zellvitalität- Katalase hingegen schon- die Zellvitalität korreliert nicht mit der Kalzium Akkumulation

Die Hoechst-Färbung der Zellkerne in Abb. 31 lässt erahnen, dass L-Lactat-Zugabe bei osteogen differenzierenden ASCs zu einer geringeren Zellzahl führt. Auch die Zellvitalitätsmessung mit CellTiterBlue, als indirektes Maß für die Zellzahl, zeigt verringerte Werte (Abb. 32, A+B). Allerdings ist dieser Effekt nur mit osteogenem Medium zu sehen. Im Vergleich mit zusätzlicher Katalase, ist dieser Unterschied sogar signifikant. Katalase lässt, wie schon zuvor gezeigt, den CellTiterBlue-Wert deutlich ansteigen. ASCs mit Wachstumsmedium verhalten sich jedoch deutlich anders. Hier hat weder Katalase noch L-Lactat einen sichtbaren Einfluss auf die Zellvitalität.

Ob die Zellvitalität Einfluss auf die Osteogenese hat, lässt sich mit den Graphen von Abb. 32 C und D beantworten. Hier sind sämtliche CellTiterBlue-Werte aus 17 A und B gegen ihre jeweiligen Alizarinrot-Werte aufgetragen. Der horizontale Verlauf der linearen

Regressionslinie, zeigt, dass die gemessenen Zellvitalitäten keinen Einfluss auf die Osteogenese der ASCs haben. Eine Steigung würde eine Abhängigkeit vermuten lassen.

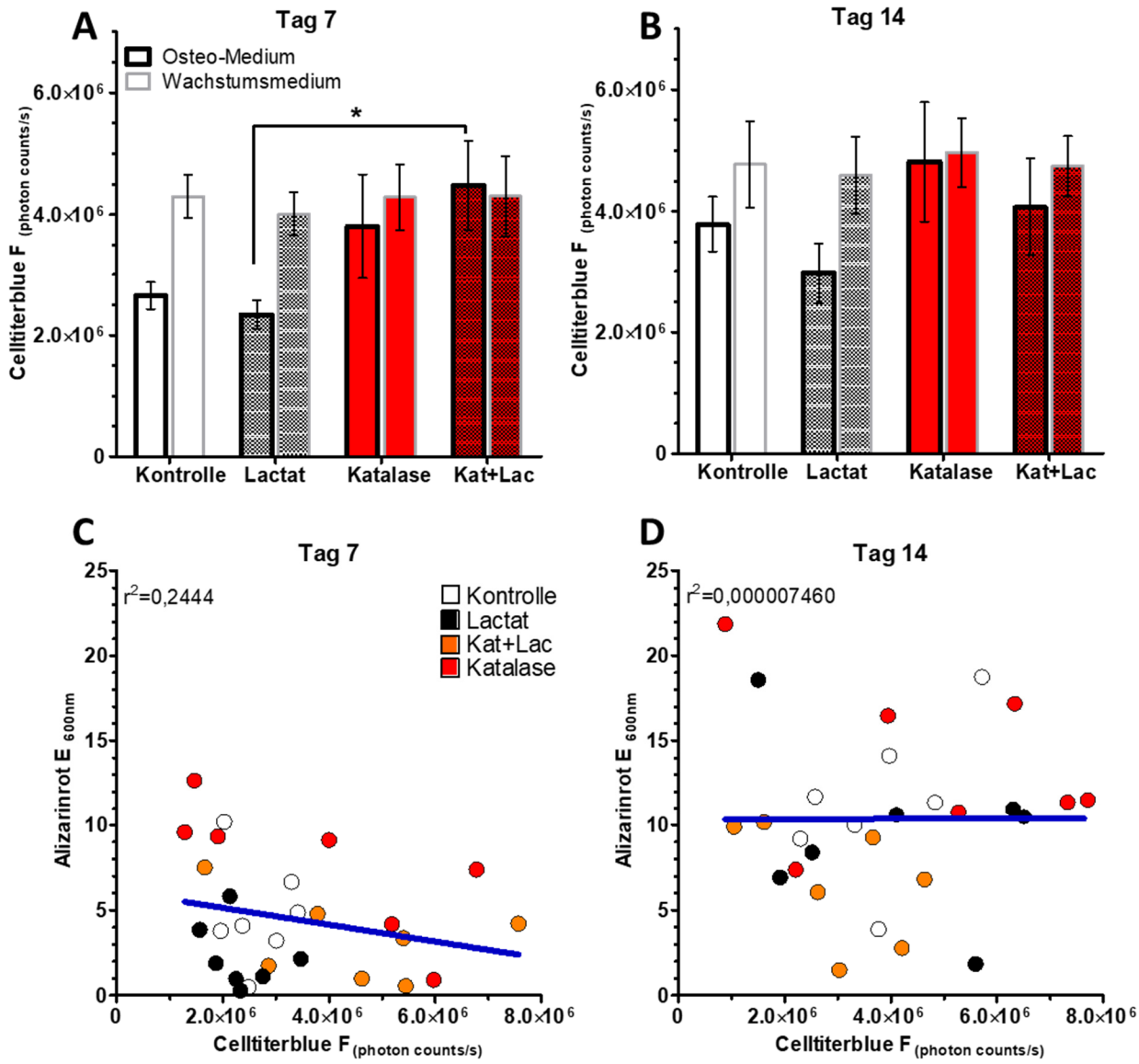


*Abbildung 32 Celltiterblue-Fluoreszenz als Maß für die Zellvitalität. (A und B) zeigen die Celltiterblue Werte der verschiedenen Behandlungen von n=7 mit SEM und 1way-Anova mit Friedman Test,*p≤0,05. (C und D) zeigt die Werte jeder Probe mit Osteo-Medium aus A und B aufgetragen gegen den jeweiligen Wert für Alizarinrot (siehe auch folgende Graphen). In blau die Linie der linearen Regression aller Punkte, n=7.*

Lactat hemmt die Osteogenese und verringert auch die durch Katalase verstärkte Differenzierung

Wie stark der Einfluss von Lactat die Osteogenese hemmt, zeigen folgende Ergebnisse (Abb.33). Die Lactat-Zugabe verringert sowohl die frühe Osteogenese an Tag 7, als auch die Spätere an Tag 14. Auffällig ist zudem auch, dass Lactat den positiven Effekt der Katalase auf die Osteogenese aufhebt. So ist zwischen reiner Lactat und Zugabe von Katalase mit Lactat kaum Unterschied in den Werten der Alizarin-Färbung zu sehen.

Da Lactat (über Umwandlung in Pyruvat durch die Lactatdehydrogenase) als Substrat des Citrat-Zyklus in den Mitochondrien dient, wird sich folgend auf den Einfluss von Lactat auf die Mitochondrien während der osteogenen Differenzierung fokussiert.

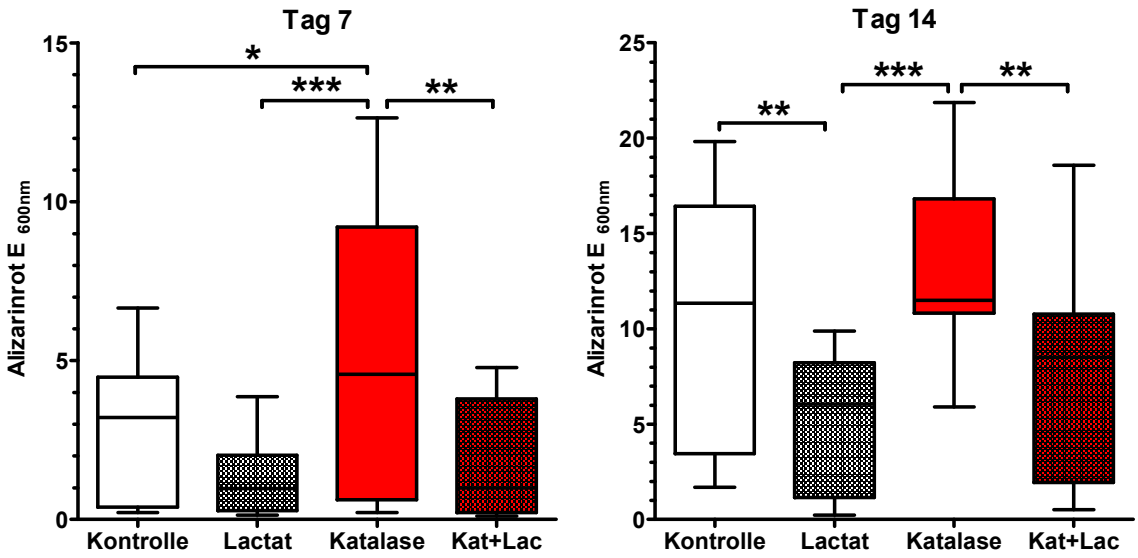


*Abbildung 33 Calcium Akkumulation in ASCs an Tag 7 und 14 der osteogenen Differenzierung, angezeigt an der Extinktion des heraus gelösten Alizarinrot nach vorheriger Färbung. Boxplots mit Whiskers Min bis Max. 1-way Anova, Tukey Test mit *p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01, ***p ≤ 0.001, n=9.*

Lactat erhöht das Membranpotential der Mitochondrien von osteogen induzierten ASCs

Das mitochondriale Membranpotential lässt sich mit dem Farbstoff JC-1 detektieren. Die Mitochondrien erscheinen im polarisierten Zustand rot und mit erhöhter Depolarisierung zeigen die Zellen eine grüne Färbung des Cytosols (siehe dazu auch Methode „JC1“). Am Tag 2 (48 h) der osteogenen Differenzierung der ASCs zeigt die Färbung mit JC-1 mikroskopisch sowohl rote Mitochondrien, als auch grün gefärbtes Cytosol bei der Kontrolle sowie allen Zusätzen Abb. 34 A).

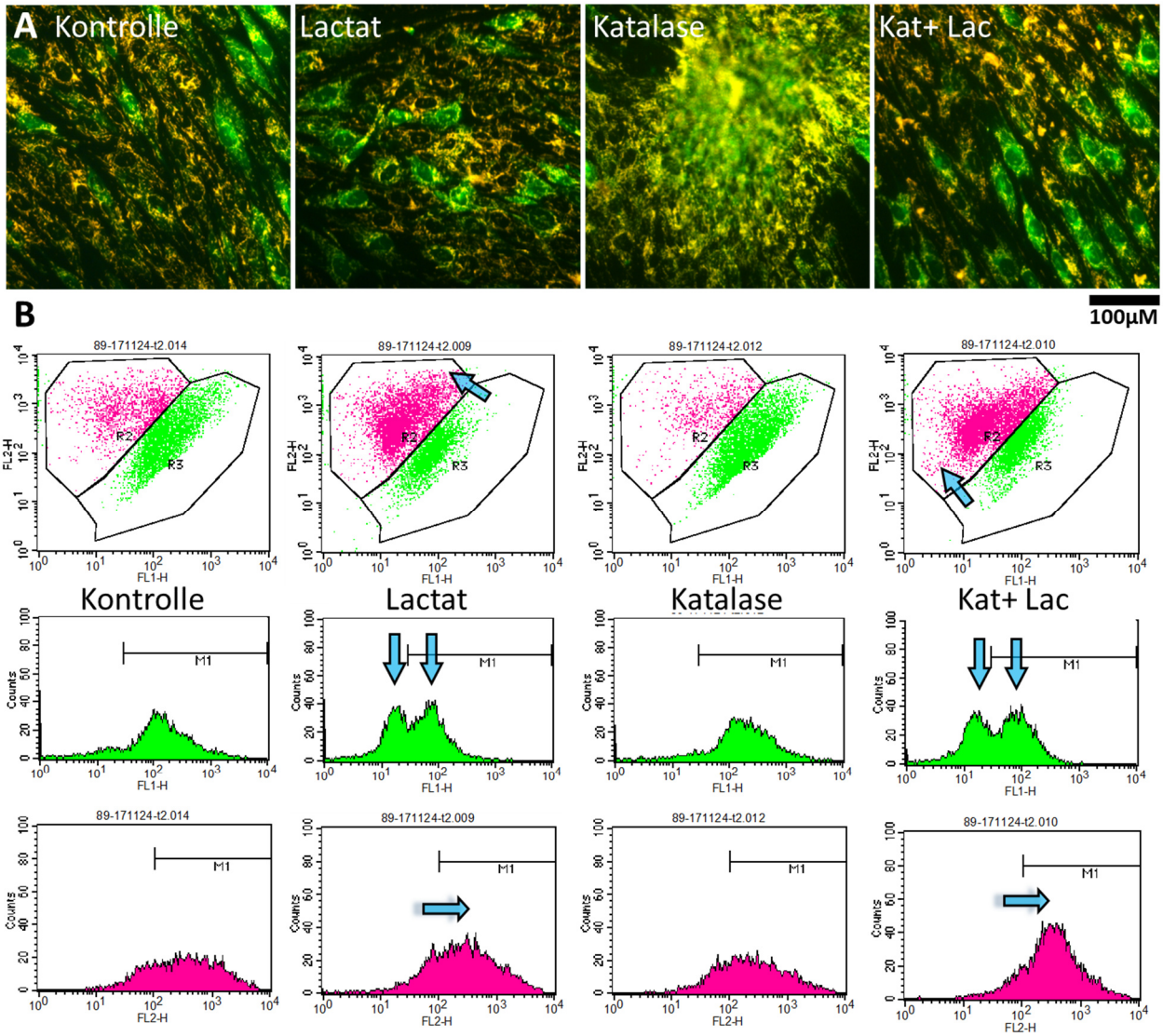


Abbildung 34 JC1-Fluoreszenzfärbung von ASCs nach 2 Tagen (48 h)osteogener Differenzierung zur Überprüfung der Polarisierung der Mitochondrien. Fotos an Tag 2 (A). Rot Färbung der Mitochondrien zeigt eine Polarisierung an. Grün angefärbtes Cytosol spricht für eine Depolarisierung der Mitochondrien. B zeigt in der oberen Reihe Dotplots mit rot gefärbten (polarisierten) ASCs detektiert im FL2 Kanal und grün gefärbten (depolarisierten) ASCs im FL1 Kanal. Die Mittlere Reihe zeigt Histogramme des FL1 Kanals bzw. die Zellen der Region R3 des Dotplots. Der Bereich (M1) markiert hier die Zellen mit positivem Signal, das für die Auswertung (siehe Abb. 20) genutzt wird. Die unterste Reihe zeigt Histogramme des FL2 Kanals bzw. die Zellen der Region R2 des Dotplots. Blaue Pfeile zeigen auf verschobene Zellwolken oder veränderte Peak-Bildung.

Zur quantitativen Bestimmung wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie gemessen (Abb. 34 B). Der Dotplot der Kontrolle zeigt zwei voneinander abgrenzbare Punktwolken. Die roten Zellen (mit polarisierten Mitochondrien) sind deutlich weniger vertreten, als die grünen Zellen (mit depolarisierten Mitochondrien). Die Histogramme dieser beiden Regionen (FL1=grün, FL2=rot) sind unter dem Dotplot gezeigt. Es ist ein Peak für grüne (depolarisierten M.) und ein flacher Hügel für rote (polarisierte M.) Zellen zu sehen. Der Zusatz von L-Lactat verschiebt die Verhältnisse stark in Richtung der polarisierten Mitochondrien (rot). Die ASCs mit polarisierten Mitochondrien dominieren im Dotplot. Das Histogramm zeigt zwei Peaks im grünen FL1-Kanal. Der linke Peak ist außerhalb des markierten Bereichs (M1) welches einen Verlust von grünem Fluoreszenzsignal bedeutet. Gleichzeitig zeigt sich nun aber ein höherer nach rechts verschobener Peak im roten FL2-Kanal, ein Zuwachs an rotem Signal, also polarisierten Mitochondrien. Die Ergebnisse für Katalase-Zusatz ähneln stark der Kontrolle. Es sind jedoch noch weniger rot fluoreszierende Zellen vorhanden und der Hügel des roten Histogramms ist passend dazu etwas nach links verschoben. Die kombinierte Zugabe von Katalase und Lactat zeigt hingegen starke Ähnlichkeiten mit den Ergebnissen für Lactat alleine. Der Peak im roten Histogramm ist hier noch etwas deutlicher.

Die Auswertung der Histogramme von 4 Spendern an Tag 2 und 5 (Abb.35) zeigt die Tendenz, dass Zellen mit Katalase etwas weniger rotes Signal (polarisierte Mitochondrien) besitzen, als die Kontrolle. Der Zusatz von Lactat führt zu einem Anstieg von rotem Fluoreszenzsignal und somit einem Anstieg von polarisierten Mitochondrien in den ASCs.

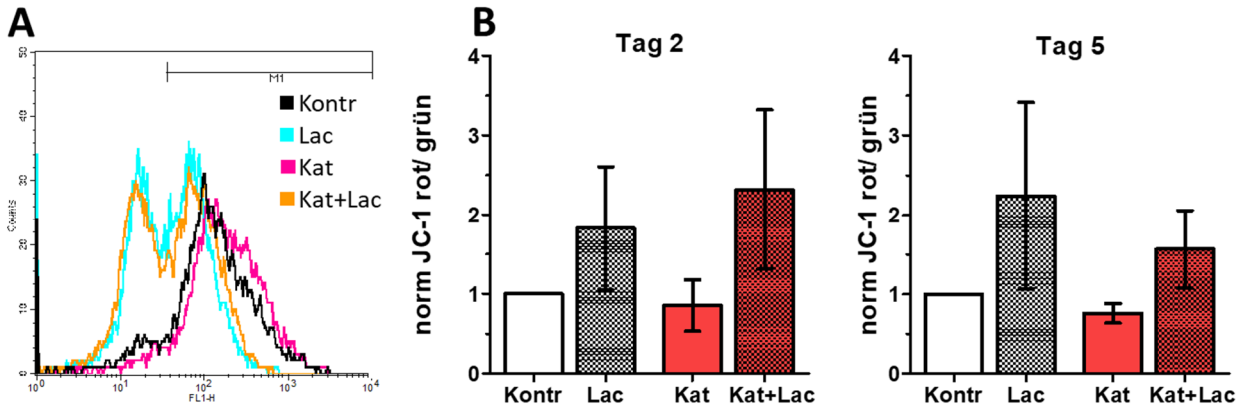


Abbildung 35 Auswertung der Durchflusszytometrie der JC1-Fluoreszenzfärbung von ASCs nach 2 und 5 Tagen osteogener Differenzierung. (A) Überlagerung der Histogramme der depolarisierten ASCs zeigt anschaulich die Bildung von zwei Peaks und Linksverschiebung bei Lactat-Zugabe. (B) Rote ASCs relativ zu grünen ASCs, außerdem sind die relativen Werte auf die Kontrollen normiert. 1-way Anova, Friedman-Test und Dunns Post-Test, n=4, SEM.

Katalase verringert Expression von beigen Adipozyten Proteinen und steigert die Expression von osteogenen Markerproteinen sowie MnSOD

Das Transmembranprotein UCP1 ist maßgeblich an der Polarisierung von Mitochondrien beteiligt. Die Fluoreszenzfärbung von UCP1 an Tag 7 der osteogenen Differenzierung zeigt dessen Vorhandensein in den osteogen differenzierenden ASCs an (Abb. 36). Das UCP1 Signal ist außerdem mit Cytochrom-c kolokalisiert. Als Protein der Atmungskette ist dieses ebenfalls in der Mitochondrienmembran lokalisiert. Das Fluoreszenzsignal von UCP1 und Cyt-c erscheint mit Katalase-Zusatz weniger stark.

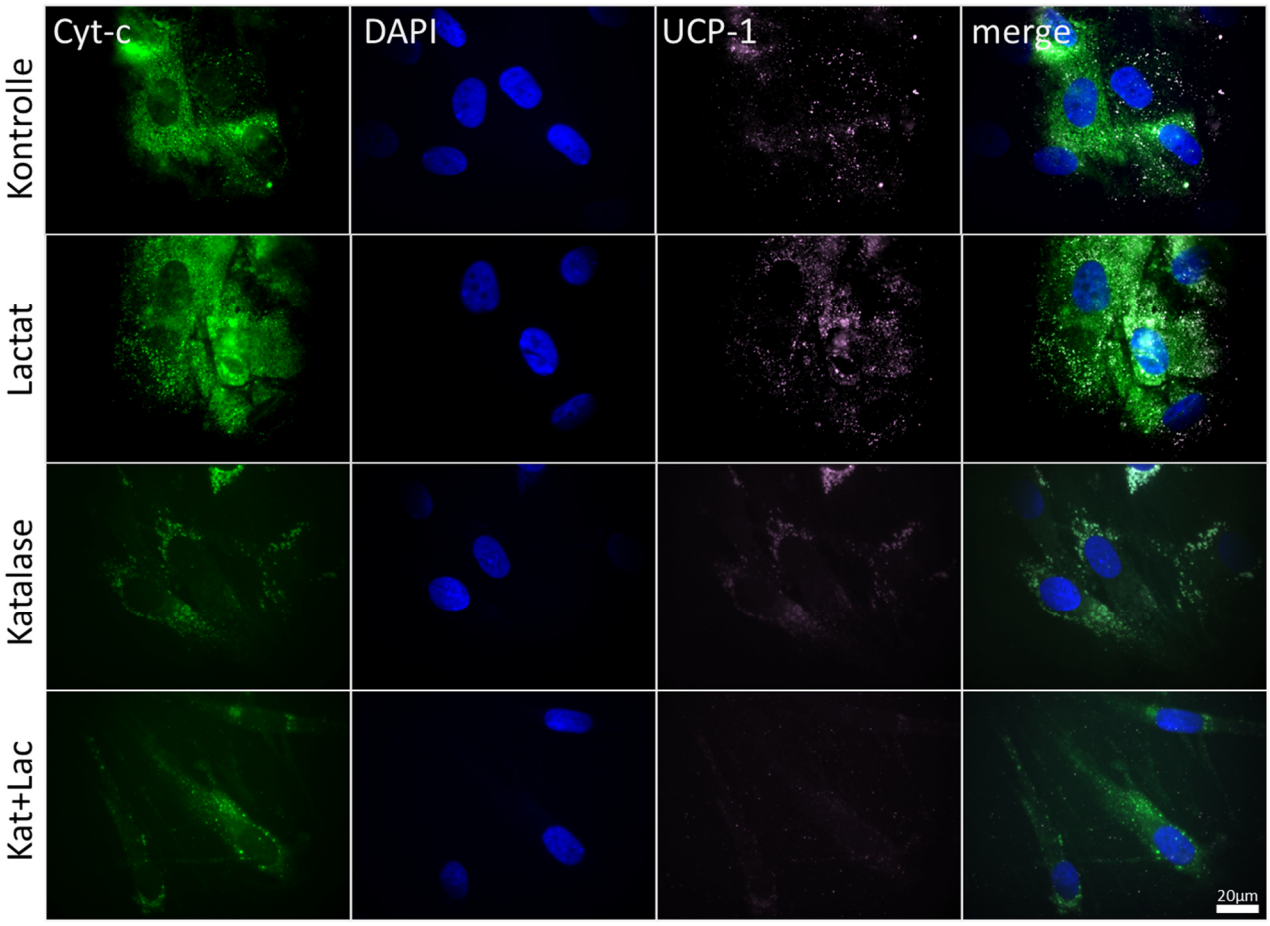


Abbildung 36 UCP1 Expression in ASCs an Tag 7 der osteogenen Differenzierung. UCP1 (rosa) co-lokalisiert mit Cytochrom-c (grün). Zusätzlicher Cytochrom-c-Release ins Zytoplasma in Kontrolle und Lactat-Probe erkennbar an großflächigeren grünen Arealen. Wenig UCP1-Signal mit Katalase oder Kat+Lac. Zellkerne gefärbt mit DAPI (blau). Scale 20µm.

Tatsächlich ist hier auch die Proteinexpression von UCP1 signifikant verringert. Die Western-Blot Ergebnisse zeigen zudem verringertes Cyt-c bei Katalase-Zusatz. Auch die Expression der anderen untersuchten Markerproteine der beigen Adipozyten, CD137 und TBX1 werden durch Katalase Zugabe verringert. Hingegen wird PPARγ, ein Marker der weißen Adipozyten durch Lactat-Zugabe verringert. Die MnSOD-Expression wird durch Katalase-Zusatz erhöht (auch signifikant, siehe Abb.28 D, mit höherer n-Anzahl) und durch Lactat leicht verringert.

Insgesamt scheint Lactat Zusatz zur Katalase dessen Effekte für alle bereits genannten Proteine aufzuheben. Anders verhält es sich für die drei osteogenen Markerproteine RUNX2, OPN und OCN. Diese werden durch Katalase Zusatz erhöht und Lactat kann diesen Effekt nur etwas verringern.

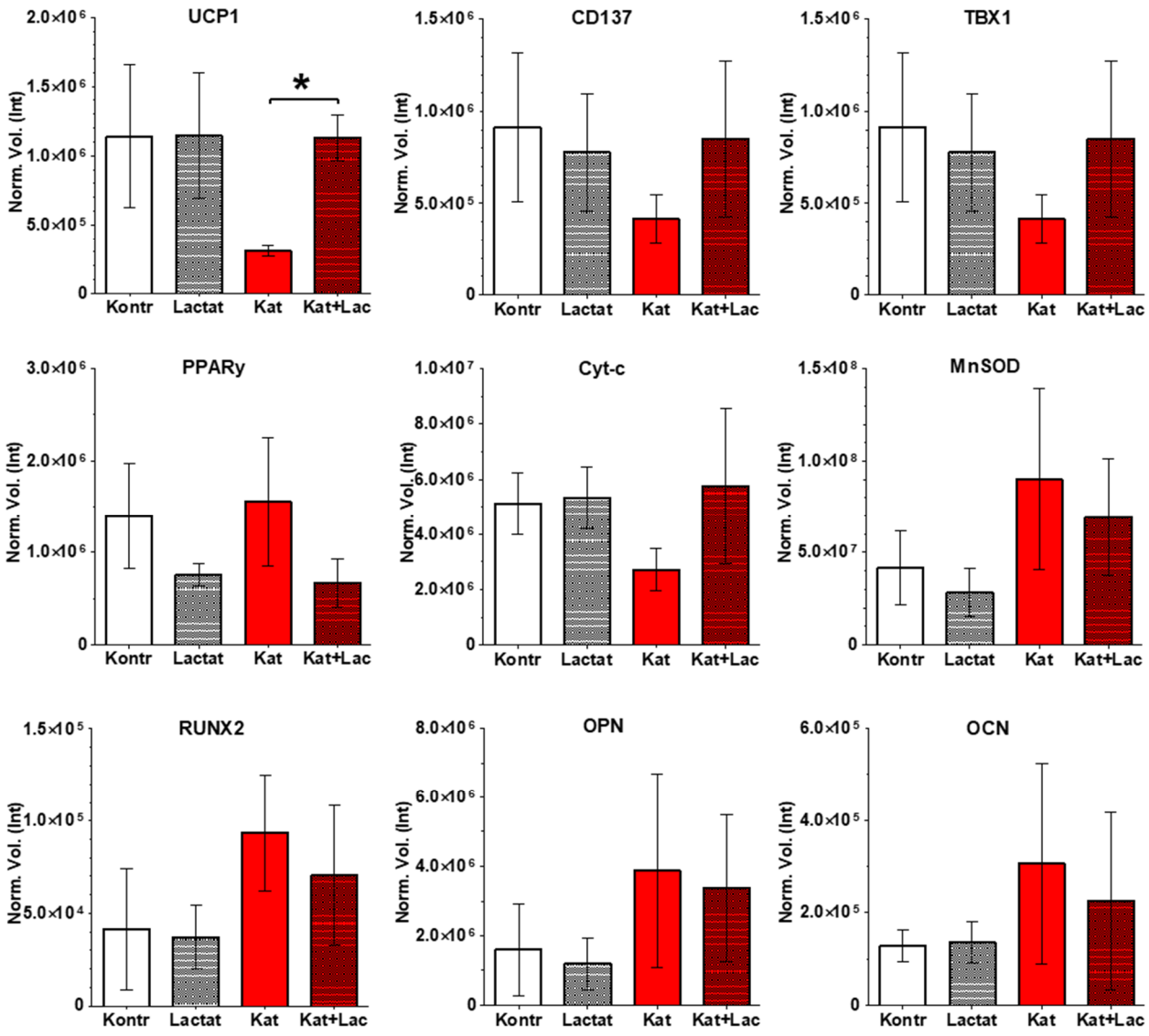


*Abbildung 37 Western Blot von ASCs an Tag 7 der osteogenen Differenzierung. Banden Volumen normalisiert auf Gesamtprotein. t-Test für gepaarte Stichproben mit *p≤0,05 von n=4 ± SEM.*

Die Mitochondriale Atmung wird durch Katalase-Zusatz verändert, zudem unterscheiden sich ASCs und DFATs deutlich

Um einen tieferen Einblick in die zellulären Prozesse der osteogen differenzierenden ASCs und DFATs zu bekommen, wurde die mitochondriale Atmung untersucht. Dafür wurden die Zellen einen Tag mit den verschiedenenen Zusätzen unter osteogener Induktion inkubiert und dann getestet.

Der Glycolyse-Stress-Test zeigt (Abb.38 A und B), dass die Glycolyse nach Einspritzung von Glucose bei ASCs und DFATs, ob mit oder ohne Katalase ähnliche Werte zeigt. Bei den gemessenen Werten handelt es sich um die extrazelluläre Ansäuerung (ECAR), der Anstieg von Protonen im Medium wird detektiert. Nach Oligomycin-Einspritzung wird die Glycolytische Kapazität gemessen. Durch die Inhibition der ATP-Synthase, findet die Energiegewinnung der Zellen nur über die Glycolyse statt, welche ansteigt. Die gemessenen Werte unterscheiden sich hier. DFATs haben eine erhöhte Glycolyse-Kapazität. Der Katalase-Zusatz hat kaum Einfluss auf die Werte. Die Differenz von basaler zur maximalen Glycolyse-Kapazität ist die Glycolytische Reserve. Diese ist ebenfalls für die DFATs signifikant erhöht. Nach Einspritzung von 2-DG wird die Glycolyse gehemmt und die ECAR-Kurven sinken ab.

Der Mito Stress Test misst den Sauerstoffverbrauch der Zellen und gibt diesen als OCR (Oxygen Consumption Rate) wieder (Abb. 38 C und D). Die basale Atmung zeigt dabei den normalen Sauerstoff-Verbrauch der Zellen und die extrazelluläre Ansäuerung durch sämtliche zelluläre Prozesse. ASCs und DFATs zeigen hier keinen Unterschied und auch der Zusatz von Katalase ändert dies nicht. Nach Einspritzung von Oligomycin sinken die Kurven ab. Die so ermittelten Protonen Leaks zeigen untereinander kaum Unterschiede. Die Einspritzung von FCCP permeabilisiert die Mitochondrienmatrix für Protonen und entkoppelt so die Atmungskette. Die so gemessene maximale Atmung unterscheidet sich erheblich zwischen ASCs und DFATs. Die DFATs sind zu deutlich mehr Atmung fähig. Außerdem verringert Katalase die maximale Atmung in ASC. Die zusätzliche Atemkapazität ist der Zuwachs an OCR von basaler zur maximalen Atmung. Diese ist für DFATs ca. doppelt so hoch, wie für ASC. Katalase verringert auch die zusätzliche Atemkapazität der ASCs um ca. 32%.

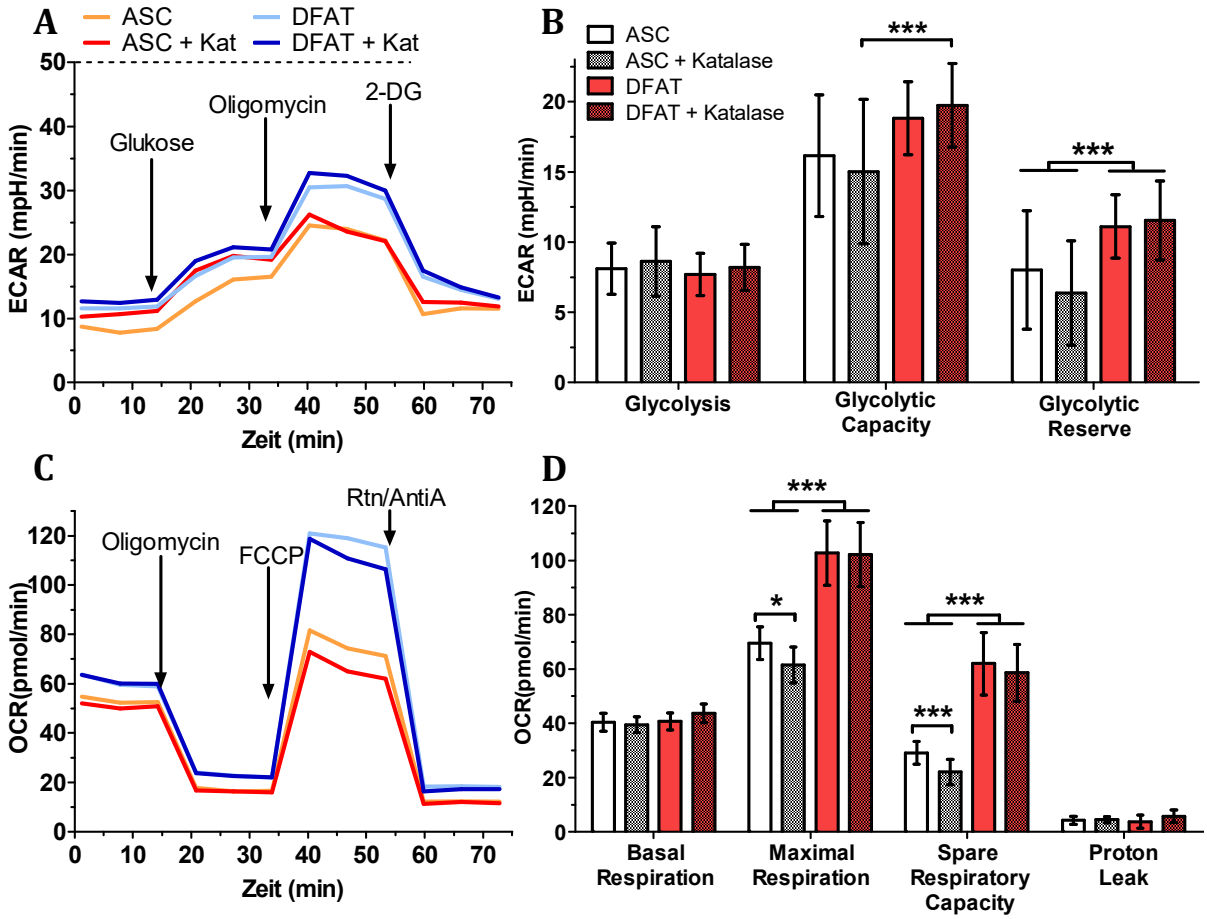


Abbildung 38 Glycolyse-Stress Test und Mitochondrien Stress-Test von ASCs und DFATs unter osteogenen Differenzierungsbedingungen. A und B : Glycolyse-Stress-Test. C , D : Mitochondrien-Stress-Test.

In weiteren Versuchen wurde die Auswirkung von Lactat untersucht: Der Glycolyse-Stress-Test zeigt (Abb. 39 A und B), dass die Glycolyse nach Einspritzung von Glucose bei ASCs mit Lactat signifikant erhöht ist. Nach Oligomycin-Einspritzung wird die Glycolytische Kapazität gemessen. Durch die Inhibition der ATP-Synthase, findet die Energiegewinnung der Zellen nur über die Glycolyse statt, welche ansteigt. Lactat ändert diese im Vergleich zur Kontrolle nicht. Die Differenz von basaler zur maximalen Glycolyse-Kapazität (Glycolytische Reserve) ist aufgrund der ersteren Werte für Lactat-Zusatz erhöht. ASC, die vor dem Assay mit Lactat inkubiert wurden zeigen also eine erhöhte basale Glykolyse, ohne dass die glykolytische Kapazität verändert wird.

Der Mito Stress Test zeigt folgendes (Abb. 39 C und D). Die basale Atmung von ASCs und ASCs mit Lactat zeigen keinen Unterschied. Nach Einspritzung von Oligomycin sinken die Kurven ab. Die so ermittelten Protonen Leaks zeigen kaum Unterschiede. Die gemessene maximale Atmung nach Einspritzung von FCCP unterscheidet sich erheblich zwischen ASCs und ASCs mit Lactat. Der Lactat-Zusatz verstärkt die maximale Atmung. Das gleiche gilt für

die zusätzliche Atemkapazität, welche um ca. 84% erhöht ist. Lactat-Zusatz induziert somit die Atemkapazität der Mitochondrien.

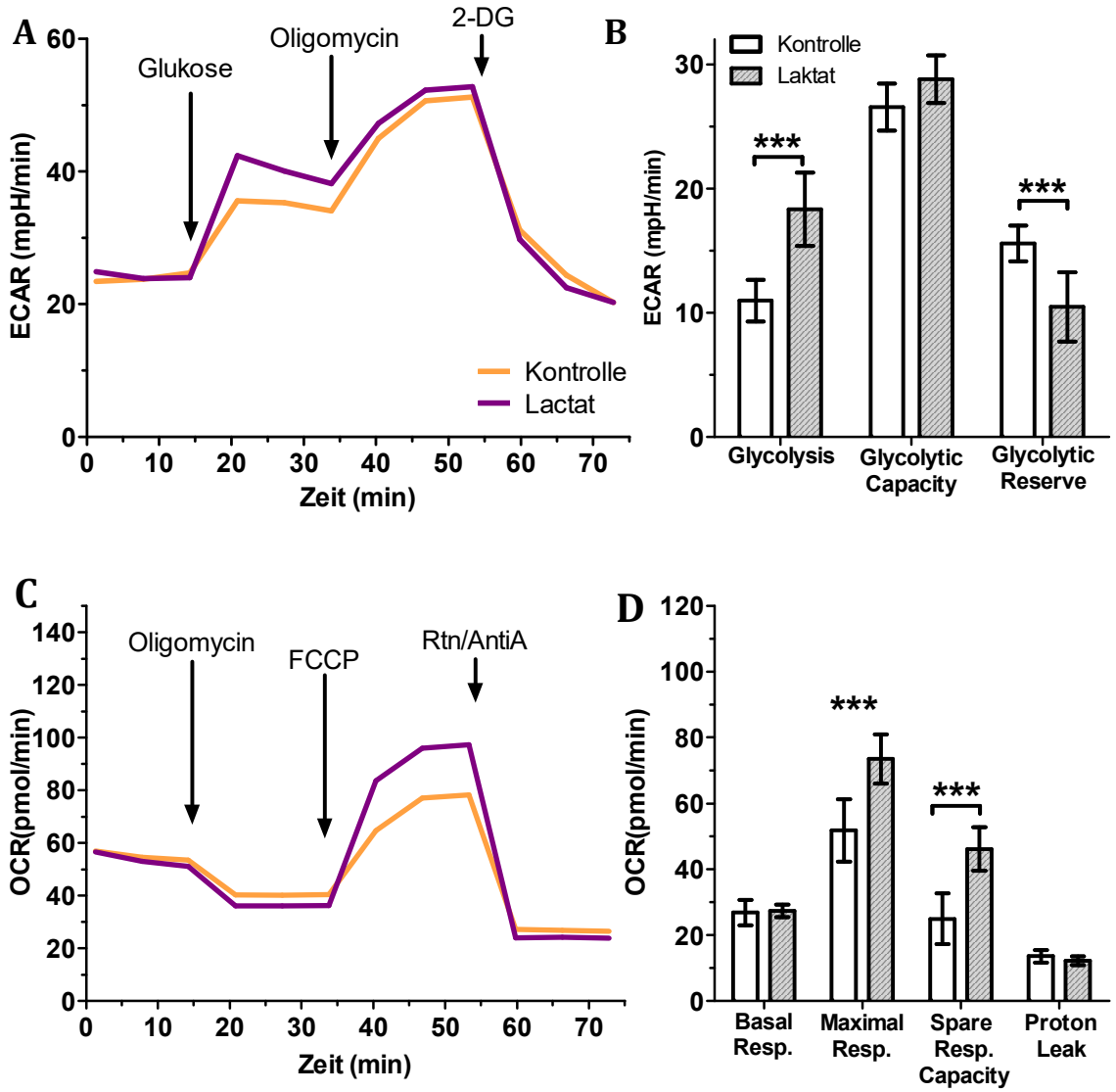


Abbildung 39 Glycolyse-Stress Test und Mitochondrien Stress-Test von ASCs unter osteogenen Differenzierungsbedingungen, mit Lactat. A und B :Glycolyse-Stress-Test. C, D : Mitochondrien-Stress-Test.

Die Kopplungseffizienz (*Coupling Efficiency*) (Abb. 40). beschreibt die ATP Produktion in Bezug auf die basale Atmung. Die DFATs mit Katalase zeigen eine leichte Abnahme dieser, während sich bei Lactat Zusatz die Kopplungseffizienz erhöht. Dies ist ein Hinweis für vermehrten Einstrom von Protonen in die Mitochondrienmatrix, die über ATPase oder auch über UCP1 transportiert werden.

Die zusätzliche Atmungseffizienz (*Spare Respiratory Capacity*) beschreibt die maximale Atmung in Bezug auf die basale Atmung. Diese ist in DFATs deutlich erhöht in Vergleich zu ASC. Zudem hemmt der Zusatz von Katalase diese in beiden Zelltypen. Gegenteilig dazu haben die mit Lactat inkubierten ASCs eine deutlich erhöhte zusätzliche Atmungseffizienz. Hohe

Werte bedeuten eine verstärkte oder beschleunigte Atmungskette. Lactat Zusatz bedeutet auch eine Bereitstellung von erhöhten Mengen von Substrat (Pyruvat, NADH H^+) vor der Durchführung des Tests. Des Weiteren ist auch die mitochondriale ATP Produktion mit vorherigem Lactat Zusatz erhöht. Auch die DFATs scheinen etwas mehr ATP zu produzieren, als die ASC.

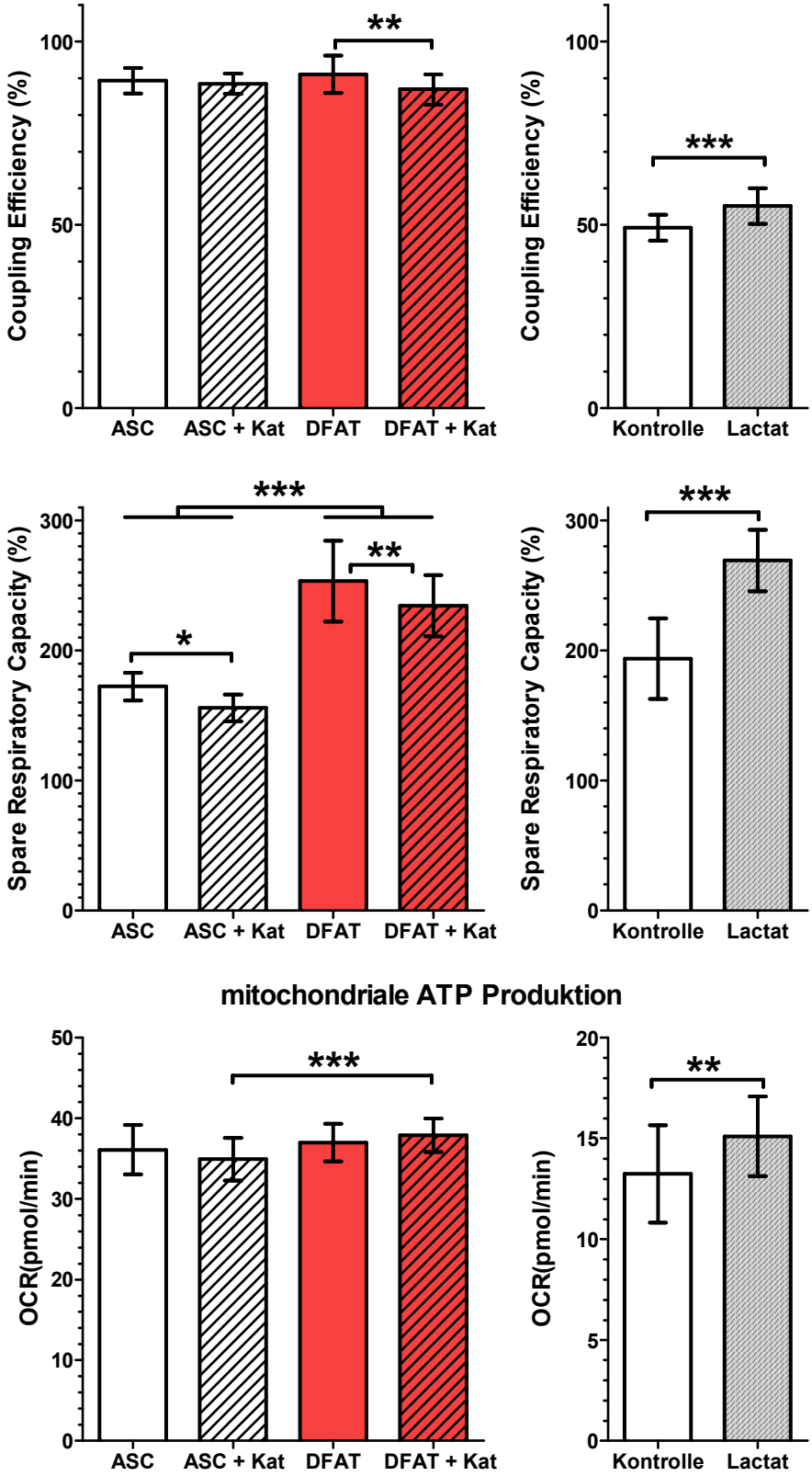


Abbildung 40 von ASCs und DFATs unter osteogenen Differenzierungsbedingungen . Die rechten Graphen zeigen Ergebnisse von anderen Versuchen, als die linken Graphen, deswegen sind hier Unterschiede in den Y-Achsen.

Katalase und ihre Wirkung auf die Chondrogenese

Chondrogen differenzierende ASCs und Katalase

Die Induktion der Knorpelbildung der ASCs ist ein langwieriger Prozess. Erst nach 24 Tagen hat sich unter normalen Bedingungen (siehe Kontrolle in Abb. 41) mit chondrogenem Differenzierungsmedium, genug „Knorpel-Substanz“ gebildet, um diese gut Färben zu können. Die Färbung von saurem Proteoglykan in Chondrozyten und dessen EZM mit dem Farbstoff Alcianblau zeigt nur minimale Färbung der Zellen in DMEM (kein Diff.-Medium). Die Kontrolle zeigt stärkere Färbung und an Tag 24 auch erste hypertrophe Bereiche, mit stärkerer Blaufärbung, sowie kleine Lakunen (Löcher). Die Hypertrophierung und Lakunen-Bildung ist ein Anzeichen für die Chondrogenese. Der Zusatz von Katalase liefert vielversprechende Bilder. Schon an Tag 12 zeigt sich hier viel Färbung Hypertrophierung und die Bildung von Knorpel-typischen Lakunen. An Tag 24 ist starke Hypertrophierung und Lakunen-Bildung zu sehen, die EZM ist dunkelblau gefärbt. Das MnSOD Mimetikum MnTBAP zeigt hingegen ein ähnliches Bild, wie die Kontrolle. H_2O_2 zeigt wenig Färbung an Tag 12 und flächige hellblaue Färbung ohne Lakunen an Tag 24.

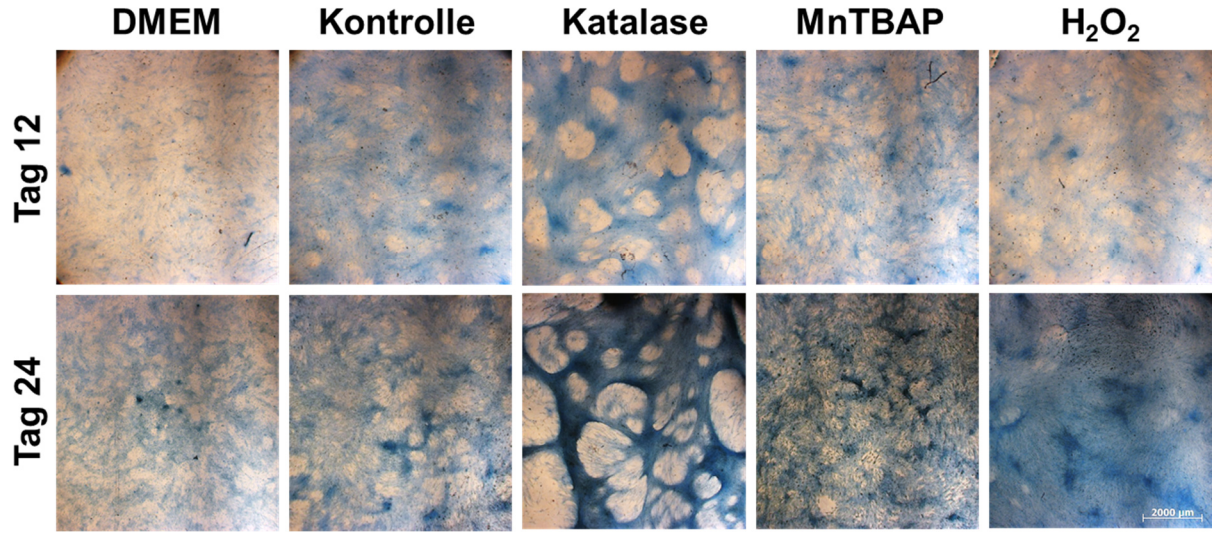


Abbildung 41 Chondrogene Differenzierung von ASCs an Tag 12 und 24. Färbung von sauren Proteoglykanen mittels Alcianblau (blau). Mikroskopische Aufnahmen im Phasenkontrast. Löcher, wie bei Katalase zeigen Lakunen-Bildung.

Das Alcianblau lässt sich aus den gefärbten Zellen herauslösen und so kann die tatsächliche Menge an entstandenem Proteoglykan bestimmt werden (Abb. 42). An Tag 12 sind alle Proben mit chondrogenem Differenzierungsmedium (+TGFβ) signifikant stärker gefärbt, als die Kontrolle mit Wachstumsmedium (DMEM). An Tag 24 sieht es hingegen deutlich anders aus.

Hier ist der Wert für Katalase extrem Erhöht, ein Zeichen für starke Chondrogenese. Tatsächlich ist Katalase allen anderen Zusätzen deutlich überlegen. Der Unterschied zwischen diesen anderen Zusätzen und DMEM war hier noch nichtmals signifikant, welches das Ergebnis von Katalase um so erfreulicher macht. ASCs lassen sich nur über lange Zeiträume und nicht zuverlässig chondrogen differenzieren. Mit einem Mittelwert von E=2.92 hat Katalase somit einen doppelt so hohen Wert wie die Kontrolle mit E=1.41. Wenn man den Kontroll-Wert auf den DMEM-Wert (1.02) normiert, bleibt noch ein Wert von E= 0.41 und für Kat ein Wert von 1.9. Der Zusatz von Katalase führt somit zu einer 5 fachen Verstärkung der Färbung.

Eine Alizarinrot-Färbung konnte mit Katalase dagegen an Tag 14 nicht beobachtet werden (Abb. 43). Die Werte sind für die Kontrolle und Katalase marginal. Es fand somit keine Osteogenese statt.

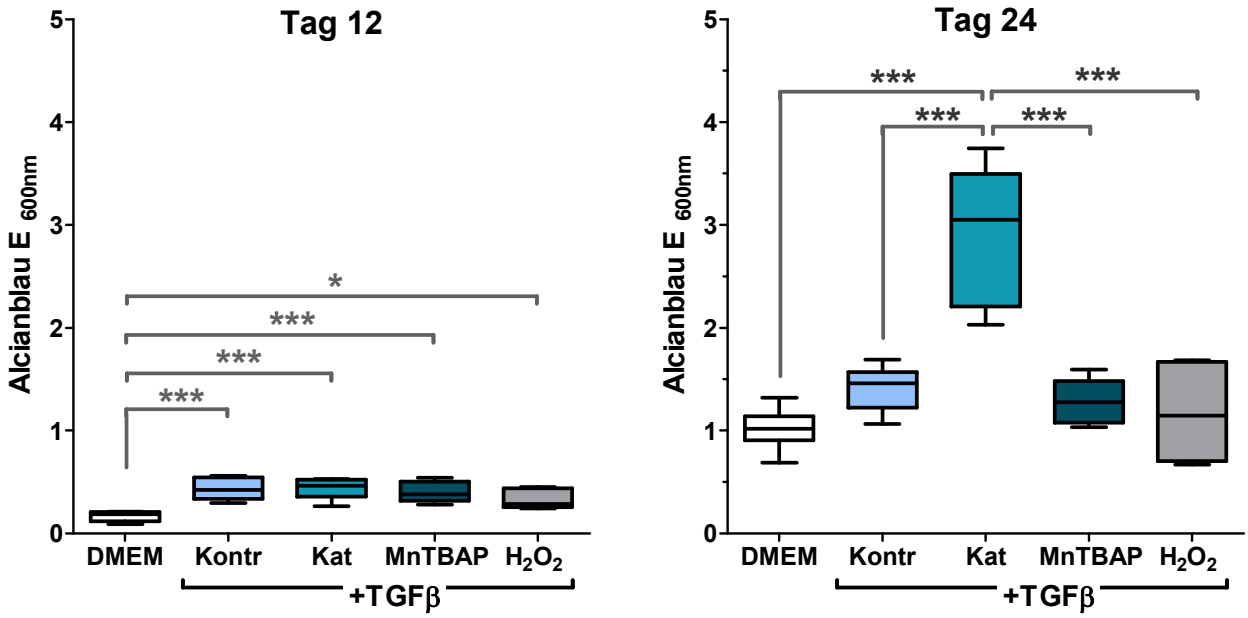


Abbildung 42 Chondrogene Differenzierung von ASCs an Tag 12 und 24. Nicht-differenzierte Zellen in DMEM. Alcianblau-Färbung für saure Proteoglykane. Werte der Extinktion des heraus-gelösten Alcianblaus. One-way ANOVA, n=6 Tukey Post-Test p<0.05, <0.01**,< 0.001***.*

Beobachtung der Knorpel-typischen Matrixproteine Aggrecan und Collagen II

Nach 24 Tagen chondrogener Differenzierung zeigt die Immunfluoreszenzfärbung der ASCs bei den mit Katalase versetzten Zellen vermehrt Matrix-Protein Aggrecan und Collagen II. Es findet Hypertrophierung der Zellen statt, sichtbar an Stellen mit extrem starken Fluoreszenz-Signal. Auch die Kontrolle zeigt etwas Aggrecan-Bildung und ähnlich starke Collagen II-Bildung, wie mit Katalase. Die DMEM-Kontrolle, ohne chondrogene Induktion zeigt kaum Signal. Die Image J Auswertung für positiv grüne Flächen zeigt ähnliches Ergebnis (Abb. 43 und 45).

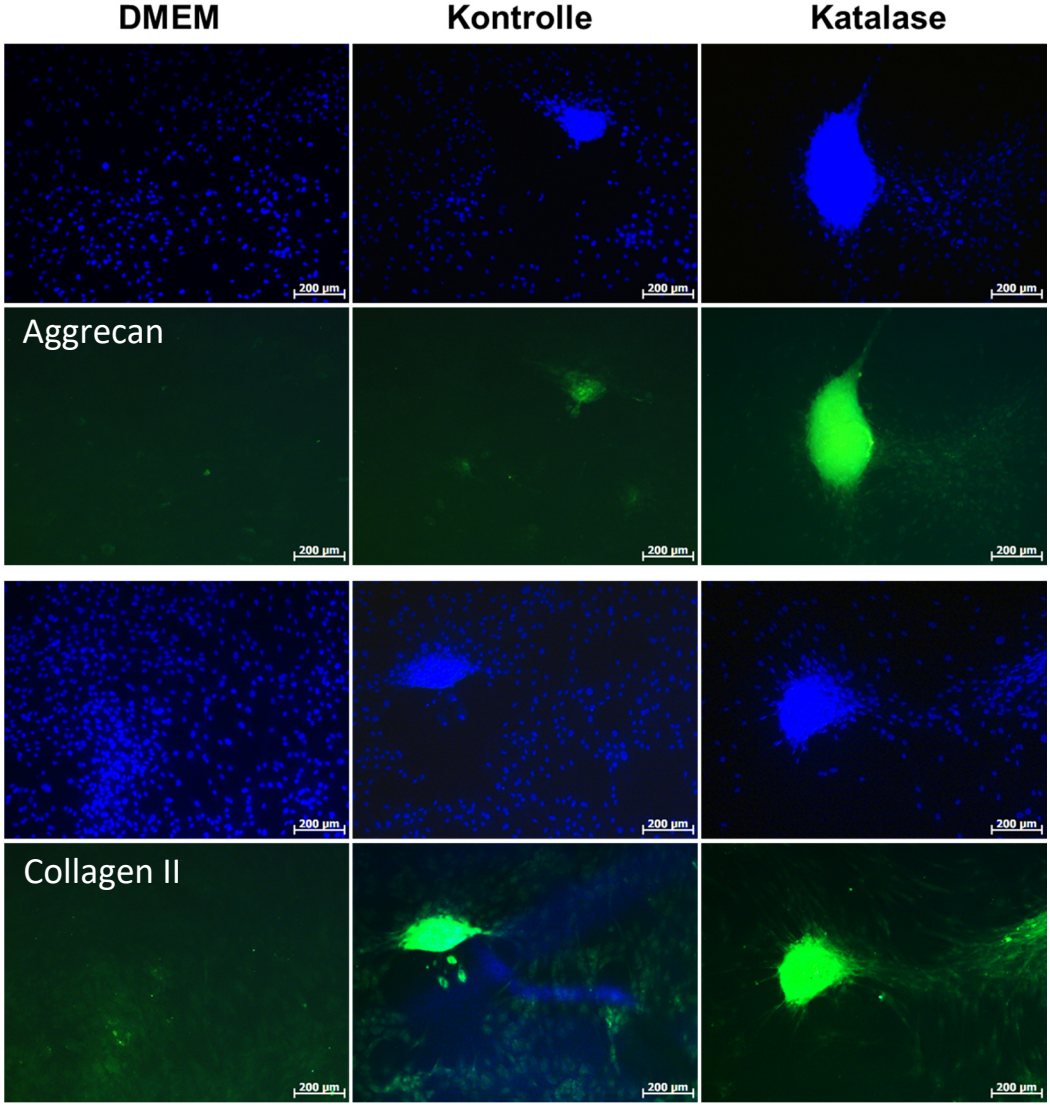


Abbildung 43 Die ASCs wurden über 24 Tage chondrogen differenziert. Nicht-differenzierte Zellen in DMEM, Kontrolle und Katalase in chondro. Medium. IF-Färbung Aggrecan oder Collagen 2 mit Fitc (grün) und DAPI für die Zellkerne (blau).

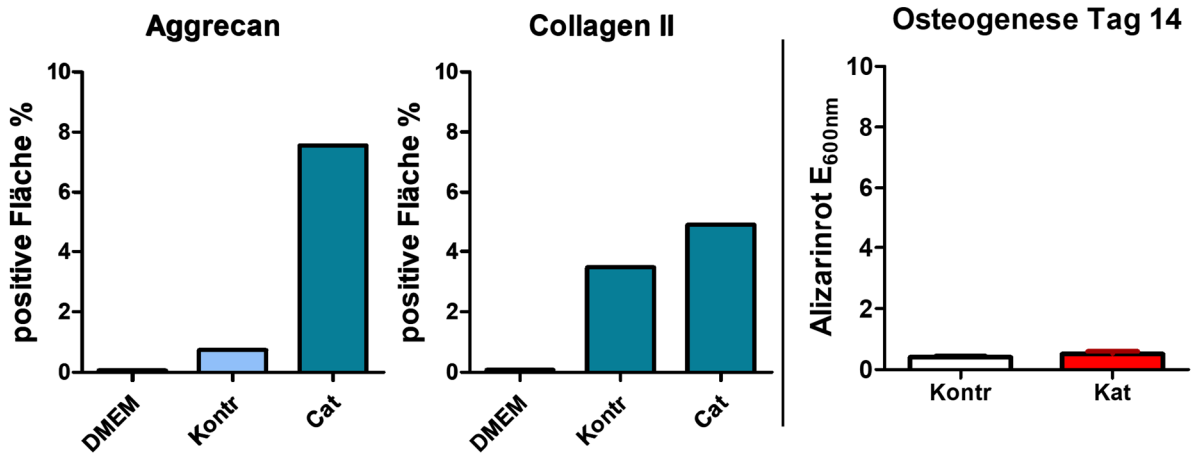


Abbildung 44 Die ASCs wurden über 24 Tage chondrogen differenziert. Nicht-differenzierte Zellen in DMEM, Kontrolle und Katalase in chondro.Medium. Auswertung der Bilder mittels ImageJ für Fläche mit grünem Fluoreszenzsignal, von Abb. 43. Rechts: An Tag 14 wurde mögliche Osteogenese während der chondrogenen Differenzerung mit der Alizarinrotfärbung untersucht., t-Test für gepaarte Stichproben, n=4, n.s.

Der Einfluss von Katalase auf den chondrogenen Wachstumsfaktor SOX9

Der Trankriptionsfaktor SOX9 ist der Haupt-Induktor der Chondrogenese von MSCs. Die Immunfluoreszenzfärbung wurde am Tag 8 nach Start der chondrogenen Induktion durchgeführt (Abb. 45). Die Färbung zeigt eine typische Lokalisation von SOX9 in den Nuclei und geringe Färbung im Zytoplasma in allen Proben. Der Zusatz von Katalase sticht hier heraus. Das Fluoreszenzsignal in den Zellkernen ist sehr stark, welches auf besonders viel SOX9 in diesen schließen lässt. Die Auswertung mittels ImageJ zeigt die relative Fluoreszenzintensität von 5 Spendern mit je 12-38 Nuclei. Die Intensität des SOX9-Signals in den Zellkernen ist mit Katalase signifikant erhöht im Vergleich zur undifferenzierten sowie differenzierten Kontrolle. Die Tatsache, dass zwischen DMEM und Kontrolle kaum Unterschied zu sehen ist, beweist, wie langsam der chondrogene Differenzierungsprozess mit dem normalen Differenzierungsmedium dauert. Katalase kann hier entscheidende Vorteile bringen. MnTBAP scheint etwas mehr SOX9 Signal zu besitzen, als die Kontrollen.

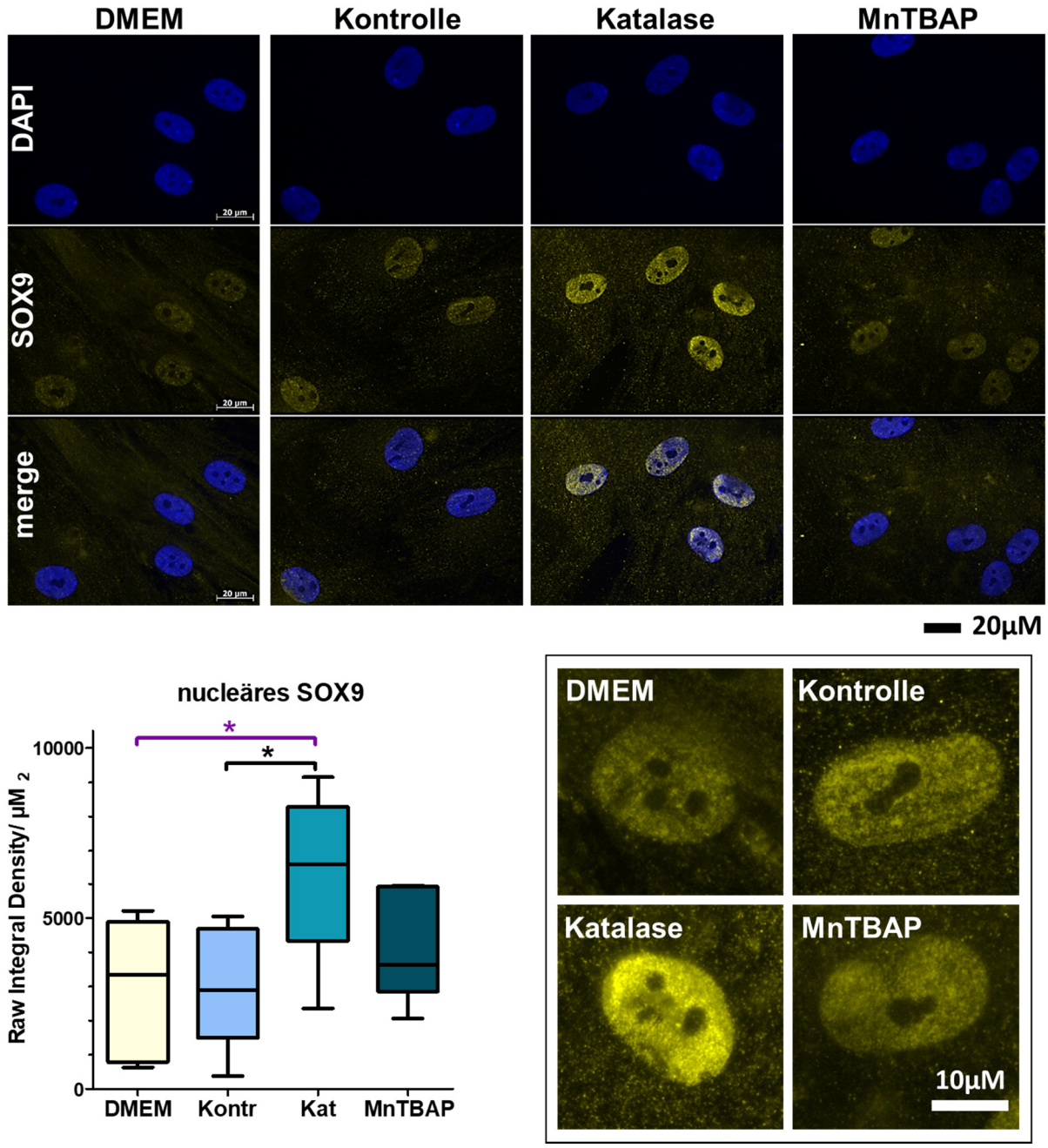


Abbildung 45 Die ASCs wurden über 8 Tage chondrogen differenziert. . IF-Färbung SOX9-Fitc (gelb) und Nuclei mit DAPI (blau) . Raw Integral Density der Nuclei mit Image J ermittelt. T-Test für gepaarte Stichproben, n=5 je von 12-38 Nuclei in mehreren Bildern, p<0.05.*

Diskussion

ASCs und DFATs und ihr osteogenes Differenzierungspotential

Durch die stetige Entwicklung neuer regenerativer Therapien steigt auch der Bedarf an MSCs. Menschliches Fettgewebe, das reich an ASCs ist, stellt eine sehr attraktive Quelle für zelltherapeutische Maßnahmen dar [43, 99]. Fettgewebe kann minimal-invasiv isoliert werden, welches das Risiko für Nebenwirkungen und gesundheitliche Komplikationen verringert. Aus diesem Fett lassen sich relativ einfach und zuverlässig ASCs isolieren.

Ein möglicher Nachteil beim therapeutischen Einsatz von ASCs ist die große zelluläre Heterogenität dieser Zellfraktion. Die stromale Fraktion des Fettgewebes enthält neben Präadipozyten nämlich auch Fibroblasten, Endothelzellen, deren Vorläufer und möglicherweise weitere Zelltypen. Außerdem kommen die differenzierungsfähigen Zellen des Fettgewebes in unterschiedlichen Anteilen in der gewonnenen Stromafraktion vor und haben auch unterschiedliche Differenzierungspotentiale, z.B. hinsichtlich ihrer osteogenen Kapazität. Aus eigener Erfahrung, aber auch aus zahlreichen Veröffentlichungen wissen wir, dass das Differenzierungspotential eines einzelnen ASC-Präparates nicht verlässlich vorhergesagt werden kann. Eine einheitlichere Zellpopulation mit ähnlichem Differenzierungspotential könnte bessere und zuverlässigere Ergebnisse ermöglichen.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, diese Annahme zu überprüfen. Zu diesem Zweck wurde das osteogene Differenzierungspotential (ODP) von ASCs mit dem von DFATs (dedifferenzierte Fettzellen) derselben Fettgewebe-Probe vergleichen.

Von adulten Adipozyten abstammende DFATs repräsentieren im Gegensatz zu heterogenen ASCs eine hochgradig homogene Zellpopulation. Dennoch zeigen DFATs einen ähnlichen Antigen-Phänotyp wie ASC-Kulturen. Darüber hinaus sind sie in der Lage, adhärent zu wachsen und können, wie ASC, effektiv in adipogene, chondrogene und osteogene Zellen differenziert werden. In der Analyse des osteogenen Differenzierungspotentials (ODP) ist zu sehen, dass das ODP einer DFATs-Kultur signifikant mit dem ODP der entsprechenden ASCs desselben Spenders korrelierte. Somit hatten z.B. Spender-ASCs mit niedrigem ODP auch DFATs mit niedrigem ODP und umgekehrt.

In den untersuchten Proben war die Korrelation der ODPs der generierten ASCs und DFATs hochsignifikant. Diese sehr wichtigen Ergebnisse stehen im Widerspruch zu früheren Studien, bei denen die DFATs-Kulturen deutlich höhere ODPs hatten, als die ASC-Kulturen [55, 118].

Allerdings bestätigte eine weitere Studie, mit Fokus auf ASCs und DFATs von 12 älteren Spendern mit Osteoporose, die in dieser Arbeit beobachtete Korrelation der ODPs [43].

Ungeachtet der diskutierten eindeutigen Korrelation wurde eine enorme Variation der ODPs zwischen den Spendern festgestellt (bis zu einem Faktor von 20). Bei einer so großen Bandbreite individueller ODPs ist es fast unmöglich, einen Schwellenwert zu definieren, der „normale“ von unphysiologischen oder gar „pathophysiologisch“ niedrigen ODPs unterscheidet. Die Spender-Unterschiede sind ein häufiges Problem bei der osteogenen Differenzierung von MSCs und wurden von anderen Gruppen beispielsweise für BMSC [72] aber auch für humane ASC-Kulturen [90] beschrieben. Was kann die Ursache von so starken interindividuellen Unterschieden sein?

Es hat sich gezeigt, dass Fettleibigkeit einen großen Einfluss auf die osteogene Fähigkeit von ASCs hat. Zellen adipöser Spender akkumulierten kaum Calcium, welches durch Alizarin-Rot-Färbung gezeigt wurde und exprimierten auch weniger osteogene Proteine wie RUNX2, ALP und Osteocalcin im Vergleich zur schlanken Kontrollgruppe [90] [23]. Aufgrund der weitgehend anonymisierten Übermittlung des Probe-Materials lagen hier leider nur wenige Informationen zum Body-Mass-Index (BMI) unserer Spender vor. Etwa 30 % des von uns verwendeten Gewebematerials stammt ausschließlich aus ästhetisch motivierten Fettabsaugungen. Hier kann mit ziemlicher Sicherheit davon ausgegangen werden, dass Adipositas-Patienten nicht erfasst wurden. Allerdings stammten 70 % der Fettgewebeproben aus Bauchdeckenstraffungen, die durch chirurgische Maßnahmen zur Bekämpfung von bestehendem Übergewicht gewonnen wurden. Es konnte objektiv keine Beteiligung Adipositas-relevanter Faktoren beobachtet werden, die eine Erklärung für die große Schwankungsbreite der ODPs wäre.

Außerdem gab es kein offensichtliches Muster zwischen dem Alter der Spender und der großen Streuung der ODP-Werte. In der Vergangenheit haben einige Autoren eine klare Korrelation zwischen zunehmendem Alter der Spender und einer Abnahme der ODPs von MSC gefunden [53, 122]. Andere Autoren konnten aber keine altersbedingten Unterschiede im ODP feststellen, sahen aber eine Tendenz zu einer höheren zwischenindividuellen Variation des ODP mit zunehmendem Alter [101]. Dass die Alterung einen negativen Einfluss auf die Knochenbildung hat, erscheint allgemein akzeptiert. Die Gründe dafür sind jedoch vielschichtig und unter anderem spielt dabei oxidative Stress eine wichtige Rolle.

Oxidativer Stress durch H_2O_2 verringert Osteogenese

Es ist allgemein akzeptiert, dass Alterungsprozesse und Seneszenz mit einem Anstieg des zellulären oxidativen Stresses korrelieren [23, 58]. Dieser oxidative Stress ist auch mit der Entstehung verschiedener degenerativer und metabolischer Erkrankungen [63, 103]. Oxidativer Stress wird auch als pathogener Faktor im Zusammenhang mit Osteoporose angesehen [36, 44]und kann sowohl in vitro als auch in vivo die Stammzell-Osteogenese signifikant hemmen [11, 43].

Daher wurde analog zum Vergleich des ODPs von ASCs und DFATs auch der Einfluss von oxidativem Stress auf das osteogene Potential verglichen. In den Versuchen wurde oxidativer Stress simuliert. Dazu wurde H_2O_2 verwendet, eine physiologisch relevante reaktive Sauerstoffspezies (ROS) [83], die häufig als Prooxidans verwendet wird. Die Ergebnisse zeigten deutlich, dass DFATs widerstandsfähiger als ASCs gegenüber oxidativem Stress waren. Bei einer Konzentration von 100 µM H_2O_2, die für die Zellen nicht toxisch war, führte der oxidative Stimulus zu einer signifikanten Abnahme der ODPs beider Zelltypen. Allerdings war die Abnahme bei DFATs geringer als bei ASC. Dieser Fund deutet darauf hin, dass die DFATs möglicherweise eine höhere antioxidative Kapazität haben. Eine stärkere Expression von Katalase und MnSOD konnte aber nicht gezeigt werden.

Antioxidative Katalase verstärkt Osteogenese

Basierend auf der Annahme, dass ein sehr niedriges ODP auf eine stärkere intrazelluläre ROS-Exposition zurückzuführen sein könnte, sollte eine antioxidative Intervention durch Katalase-Zusatz zu höheren ODP-Werten führen (Abb. 19). In Zellkulturen mit hohen ODPs sollte der Einfluss von Katalase entsprechend geringer sein. Diese Erwartung traf jedoch nur teilweise zu. In Kulturen beider Zelltypen, die aufgrund der sehr geringen ODP-Werte als osteogene „Low-Responder"-Kulturen bezeichnet werden (Abb.21A), führte exogen zugesetzte Katalase zu einer signifikanten Erhöhung der ODPs um ca. 250%.

Die Katalase-induzierte Steigerung der Osteogenese war jedoch in allen Kulturen annähernd gleich, unabhängig vom individuellen ODP ohne Katalase-Zusatz. Das bedeutet, dass die ODPs von Low-Respondern sowie die ODPs von stark differenzierenden Spenderzellen („High-Responder", Abb. 22) durch die Zugabe von Katalase um den gleichen Faktor (250%) erhöht wurden.

Wo wirkt die Katalase?

Funktionelle Katalase kommt in der Zelle hauptsächlich in den Peroxisomen vor. In den Versuchen wurde Katalase ins Zellmedium gegeben. Damit ist sie extrazellulär lokalisiert bzw. interzellulär.

Katalase wurde schon in extrazellulären Vesikeln (EV) oder bei Tumorzellen über Lokalisation auf der Zellmembran im interzellulären Raum (IR) nachgewiesen. Sie schützte dort (an einem eher untypischen Ort) vor oxidativem Stress [13, 38].

Da H_2O_2 als Second Messenger in diesem IR vorhanden ist, führt die Katalase mit ihrer extrem hohen Enzymaktivität dort zu dessen rapiden Verschwinden.

Es wirft sich somit die Frage auf, ob das Verschwinden des H_2O_2 im IR nicht vielleicht das Signal ist, welches die Osteogenese so stark erhöht.

Ein Effekt lässt sich hier beobachten, der eng mit dem Verlust von H_2O_2 im IR zusammenzuhängen scheint: Die erhöhte Expression vom MnSOD.

Die mitochondriale SOD wird signifikant verstärkt exprimiert, wenn die ASCs mit Katalase behandelt wurden. Dies könnte der Grund dafür sein:

Das „verlorene“ H_2O_2 im IR soll ersetzt werden: Das O2- ein Nebenprodukt der mitochondrialen Atmungskette wird durch MnSOD in der Mitochondrienmatrix zu H_2O_2 dismutiert. Außerdem gelangt O2- auch in den mitochondrialen Intermembranraum und wird dort durch Ferricytochrom c und/oder Cu/Zn-SOD zu H_2O_2 umgewandelt. Dieses H_2O_2 kann ungehindert in das Zytoplasma diffundieren. Mitochondrien sind (je nach Zelltyp) mit 40-96% [14] Hauptproduzenten von intrazellulärem H_2O_2. Das H_2O_2 aus MnSOD-Produktion kann allerdings nur aktiv über das Prx-Trx-System gegen einen Gradienten (Mitochondrium 5:1 Cytosol) [25] ausgeschleust werden. Es muss also extrem viel H_2O_2 durch MnSOD produziert werden, damit dieses im Cytosol ankommt. Dann kann H_2O_2 über Zellmembran-ständige Aquaporine aus der Zelle sezerniert werden.

Der Zusatz von Katalase führt auch zu einer Erhöhung der Zellvitalität (ermittelt durch Celltiter Blue) ohne einem Anstieg der Zellzahl (ermittelt durch Hoechst-Färbung). Der Umsatz des blauen Resazurin zum pink fluoreszierenden Resorufin erfolgt durch Reduktion des Farbstoffs durch NADH, NADPH, FADH, FMNH oder Cytochrome mittels mitochondrialer Reduktasen (wie Komplex I, II und III der Atmunggskette), Diaphorasen und einiger anderer Enzyme.

Die erhöhten CTB Werte könnten durch einen verstärkten Zellstoffwechsel verursacht werden.

Damit überhaupt genug Superoxid als Substrat der MnSOD zur Verfügung gestellt wird, müsste sich dazu die mitochondriale Atmung erhöhen: Tatsächlich zeigen die Ergebnisse aber das genaue Gegenteil. Die maximale Atmung (Maximal Respiration) sowie die zusätzliche Atemkapazität (Spare Respiratory Capacity) sinkt. Es entsteht somit wahrscheinlich sogar weniger Superoxid, welches durch MnSOD zu H_2O_2 dismutiert werden kann.

Zusätzlich ist auch die Expression von Cytochrom c in Vergleich zur Kontrolle verringert. Ein weiteres Indiz dafür ,dass die mitochondriale Atmung runter reguliert wird.

Lactat als Induktor der beigen Adipogenese und dessen Rolle bei der mitochondrialen Polarisation und Atmung

Aus der Vermutung heraus, dass die mitochondriale Atmung eine Rolle bei der Osteogenese der ASCs (und DFATs) spielt, wurden die Zellen während der osteogenen Differenzierung mit 30mM L-Lactat versetzt. Diese Konzentration wurde nach den Experimenten von Carrière gewählt, die mit dieser die besten Effekte erzielte [18]. In gesundem Gewebe sind Konzentrationen von 0,5-20 mM zu finden [16]. Lactat wird über den Monocarboxylat Transporter MCT1 in oder auch aus ASCs bzw. Adipozyten transportiert. Hohe Lactat-Konzentration führen dort zu einem rapiden Anstieg des NADH: NAD^+ -Verhältnis in der Zelle sowie zu höheren Pyruvat-Konzentrationen. Das Gleichgewicht von NAD^+ und Lactat zu NADH und Pyruvat wird durch das Enzym Lactatdehydrogenase (LDH) aufrechterhalten. Eine Zugabe von einer hohen Konzentration Lactat führt dementsprechend zu einem starken Umsatz zu Pyruvat und der Reduktion von viel NAD^+ zu NADH.

$$\boldsymbol{Lactat} + \boldsymbol{NAD^+} \underset{LDH}{\Longleftrightarrow} Pyruvat + NADH$$

LDH favorisiert grundsätzlich die Reaktion zu Lactat. In ruhenden Muskeln ist das Verhältnis von 10-13:1 auf Seite des Lactats. Nach anstrengender sportlicher Betätigung steigt die Lactat-Konzentration an und es wurden Werte von bis zu 500:1 nachgewiesen [16].

Die erhöhten Lactat-Konzentrationen (*auch zu beobachten beim Zusatz von β-Hydroxybuturat, einem anderen Monocarboxylat*) führen in Adipozyten und ihren Vorläufern zu der Hochregulierung der Expression von *Uncoupling Protein* (UCP1) sowie des MCT1 [59].

Zugesetztes Pyruvat (oder Acetoacetat) senkte hingegen das NADH: NAD^+ -Verhältnis und die UCP1-Expression [18]. Es wird vermutet das UCP1 als Uncoupler der Atmungskette auch den Redox-Stress, durch die Lactat induzierte NADH-Akkumulation, verringert [105]. Lactat induziert die Entstehung von ROS jedoch nicht nur in der Atmungskette. In einer Studie an

Ratten-Leber Mitochondrien wurde festgestellt, dass eine Flavin-abhängige L-Lactat-Oxidase im IMR Lactat oxidiert und dabei H_2O_2 entstehen kann [6]. Ob dies auf ASCs zu übertragen ist, bleibt offen.

Es ist bekannt, dass das *Uncoupling* von UCP1 durch ROS (wie H_2O_2) in braunen Adipozyten aktiviert wird. ROS können dabei das redox-sensitive UCP1 Cystein253 oxidieren und so das Protein aktivieren. Der Protonen-Import durch UCP1 fördert wiederum die Entstehung von ROS in der Mitochondrienmatrix durch die Atmungskette [22].

Lactat dient somit als Signalgeber für die UCP1-Expression und reguliert so den Redox-Status der Adipozyten und auch der ASCs [4].

Lactat verstärkt also die UCP1 Expression und H_2O_2 aktiviert das *Uncoupling* von UCP1. **Es ist also möglich, dass H_2O_2 in den Versuchen deswegen die Osteogenese hemmt, weil *Uncoupling* durch UCP1 stattfindet.**

UCP1 spielt auch in Osteoblasten eine ähnliche Rolle bei der mitochondrialen Atmung [74]. Jedoch wird daran bis jetzt kaum geforscht, da UCP1 hauptsächlich in der Mitochondrien- und Diabetes-Forschung von Interesse ist.

Um also das *Uncoupling* auf die Spitze zu treiben, wurde Lactat genutzt.

(Leider verabschiede ich mich hier ganz von den weiteren Tests mit H_2O_2, da einige verwendete Methoden durch dieses verfälscht werden, was im Nachhinein ärgerlich und vielleicht anders lösbar gewesen wäre).

Die Zugabe von Lactat während der Osteogenese von ASCs konnte deren Osteogenese drastisch hemmen. Hierbei konnte auch der positive Effekt von Katalase vollständig ausgehebelt werden. Betrachtet man die Ergebnisse der JC1-Färbung, so wird deutlich, dass die Mitochondrien der Kontrolle und Katalase stark depolarisiert sind (grün). Die Zugabe von Lactat führt hingegen zu einem deutlichen Shift in Richtung polarisierte Mitochondrien (leider noch nicht signifikant, da zu geringe n-Zahl). **Dies bedeutet, dass durch Lactat die Polarisation der Mitochondrien verstärkt wird, welches sich möglicherweise negativ auf die Osteogenese auswirkt.**

Die Polarisation der Mitochondrien wird unteranderem durch die Aufrechterhaltung eines Protonen-Gradienten, durch die Atmungskette, ATPase und UCP1, bestimmt.

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Aufnahmen zeigen genau wie die Western Blots eine verringerte Expression von UCP1 in den Mitochondrien, wenn Katalase während der osteogenen Induktion zugeführt wurde. Die zusätzliche Gabe von Lactat kann diesen Effekt umkehren und führt zu einer ähnlichen Expression, wie die Kontrolle.

Zudem ist auch die Expression von Cytochrom c (Cyt c) durch Katalase-Zusatz tendenziell verringert. Dies wird auch bei der Immunfluoreszenz-Färbung deutlich. Cyt c dient als Elektronencarrier zwischen Komplex III und IV der Atmungskette. Eine verringerte Menge von Cyt c unterbricht oder verringert somit den Elektronenfluss der Atmungskette zum Komplex IV. Dies führt zu einem stärkeren e- Leak an Komplex III und darauf zu einem Anstieg von Superoxid, welches zu je 50% in den Intermembranraum und Matrix abgegeben wird [75]. Diesem Anstieg von Superoxid begegnen die ASCs mit einem Anstieg der MnSOD Expression (siehe Western Blots). Das MnSOD wiederum nutzt das Superoxid als Substrat, um das (durch die Katalase ausgemerzte) H_2O_2 in den Mitochondrien zu ersetzen.

Verringerte Mengen an Cyt c bedeuten auch einen verringerten e- Transport zum Komplex IV (oder auch Cytochrom-c-Oxidase), dem finalen e^- - Akzeptor der Atmungskette. Dieses Enzym verbraucht ein Molekül Sauerstoff, um 4 Moleküle Cyt c zu oxidieren. Tatsächlich zeigen die Ergebnisse, dass der Sauerstoff-Verbrauch von Zellen durch zugesetzte Katalase sinkt. Die maximale Atmung und die zusätzliche Atemkapazität sind signifikant verringert. Bei der Reaktion werden zudem Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum (IMR) gepumpt. Die Protonen, die sich durch Komplex I, III und IV im IMR befinden, werden von der ATPase in die Matrix gepumpt, wobei ATP gebildet wird. Hier lässt sich kein Unterschied in der ATP-Menge feststellen. Die Vermutung liegt jedoch nahe, dass die Protonen-Menge im IMR verringert ist. So ist dementsprechend der Protonen-Gradient geringer und das mitochondriale Membranpotential demnach auch. Es findet kein oder weniger *Uncoupling* durch das geringer exprimierte (da unnötige) UCP1 statt. Durch das geringere Membranpotential zeigt die JC-1-Färbung dass die Mitochondrien der ASCs mit Katalase-Zusatz eher depolarisiert sind.

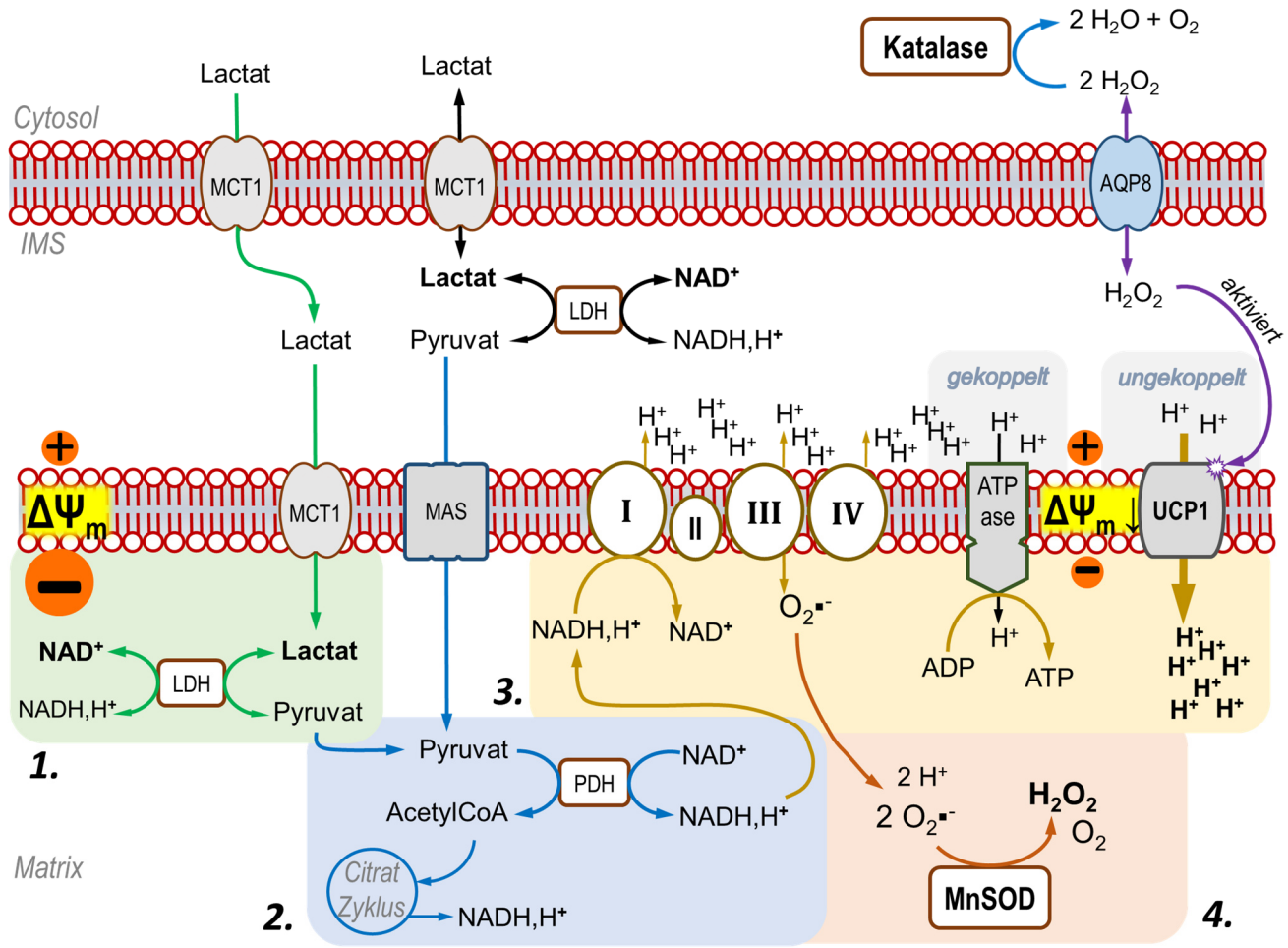


Abbildung 46 Vermutete Prozesse auf Mitochondrien-Ebene

In Abb.46 sind die vermuteten Prozesse auf Mitochondrien-Ebene dargestellt. Lactat kann über MCT1 die Mitochondrienmembranen passieren. Es wird dort durch LDH zu Pyruvat umgewandelt (1.), wobei auch NADH H^+ entsteht. Das Pyruvat wird durch Pyruvatdehydrogenase (PDH) in Acetyl CoA umgewandelt und dem Citrat-Zyklus zugeführt (2.). Weiteres entstehendes NADH H^+ wird der Atmungskette zugeführt. Diese pumpt Protonen in den Intermembranraum (IMS). Der gekoppelte Protonen-Transfer in die Mitochondrienmatrix findet durch ATP-Synthase statt. Dabei entsteht ATP. Es bildet sich ein Membranpotential welches für eine Polarisierung des Mitochondriums sorgt. Kommt es zu einer starken Änderung des Membranpotentials, weil z.B. zu viele Protonen ins IMS gepumpt werden, kann UCP1 den Protonen-Transfer entkoppeln, welches das Mitochondrium depolarisiert und Protonen einströmen lässt. UCP1 kann unter anderem durch H_2O_2 aktiviert werden. Dies ist jedoch nicht möglich, wenn kein H_2O_2 im IMS vorhanden ist, was passieren könnte, wenn Katalase dieses extrazellulär verbraucht. Die Atmungskette produziert außerdem

Superoxid (4.), welches von MnSOD zur Produktion von H_2O_2 genutzt wird. Das H_2O_2 kann über Aquaporine ausgeschleust werden und so bis in den interzellulären Raum gelangen.

Die vermuteten Einflüsse die Lactat und Katalase Zusätze auf diese Prozesse in ASCs haben, sind folgend dargestellt:

Lactat:

- Verstärkung der Atmungskette und mehr O_2-Verbrauch (siehe Abb. 39D)
- Stärkere Kopplung mit ATP-Synthase
- Erhöhte ATP Synthese

Katalase:

- Depletion von H_2O_2 im interzellulären Raum und Zytoplasma
- Verringerte Atmungskette und weniger O_2-Verbrauch
- Reduzierte Mengen an Cytochom c, dadurch mehr e^--Leak
- Anstieg der Superoxid-Konzentration
- Hohe Expression von MnSOD um Superoxid zu H_2O_2 umzuwandeln
- H_2O_2 welches Mitochondrien und Zelle verlässt wird durch extrazelluläre Katalase abgebaut

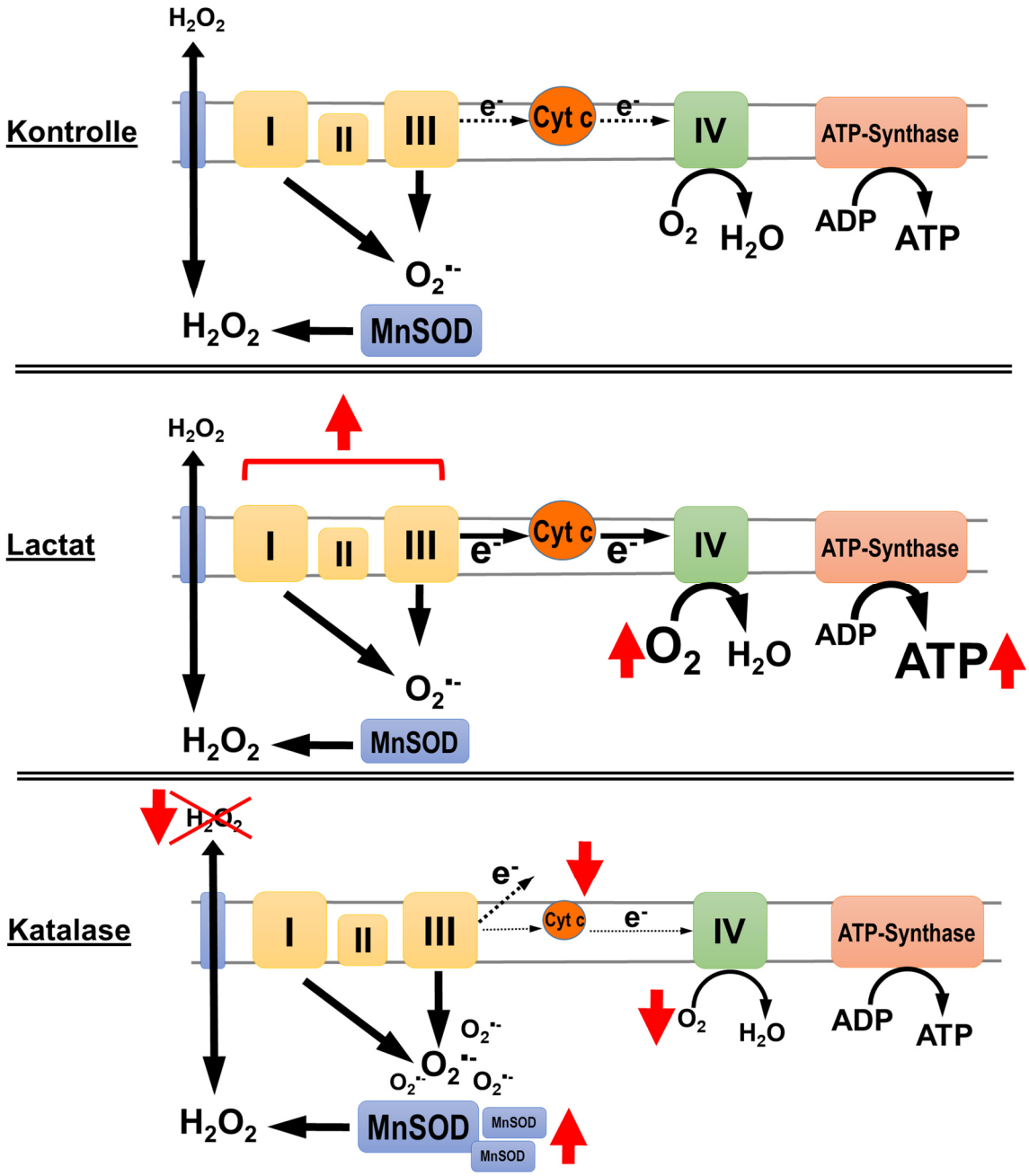


Abbildung 47 Abschluss-Grafik. Rote Pfeil nach oben: verstärkter Prozess. Roter Pfeil nach unten: verringerter Prozess.

Katalase als Induktor der Chondrogenese

Auch die Chondrogenese von ASCs wird durch den Zusatz von Katalase stark induziert. Es kommt schon deutlich früher als mit herkömmlicher Zellkultur (Kontrolle) zum Erscheinen von Knorpel-typischen hypertrophen Zellclustern und Lakunenbildung. Knorpelmatrix typische Proteine wie Collagen II und Aggrecan sind verstärkt zu sehen. Besonders interessant ist zudem auch der Haupt-Transkriptionsfaktor der Chondrogenese, SOX9, welcher deutlich verstärkt exprimiert ist und im Zellkern lokalisiert zu sehen ist.

SOX9 induziert unter anderem die direkte Expression von Knorpel-spezifischen EZM Genen wie Collagen II oder Aggrecan [61]. Diese Proteine ließen sich auch Fluoreszenz-mikroskopisch nachweisen. Gleichzeitig ließ sich keine Fehldifferenzierung in die osteogene Linie feststellen. Diese Möglichkeit hätte bestehen können, wenn man die vorherigen osteogenen Experimente betrachtet. SOX9 inhibiert nachweislich die osteoinduktive Funktion von RUNX2 [126]. Es wäre aber durchaus möglich, dass im späteren Verlauf der Chondrogenese eine Ossifikation stattfindet. Hierfür müssten weitere Versuche durchgeführt werden.

Gedanken zum therapeutischen Einsatz

Große Unterschiede im Differenzierungspotential der ASCs stellen Stammzell-Therapien vor Probleme. Werden z.B. *in vitro* vermehrte ASCs einem Patienten lokal an einen Knochendefekt gespritzt, so geht ein Großteil dieser Zellen zugrunde oder wandert ab. In vielen Studien sind somit später weniger als 1% der ursprünglichen Zellen nachweisbar [87]. Wenn nun ASCs mit schlechtem Differenzierungspotential genutzt wurden, so ist die Chance auf einen Therapie-Erfolg verschwindend gering. Eine Vorbehandlung der ASCs mit Katalase könnte hier Abhilfe verschaffen. Gut denkbar wäre eine 3D-Kollagenmatrix, die mit ASCs (oder auch DFATs) besetzt und mit Katalase vorbehandelt wird.

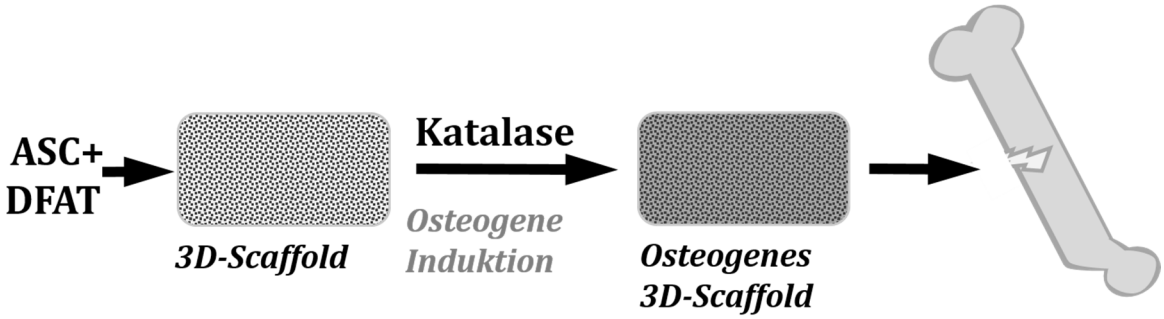


Abbildung 48 mögliche Anwendung von ASCs und DFATs in Kombination mit Katalase im Tissue Engineering

Literatur

1. Almeida M, Laurent MR, Dubois V, Claessens F, O'Brien CA, Bouillon R, Vanderschueren D, Manolagas SC (2017) Estrogens and Androgens in Skeletal Physiology and Pathophysiology. Physiol Rev 97(1):135–187. doi:10.1152/physrev.00033.2015

2. Amer MG, Embaby AS, Karam RA, Amer MG (2018) Role of adipose tissue derived stem cells differentiated into insulin producing cells in the treatment of type I diabetes mellitus. Gene 654:87–94. doi:10.1016/j.gene.2018.02.008

3. Aurich H, Sgodda M, Kaltwasser P, Vetter M, Weise A, Liehr T, Brulport M, Hengstler JG, Dollinger MM, Fleig WE, Christ B (2009) Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from human adipose tissue in vitro promotes hepatic integration in vivo. Gut 58(4):570–581. doi:10.1136/gut.2008.154880

4. Bai Y, Shang Q, Zhao H, Pan Z, Guo C, Zhang L, Wang Q (2016) Pdcd4 restrains the self-renewal and white-to-beige transdifferentiation of adipose-derived stem cells. Cell Death Dis 7(3):e2169. doi:10.1038/cddis.2016.75

5. Barba M, Cicione C, Bernardini C, Michetti F, Lattanzi W (2013) Adipose-derived mesenchymal cells for bone regereneration: state of the art. Biomed Res Int 2013:416391. doi:10.1155/2013/416391

6. Bari L de, Valenti D, Atlante A, Passarella S (2010) L-lactate generates hydrogen peroxide in purified rat liver mitochondria due to the putative L-lactate oxidase localized in the intermembrane space. FEBS Lett 584(11):2285–2290. doi:10.1016/j.febslet.2010.03.038

7. Bartell SM, Kim H-N, Ambrogini E, Han L, Iyer S, Serra Ucer S, Rabinovitch P, Jilka RL, Weinstein RS, Zhao H, O'Brien CA, Manolagas SC, Almeida M (2014) FoxO proteins restrain osteoclastogenesis and bone resorption by attenuating H2O2 accumulation. Nat Commun 5:3773. doi:10.1038/ncomms4773

8. Bedard K, Krause K-H (2007) The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. Physiol Rev 87(1):245–313. doi:10.1152/physrev.00044.2005

9. Bhattarai HK, Shrestha S, Rokka K, Shakya R (2020) Vitamin D, Calcium, Parathyroid Hormone, and Sex Steroids in Bone Health and Effects of Aging. J Osteoporos 2020:9324505. doi:10.1155/2020/9324505

10. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O (2012) Oxidative Stress and Antioxidant Defense. World Allergy Organ J 5(1):9–19. doi:10.1097/WOX.0b013e3182439613

11. Blair HC, Larrouture QC, Li Y, Lin H, Beer-Stoltz D, Liu L, Tuan RS, Robinson LJ, Schlesinger PH, Nelson DJ (2017) Osteoblast Differentiation and Bone Matrix Formation In Vivo and In Vitro. Tissue Eng Part B Rev 23(3):268–280. doi:10.1089/ten.TEB.2016.0454

12. Blair HC, Larrouture QC, Li Y, Lin H, Beer-Stoltz D, Liu L, Tuan RS, Robinson LJ, Schlesinger PH, Nelson DJ (2017) Osteoblast Differentiation and Bone Matrix Formation In Vivo and In Vitro. Tissue Eng Part B Rev 23(3):268–280. doi:10.1089/ten.teb.2016.0454

13. Böhm B, Heinzelmann S, Motz M, Bauer G (2015) Extracellular localization of catalase is associated with the transformed state of malignant cells. Biol Chem 396(12):1339–1356. doi:10.1515/hsz-2014-0234

14. Boveris A, Cadenas E (2000) Mitochondrial production of hydrogen peroxide regulation by nitric oxide and the role of ubisemiquinone. IUBMB Life 50(4-5):245–250. doi:10.1080/713803732

15. Boyce BF, Yao Z, Xing L (2010) Functions of nuclear factor kappaB in bone. Ann N Y Acad Sci 1192:367–375. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.05315.x

16. Brooks GA (2020) Lactate as a fulcrum of metabolism. Redox Biology 35:101454. doi:10.1016/j.redox.2020.101454

17. Cao Y, Sun Z, Liao L, Meng Y, Han Q, Zhao RC (2005) Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo. Biochem Biophys Res Commun 332(2):370–379. doi:10.1016/j.bbrc.2005.04.135

18. Carrière A, Jeanson Y, Berger-Müller S, André M, Chenouard V, Arnaud E, Barreau C, Walther R, Galinier A, Wdziekonski B, Villageois P, Louche K, Collas P, Moro C, Dani C, Villarroya F, Casteilla L (2014) Browning of white adipose cells by intermediate metabolites: an adaptive mechanism to alleviate redox pressure. Diabetes 63(10):3253–3265. doi:10.2337/db13-1885

19. Chan WCW, Tan Z, To MKT, Chan D (2021) Regulation and Role of Transcription Factors in Osteogenesis. International Journal of Molecular Sciences 22(11). doi:10.3390/ijms22115445

20. Chen G, Deng C, Li Y-P (2012) TGF-β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. Int J Biol Sci 8(2):272–288. doi:10.7150/ijbs.2929

21. Chen Y, Liu K, Shi Y, Shao C (2018) The tango of ROS and p53 in tissue stem cells. Cell Death & Differentiation 25(4):639–641. doi:10.1038/s41418-018-0062-2

22. Chouchani ET, Kazak L, Jedrychowski MP, Lu GZ, Erickson BK, Szpyt J, Pierce KA, Laznik-Bogoslavski D, Vetrivelan R, Clish CB, Robinson AJ, Gygi SP, Spiegelman BM (2016) Mitochondrial ROS regulate thermogenic energy expenditure and sulfenylation of UCP1. Nature 532(7597). doi:10.1038/nature17399

23. Choudhery MS, Badowski M, Muise A, Pierce J, Harris DT (2014) Donor age negatively impacts adipose tissue-derived mesenchymal stem cell expansion and differentiation. J Transl Med 12:8. doi:10.1186/1479-5876-12-8

24. Corvera S (2021) Cellular Heterogeneity in Adipose Tissues. Annu Rev Physiol 83:257–278. doi:10.1146/annurev-physiol-031620-095446

25. Cubas L de, Pak VV, Belousov VV, Ayté J, Hidalgo E (2021) The Mitochondria-to-Cytosol H2O2 Gradient Is Caused by Peroxiredoxin-Dependent Cytosolic Scavenging. Antioxidants (Basel) 10(5). doi:10.3390/antiox10050731

26. Dai DF, Chiao YA, Martin GM, Marcinek DJ, Basisty N, Quarles EK, Rabinovitch PS (2017) Mitochondrial-Targeted Catalase: Extended Longevity and the Roles in Various Disease Models. Progress in molecular biology and translational science 146. doi:10.1016/bs.pmbts.2016.12.015

27. Dallas SL, Prideaux M, Bonewald LF (2013) The osteocyte: an endocrine cell … and more. Endocr Rev 34(5):658–690. doi:10.1210/er.2012-1026

28. DeLise AM, Fischer L, Tuan RS (2000) Cellular interactions and signaling in cartilage development. Osteoarthritis Cartilage 8(5):309–334. doi:10.1053/joca.1999.0306

29. Ding A, Bian Y-Y, Zhang Z-H (2020) SP1/TGF-β1/SMAD2 pathway is involved in angiogenesis during osteogenesis. Mol Med Rep 21(3):1581–1589. doi:10.3892/mmr.2020.10965

30. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy 8(4):315–317. doi:10.1080/14653240600855905

31. Dragoo JL, Carlson G, McCormick F, Khan-Farooqi H, Zhu M, Zuk PA, Benhaim P (2007) Healing full-thickness cartilage defects using adipose-derived stem cells. Tissue Eng 13(7):1615–1621. doi:10.1089/ten.2006.0249

32. Eto H, Suga H, Matsumoto D, Inoue K, Aoi N, Kato H, Araki J, Yoshimura K (2009) Characterization of structure and cellular components of aspirated and excised adipose tissue. Plast Reconstr Surg 124(4):1087–1097. doi:10.1097/PRS.0b013e3181b5a3f1

33. Fantner GE, Hassenkam T, Kindt JH, Weaver JC, Birkedal H, Pechenik L, Cutroni JA, Cidade GAG, Stucky GD, Morse DE, Hansma PK (2005) Sacrificial bonds and hidden length dissipate energy as mineralized fibrils separate during bone fracture. Nat Mater 4(8):612–616. doi:10.1038/nmat1428

34. Feng X, McDonald JM (2011) Disorders of bone remodeling. Annu Rev Pathol 6:121–145. doi:10.1146/annurev-pathol-011110-130203

35. Florencio-Silva R, Sasso GRdS, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS (2015) Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. Biomed Res Int 2015:421746. doi:10.1155/2015/421746

36. Garnero P, Sornay-Rendu E, Chapuy MC, Delmas PD (1996) Increased bone turnover in late postmenopausal women is a major determinant of osteoporosis. J Bone Miner Res 11(3):337–349. doi:10.1002/jbmr.5650110307

37. Gilbert SF (Hrsg) (2000) Developmental Biology. 6th edition. Sinauer Associates

38. Godoy MA de, Saraiva LM, Carvalho LRP de, Vasconcelos-dos-Santos A, Beiral HJV, Ramos AB, Silva LRdP, Leal RB, Monteiro VHS, Braga CV, Araujo-Silva CA de, Sinis LC, Bodart-Santos V, Kasai-Brunswick TH, Alcantara CdL, Lima APCA, da Cunha-e Silva NL, Galina A, Vieyra A, Felice FG de, Mendez-Otero R, Ferreira ST (2017) Mesenchymal stem cells and cell-derived extracellular vesicles protect hippocampal neurons from oxidative stress and synapse damage induced by amyloid-β oligomers. J Biol Chem 293(6):1957–1975. doi:10.1074/jbc.M117.807180

39. Gómez-Barrena E, Rosset P, Müller I, Giordano R, Bunu C, Layrolle P, Konttinen YT, Luyten FP (2011) Bone regeneration: stem cell therapies and clinical studies in orthopaedics and traumatology. J Cell Mol Med 15(6):1266–1286. doi:10.1111/j.1582-4934.2011.01265.x

40. Graziano ACE, Avola R, Perciavalle V, Nicoletti F, Cicala G, Coco M, Cardile V (2018) Physiologically based microenvironment for in vitro neural differentiation of adipose-derived stem cells. World J Stem Cells 10(3):23–33. doi:10.4252/wjsc.v10.i3.23

41. Hall BK, Miyake T (2000) All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development. Bioessays 22(2):138–147. doi:10.1002/(SICI)1521-1878(200002)22:2<138::AID-BIES5>3.0.CO;2-4

42. Han D, Williams E, Cadenas E (2001) Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. Biochem J 353(Pt 2):411–416

43. Hao W, Jiang C, Jiang M, Wang T, Wang X (2017) Osteogenic potency of dedifferentiated fat cells isolated from elderly people with osteoporosis. Exp Ther Med 14(1):43–50. doi:10.3892/etm.2017.4465

44. Hernlund E, Svedbom A, Ivergård M, Compston J, Cooper C, Stenmark J, McCloskey EV, Jönsson B, Kanis JA (2013) Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden. A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA). Arch Osteoporos 8(1):136. doi:10.1007/s11657-013-0136-1

45. Hernlund E, Svedbom A, Ivergård M, Compston J, Cooper C, Stenmark J, McCloskey EV, Jönsson B, Kanis JA (2013) Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden. A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA). Arch Osteoporos 8:136. doi:10.1007/s11657-013-0136-1

46. Huang M-F, Lin W-L, Ma Y-C (2005) A study of reactive oxygen species in mainstream of cigarette. Indoor Air 15(2):135–140. doi:10.1111/j.1600-0668.2005.00330.x

47. Huber M, Trattnig S, Lintner F (2000) Anatomy, biochemistry, and physiology of articular cartilage. Invest Radiol 35(10):573–580. doi:10.1097/00004424-200010000-00003

48. Jurgens WJFM, Oedayrajsingh-Varma MJ, Helder MN, Zandiehdoulabi B, Schouten TE, Kuik DJ, Ritt MJPF, van Milligen FJ (2008) Effect of tissue-harvesting site on yield of stem cells derived from adipose tissue: implications for cell-based therapies. Cell Tissue Res 332(3):415–426. doi:10.1007/s00441-007-0555-7

49. Kanis JA, Melton LJ, Christiansen C, Johnston CC, Khaltaev N (1994) The diagnosis of osteoporosis. J Bone Miner Res 9(8):1137–1141. doi:10.1002/jbmr.5650090802

50. Karsenty G, Wagner EF (2002) Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. Dev Cell 2(4):389–406. doi:10.1016/s1534-5807(02)00157-0

51. Kasper G, Mao L, Geissler S, Draycheva A, Trippens J, Kühnisch J, Tschirschmann M, Kaspar K, Perka C, Duda GN, Klose J (2009) Insights into mesenchymal stem cell aging: involvement of antioxidant defense and actin cytoskeleton. Stem Cells 27(6):1288–1297. doi:10.1002/stem.49

52. Katsimbri P (2017) The biology of normal bone remodelling. Eur J Cancer Care (Engl) 26(6). doi:10.1111/ecc.12740

53. Kawagishi-Hotta M, Hasegawa S, Igarashi T, Yamada T, Takahashi M, Numata S, Kobayashi T, Iwata Y, Arima M, Yamamoto N, Yagami A, Nakata S, Uzawa T, Matsunaga K, Sugiura K, Akamatsu H (2017) Enhancement of individual differences in proliferation and differentiation potentials of aged human adipose-derived stem cells. Regen Ther 6:29–40. doi:10.1016/j.reth.2016.12.004

54. Keating JF, Simpson AHRW, Robinson CM (2005) The management of fractures with bone loss. The Journal of Bone and Joint Surgery. British volume 87-B(2):142–150. doi:10.1302/0301-620X.87B2.15874

55. Kishimoto N, Momota Y, Hashimoto Y, Tatsumi S, Ando K, Omasa T, Kotani J (2014) The osteoblastic differentiation ability of human dedifferentiated fat cells is higher than that of adipose stem cells from the buccal fat pad. Clin Oral Investig 18(8):1893–1901. doi:10.1007/s00784-013-1166-1

56. Koepke JI, Nakrieko K-A, Wood CS, Boucher KK, Terlecky LJ, Walton PA, Terlecky SR (2007) Restoration of peroxisomal catalase import in a model of human cellular aging. Traffic 8(11):1590–1600. doi:10.1111/j.1600-0854.2007.00633.x

57. Kollet O, Dar A, Shivtiel S, Kalinkovich A, Lapid K, Sztainberg Y, Tesio M, Samstein RM, Goichberg P, Spiegel A, Elson A, Lapidot T (2006) Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells. Nat Med 12(6):657–664. doi:10.1038/nm1417

58. Kretlow JD, Jin Y-Q, Liu W, Zhang WJ, Hong T-H, Zhou G, Baggett LS, Mikos AG, Cao Y (2008) Donor age and cell passage affects differentiation potential of murine bone marrow-derived stem cells. BMC Cell Biol 9:60. doi:10.1186/1471-2121-9-60

59. Lagarde D, Jeanson Y, Portais J-C, Galinier A, Ader I, Casteilla L, Carrière A (2021) Lactate Fluxes and Plasticity of Adipose Tissues: A Redox Perspective. Front Physiol 12:689747. doi:10.3389/fphys.2021.689747

60. Lee D, Kook S-H, Ji H, Lee S-A, Choi K-C, Lee K-Y, Lee J-C (2015) N-acetyl cysteine inhibits H2O2-mediated reduction in the mineralization of MC3T3-E1 cells by down-regulating Nrf2/HO-1 pathway. BMB Rep 48(11):636–641. doi:10.5483/bmbrep.2015.48.11.112

61. Lefebvre V, Dvir-Ginzberg M (2016) SOX9 and the many facets of its regulation in the chondrocyte lineage. Connect Tissue Res 58(1):2–14. doi:10.1080/03008207.2016.1183667

62. Legakis JE, Koepke JI, Jedeszko C, Barlaskar F, Terlecky LJ, Edwards HJ, Walton PA, Terlecky SR (2002) Peroxisome senescence in human fibroblasts. Mol Biol Cell 13(12):4243–4255. doi:10.1091/mbc.e02-06-0322

63. Liu H, Xia X, Li B (2015) Mesenchymal stem cell aging: Mechanisms and influences on skeletal and non-skeletal tissues. Exp Biol Med (Maywood) 240(8):1099–1106. doi:10.1177/1535370215591828

64. Luo Z, Shang X, Zhang H, Wang G, Massey PA, Barton SR, Kevil CG, Dong Y (2019) Notch Signaling in Osteogenesis, Osteoclastogenesis, and Angiogenesis. Am J Pathol 189(8):1495–1500. doi:10.1016/j.ajpath.2019.05.005

65. Madry H, Grün UW, Knutsen G (2011) Cartilage repair and joint preservation: medical and surgical treatment options. Dtsch Arztebl Int 108(40):669–677. doi:10.3238/arztebl.2011.0669

66. Marchissio MJ, Francés DEA, Carnovale CE, Marinelli RA (2012) Mitochondrial aquaporin-8 knockdown in human hepatoma HepG2 cells causes ROS-induced mitochondrial depolarization and loss of viability. Toxicol Appl Pharmacol 264(2):246–254. doi:10.1016/j.taap.2012.08.005

67. Marinho HS, Real C, Cyrne L, Soares H, Antunes F (2014) Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors. Redox Biology 2:535–562. doi:10.1016/j.redox.2014.02.006

68. Marlatt KL, Ravussin E (2017) Brown Adipose Tissue: an Update on Recent Findings. Curr Obes Rep 6(4):389–396. doi:10.1007/s13679-017-0283-6

69. Masaki H, Atsumi T, Sakurai H (1995) Detection of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals in murine skin fibroblasts under UVB irradiation. Biochem Biophys Res Commun 206(2):474–479. doi:10.1006/bbrc.1995.1067

70. Matsumoto T, Kano K, Kondo D, Fukuda N, Iribe Y, Tanaka N, Matsubara Y, Sakuma T, Satomi A, Otaki M, Ryu J, Mugishima H (2008) Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. J Cell Physiol 215(1):210–222. doi:10.1002/jcp.21304

71. Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Floyd ZE, Kloster A, Di Halvorsen Y, Storms RW, Goh B, Kilroy G, Wu X, Gimble JM (2006) Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. Stem Cells 24(2):376–385. doi:10.1634/stemcells.2005-0234

72. Mohamed-Ahmed S, Fristad I, Lie SA, Suliman S, Mustafa K, Vindenes H, Idris SB (2018) Adipose-derived and bone marrow mesenchymal stem cells: a donor-matched comparison. Stem Cell Res Ther 9(1):168. doi:10.1186/s13287-018-0914-1

73. Molavian H, Madani Tonekaboni A, Kohandel M, Sivaloganathan S (2015) The Synergetic Coupling among the Cellular Antioxidants Glutathione Peroxidase/Peroxiredoxin and Other Antioxidants and its Effect on the Concentration of H2O2. Scientific Reports 5(1):13620. doi:10.1038/srep13620

74. Mukherjee S, Yun JW (2021) Novel regulatory roles of UCP1 in osteoblasts. Life Sci 276:119427. doi:10.1016/j.lfs.2021.119427

75. Muller FL, Liu Y, van Remmen H (2004) Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. J Biol Chem 279(47):49064–49073. doi:10.1074/jbc.M407715200

76. Murakami K, Ichinohe Y, Koike M, Sasaoka N, Iemura S-i, Natsume T, Kakizuka A (2013) VCP Is an integral component of a novel feedback mechanism that controls intracellular localization of catalase and H2O2 Levels. PLoS One 8(2):e56012. doi:10.1371/journal.pone.0056012

77. Murshed M (2018) Mechanism of Bone Mineralization. Cold Spring Harb Perspect Med 8(12). doi:10.1101/cshperspect.a031229

78. Nakamura Y, Sato T, Shiimura Y, Miura Y, Kojima M (2013) FABP3 and brown adipocyte-characteristic mitochondrial fatty acid oxidation enzymes are induced in beige cells in a different pathway from UCP1. Biochem Biophys Res Commun 441(1):42–46. doi:10.1016/j.bbrc.2013.10.014

79. Nakayama T, Church DF, Pryor WA (1989) Quantitative analysis of the hydrogen peroxide formed in aqueous cigarette tar extracts. Free Radical Biology and Medicine 7(1):9–15. doi:10.1016/0891-5849(89)90094-4

80. Nauth A, McKee MD, Einhorn TA, Watson JT, Li R, Schemitsch EH (2011) Managing bone defects. Journal of Orthopaedic Trauma 25(8):462–466. doi:10.1097/BOT.0b013e318224caf0

81. Oberlender SA, Tuan RS (1994) Expression and functional involvement of N-cadherin in embryonic limb chondrogenesis. Development 120(1):177–187. doi:10.1242/dev.120.1.177

82. Oryan A, Alidadi S, Moshiri A, Maffulli N (2014) Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. J Orthop Surg Res 9(1):18. doi:10.1186/1749-799X-9-18

83. Pak VV, Ezeriņa D, Lyublinskaya OG, Pedre B, Tyurin-Kuzmin PA, Mishina NM, Thauvin M, Young D, Wahni K, Martínez Gache SA, Demidovich AD, Ermakova YG, Maslova YD, Shokhina AG, Eroglu E, Bilan DS, Bogeski I, Michel T, Vriz S, Messens J, Belousov VV (2020) Ultrasensitive Genetically Encoded Indicator for Hydrogen Peroxide Identifies Roles for the Oxidant in Cell Migration and Mitochondrial Function. Cell Metabolism 31(3):642-653.e6. doi:10.1016/j.cmet.2020.02.003

84. Payer J, Brazdilova K, Jackuliak P (2010) Management of glucocorticoid-induced osteoporosis: prevalence, and emerging treatment options. Drug Healthc Patient Saf 2:49–59

85. Peterlik H, Roschger P, Klaushofer K, Fratzl P (2006) From brittle to ductile fracture of bone. Nat Mater 5(1):52–55. doi:10.1038/nmat1545

86. Peus D, Vasa RA, Beyerle A, Meves A, Krautmacher C, Pittelkow MR (1999) UVB activates ERK1/2 and p38 signaling pathways via reactive oxygen species in cultured keratinocytes. J Invest Dermatol 112(5):751–756. doi:10.1046/j.1523-1747.1999.00584.x

87. Pittenger MF, Discher DE, Péault BM, Phinney DG, Hare JM, Caplan AI (2019) Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. NPJ Regen Med 4:22. doi:10.1038/s41536-019-0083-6

88. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 284(5411):143–147. doi:10.1126/science.284.5411.143

89. Prins H-J, Schulten EAJM, Bruggenkate CM ten, Klein-Nulend J, Helder MN (2016) Bone Regeneration Using the Freshly Isolated Autologous Stromal Vascular Fraction of Adipose Tissue in Combination With Calcium Phosphate Ceramics. STEM CELLS Translational Medicine 5(10):1362–1374. doi:10.5966/sctm.2015-0369

90. Roldan M, Macias-Gonzalez M, Garcia R, Tinahones FJ, Martin M (2011) Obesity short-circuits stemness gene network in human adipose multipotent stem cells. FASEB J 25(12):4111–4126. doi:10.1096/fj.10-171439

91. Ryan A. Denu, Peiman Hematti (2016) Effects of Oxidative Stress on Mesenchymal Stem Cell Biology. Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2016. doi:10.1155/2016/2989076

92. Saito M (2014) Human brown adipose tissue: regulation and anti-obesity potential. Endocr J 61(5):409–416. doi:10.1507/endocrj.ej13-0527

93. Saito M, Okamatsu-Ogura Y (2023) Thermogenic Brown Fat in Humans: Implications in Energy Homeostasis, Obesity and Metabolic Disorders. World J Mens Health 41(3):489–507. doi:10.5534/wjmh.220224

94. Schünke M. (2000) Funktionelle Anatomie. Topographie und Funktion des Bewegungssystems. Thieme, Stuttgart, New York

95. Seale P, Bjork B, Yang W, Kajimura S, Kuang S, Scime A, Devarakonda S, Chin S, Conroe HM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Rudnicki MA, Beier DR, Spiegelman BM (2008) PRDM16 Controls a Brown Fat/Skeletal Muscle Switch. Nature 454(7207):961–967. doi:10.1038/nature07182

96. Selivanov VA, Votyakova TV, Pivtoraiko VN, Zeak J, Sukhomlin T, Trucco M, Roca J, Cascante M (2011) Reactive Oxygen Species Production by Forward and Reverse Electron Fluxes in the Mitochondrial Respiratory Chain. PLoS Comput Biol 7(3). doi:10.1371/journal.pcbi.1001115

97. Seo E, Kang H, Lim O-K, Jun H-S (2018) Supplementation with IL-6 and Muscle Cell Culture Conditioned Media Enhances Myogenic Differentiation of Adipose Tissue-Derived Stem Cells through STAT3 Activation. International Journal of Molecular Sciences 19(6). doi:10.3390/ijms19061557

98. Shah M, George RL, Evancho-Chapman MM, Zhang G (2016) Current challenges in dedifferentiated fat cells research. Organogenesis 12(3):119–127. doi:10.1080/15476278.2016.1197461

99. Siddappa R, Licht R, van Blitterswijk C, Boer J de (2007) Donor variation and loss of multipotency during in vitro expansion of human mesenchymal stem cells for bone tissue engineering. J Orthop Res 25(8):1029–1041. doi:10.1002/jor.20402

100. Stanco D, Caprara C, Ciardelli G, Mariotta L, Gola M, Minonzio G, Soldati G (2019) Tenogenic differentiation protocol in xenogenic-free media enhances tendon-related marker expression in ASCs. PLoS One 14(2):e0212192. doi:10.1371/journal.pone.0212192

101. Stolzing A, Jones E, McGonagle D, Scutt A (2008) Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies. Mech Ageing Dev 129(3):163–173. doi:10.1016/j.mad.2007.12.002

102. Strong AL, Hunter RS, Jones RB, Bowles AC, Dutreil MF, Gaupp D, Hayes DJ, Gimble JM, Levi B, McNulty MA, Bunnell BA (2016) Obesity inhibits the osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. J Transl Med 14:27. doi:10.1186/s12967-016-0776-1

103. Strong AL, Hunter RS, Jones RB, Bowles AC, Dutreil MF, Gaupp D, Hayes DJ, Gimble JM, Levi B, McNulty MA, Bunnell BA (2016) Obesity inhibits the osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. J Transl Med 14:27. doi:10.1186/s12967-016-0776-1

104. Sun Y, Li W, Lu Z, Chen R, Ling J, Ran Q, Jilka RL, Chen X-D (2011) Rescuing replication and osteogenesis of aged mesenchymal stem cells by exposure to a young extracellular matrix. FASEB J 25(5):1474–1485. doi:10.1096/fj.10-161497

105. Switala J, Loewen PC (2002) Diversity of properties among catalases. Arch Biochem Biophys 401(2):145–154. doi:10.1016/S0003-9861(02)00049-8

106. Taha MF, Javeri A, Karimipour M, Yamaghani MS (2019) Priming with oxytocin and relaxin improves cardiac differentiation of adipose tissue-derived stem cells. J Cell Biochem 120(4):5825–5834. doi:10.1002/jcb.27868

107. Tam CS, Lecoultre V, Ravussin E (2012) Brown adipose tissue: mechanisms and potential therapeutic targets. Circulation 125(22):2782–2791. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.042929

108. Tanimoto K, Matsumoto T, Nagaoka Y, Kazama T, Yamamoto C, Kano K, Nagaoka M, Saito S, Tokuhashi Y, Nakanishi K (2022) Phenotypic and functional properties of dedifferentiated fat cells derived from infrapatellar fat pad. Regen Ther 19:35–46. doi:10.1016/j.reth.2021.12.006

109. Tiraby C, Langin D (2003) Conversion from white to brown adipocytes: a strategy for the control of fat mass? Trends Endocrinol Metab 14(10):439–441. doi:10.1016/j.tem.2003.10.001

110. Tsai Y-C, Cheng T-S, Liao H-J, Chuang M-H, Chen H-T, Chen C-H, Zhang K-L, Chang C-H, Lin P-C, Huang C-YF (2022) Mesenchymal Stem Cell Secreted-Extracellular Vesicles are Involved in Chondrocyte Production and Reduce Adipogenesis during Stem Cell Differentiation. Tissue Eng Regen Med 19(6):1295–1310. doi:10.1007/s13770-022-00490-0

111. Unal M, Creecy A, Nyman JS (2018) The Role of Matrix Composition in the Mechanical Behavior of Bone. Curr Osteoporos Rep 16(3):205–215. doi:10.1007/s11914-018-0433-0

112. Veldhuis-Vlug AG, Rosen CJ (2018) Clinical implications of bone marrow adiposity. J Intern Med 283(2):121–139. doi:10.1111/joim.12718

113. Vinatier C, Bouffi C, Merceron C, Gordeladze J, Brondello J-M, Jorgensen C, Weiss P, Guicheux J, Noël D (2009) Cartilage tissue engineering: towards a biomaterial-assisted mesenchymal stem cell therapy. Curr Stem Cell Res Ther 4(4):318–329. doi:10.2174/157488809789649205

114. Vogel A, Rodriguez C, Izpisúa-Belmonte JC (1996) Involvement of FGF-8 in initiation, outgrowth and patterning of the vertebrate limb. Development 122(6):1737–1750. doi:10.1242/dev.122.6.1737

115. Walton PA, Brees C, Lismont C, Apanasets O, Fransen M (2017) The peroxisomal import receptor PEX5 functions as a stress sensor, retaining catalase in the cytosol in times of oxidative stress. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res 1864(10):1833–1843. doi:10.1016/j.bbamcr.2017.07.013

116. Wang J, Zhou J, Bondy CA (1999) Igf1 promotes longitudinal bone growth by insulin-like actions augmenting chondrocyte hypertrophy. FASEB J 13(14):1985–1990. doi:10.1096/fasebj.13.14.1985

117. Wang Y, Xu J, Chang L, Meyers CA, Zhang L, Broderick K, Lee M, Peault B, James AW (2019) Relative contributions of adipose-resident CD146+ pericytes and CD34+ adventitial progenitor cells in bone tissue engineering. NPJ Regen Med 4:1. doi:10.1038/s41536-018-0063-2

118. Watson JE, Patel NA, Carter G, Moor A, Patel R, Ghansah T, Mathur A, Murr MM, Bickford P, Gould LJ, Cooper DR (2014) Comparison of Markers and Functional Attributes of Human Adipose-Derived Stem Cells and Dedifferentiated Adipocyte Cells from Subcutaneous Fat of

an Obese Diabetic Donor. Adv Wound Care (New Rochelle) 3(3):219–228. doi:10.1089/wound.2013.0452

119. Woo CH, Kim HK, Jung GY, Jung YJ, Lee KS, Yun YE, Han J, Lee J, Kim WS, Choi JS, Yang S, Park JH, Jo D-G, Cho YW Small extracellular vesicles from human adipose-derived stem cells attenuate cartilage degeneration. J Extracell Vesicles 9(1). doi:10.1080/20013078.2020.1735249

120. Wu DC, Boyd AS, Wood KJ (2008) Embryonic stem cells and their differentiated derivatives have a fragile immune privilege but still represent novel targets of immune attack. Stem Cells 26(8):1939–1950. doi:10.1634/stemcells.2008-0078

121. Wu J, Boström P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang A-H, Khandekar M, Virtanen KA, Nuutila P, Schaart G, Huang K, Tu H, van Marken Lichtenbelt WD, Hoeks J, Enerbäck S, Schrauwen P, Spiegelman BM (2012) Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. Cell 150(2):366–376. doi:10.1016/j.cell.2012.05.016

122. Wu W, Niklason L, Steinbacher DM (2013) The effect of age on human adipose-derived stem cells. Plast Reconstr Surg 131(1):27–37. doi:10.1097/PRS.0b013e3182729cfc

123. Zannetti A, Benga G, Brunetti A, Napolitano F, Avallone L, Pelagalli A (2020) Role of Aquaporins in the Physiological Functions of Mesenchymal Stem Cells. Cells 9(12). doi:10.3390/cells9122678

124. Zeng J-H, Liu S-W, Xiong L, Qiu P, Ding L-H, Xiong S-L, Li J-T, Liao X-G, Tang Z-M (2018) Scaffolds for the repair of bone defects in clinical studies: a systematic review. J Orthop Surg Res 13(1):33. doi:10.1186/s13018-018-0724-2

125. Zhang Y, Khan D, Delling J, Tobiasch E (2012) Mechanisms underlying the osteo- and adipo-differentiation of human mesenchymal stem cells. ScientificWorldJournal 2012:793823. doi:10.1100/2012/793823

126. Zhou G, Zheng Q, Engin F, Munivez E, Chen Y, Sebald E, Krakow D, Lee B (2006) Dominance of SOX9 function over RUNX2 during skeletogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A 103(50):19004–19009. doi:10.1073/pnas.0605170103

127. Zhou S, Greenberger JS, Epperly MW, Goff JP, Adler C, Leboff MS, Glowacki J (2008) Age-related intrinsic changes in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts. Aging Cell 7(3):335–343. doi:10.1111/j.1474-9726.2008.00377.x

128. Zhou Z, Kang YJ (2000) Cellular and subcellular localization of catalase in the heart of transgenic mice. J Histochem Cytochem 48(5):585–594. doi:10.1177/002215540004800502

129. Zimmermann EA, Busse B, Ritchie RO (2015) The fracture mechanics of human bone: influence of disease and treatment. Bonekey Rep 4:743. doi:10.1038/bonekey.2015.112

Wissenschaftliche Vorträge

Einfluss PI3-Kinase-, cAMP- und cGMP-vermittelter Signalkaskaden auf die TGF β/Insulin-induzierte Chondrogenese von humanen Fettgewebe-stämmigen Stammzellen in vitro

Anne Bollmann, C. V. Suschek, J. Windolf

Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie (DKOU 2016)

25.10. - 28.10.2016, Berlin

I'm not big boned, I'm just fat! - Oxidative stress induces adipogenesis in osteogenic differentiating ASC and DFAT cultures hindering a sufficient osteogenesis

Anne Bollmann, C. Sons, C. V. Suschek

9th International Meeting Stem Cell Network North Rhine-Westphalia

May 16–17, 2017, Bonn

Tissue Engineering von Knorpel: Positiver Einfluss von zugesetzter Katalase und SOD-Mimetikum MnTBAP auf die Chondrogenese von ASCs

Anne Bollmann, C. V. Suschek, J. Windolf

Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie (DKOU 2018)

23.10. - 26.10.2018, Berlin

Wissenschaftliche Veröffentlichung

Comparative Study of the Osteogenic Differentiation Potential of Adipose Tissue-Derived Stromal Cells and Dedifferentiated Adipose Cells of the Same Tissue Origin under Pro and Antioxidant Conditions

Anne Bollmann , H C Sons , J L Schiefer , P. C Fuchs , J. Windolf , C. V. Suschek

Biomedicines. 2022 Nov 29;10(12):3071. doi:10.3390/biomedicines10123071

Ich versichere an Eides statt, dass die

Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der

Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf erstellt worden ist.

Düsseldorf den Anne Wiebke Bollmann