

Stammzellplastizität und Alterung humaner fettabgeleiteter Stammzellen

Dissertation
Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

Vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von: Madona Knuth
Geboren am 14.09.1986 in Tiflis, Georgien

Gutachter:

1. Prof. Dr. Maria Wartenberg, Universitätsklinikum Jena
2. Prof. Dr. Dr. Stefan Schulze-Mosgau, Universitätsklinikum Jena
3. Prof. Dr. med. Norbert Dahmen, Burghof-Klinik Rinteln

Tag der öffentlichen Verteidigung: 05.10.2021

1. Inhaltsverzeichnis

1.	Inhaltsverzeichnis.....	3
2.	Abkürzungsverzeichnis.....	6
3.	Zusammenfassung.....	8
4.	Einleitung.....	10
4.1	Stammzellen.....	10
4.2	ASCs.....	11
4.3	Zellproliferation und Regulation des Zellzyklus.....	13
4.4	Zelluläre Seneszenz und Alterung.....	15
4.5	Die Theorie der freien Radikale.....	18
4.6	Abwehrmechanismen gegen oxidativen Stress.....	21
4.7	Antioxidativer Schutz.....	23
5.	Zielstellung.....	26
6.	Methodik.....	27
6.1	Isolierung der ASCs.....	27
6.2	Kultivierung der ASCs.....	28
6.3	Durchflusszytometrie.....	29
6.4	cLSM – <i>confocal Laser Scanning Microscope</i>	31
6.4.1	Immunocytochemie (ICC).....	32
6.4.2	ROS-Messung.....	34
6.4.3	Letalitätsmessung.....	34
6.4.4	Messung der SA- β -Galactosidase-Aktivität.....	35
6.5	Semiquantitative PCR.....	35
6.5.1	RNA-Isolation.....	35
6.5.2	cDNA-Synthese.....	36
6.5.3	PCR-Gelelektrophorese.....	37
6.5.4	Semiquantitative Kalkulation der relativen mRNA-Expression.....	38
6.6	Statistik.....	39
7.	Ergebnisse.....	40
7.1	Charakterisierung der ASCs.....	40
7.2	Vergleich der Zellen von jungen und alten Spendern in P6 und P16.....	41
7.2.1	Untersuchung der Stammzellmarker.....	42
7.2.2	Dichteabhängige Proliferation.....	43

7.2.3	Genexpression der Marker p27 und p21	45
7.2.4	Untersuchung der SA- β -Galactosidase-Aktivität.....	46
7.2.5	Genexpression der Marker Sirt1 und FoxO3a.....	47
7.2.6	Untersuchung des ROS-Gehalts.....	48
7.2.7	Untersuchung der Letalität	49
7.3	Inkubation mit Wasserstoffperoxid.....	51
7.3.1	Untersuchung der Proliferationsmarker	51
7.3.2	Untersuchung der Seneszenzmarker	53
7.4	Inkubation mit Radikalfängern.....	54
7.4.1	Untersuchung der Proliferationsmarker	55
7.4.2	Untersuchung der Seneszenzmarker	57
8.	Diskussion	59
8.1	Die klinische Bedeutung der Stammzellen und deren Plastizität.....	59
8.2	Gewinnung und Charakterisierung der ASCs	60
8.3	Die Bedeutung des Spenderalters, der Zelldichte und der Passagen.....	61
8.4	Die Korrelation der Expression von Seneszenzmarkern mit der Zellproliferation und der ROS-Bildung.....	65
8.5	Der Einfluss von exogenen ROS.....	67
8.6	Der Einfluss von Radikalfängern auf die Expression von Seneszenzmarkern und die Zellproliferation	71
8.7	Stärken und Limitationen des Versuchsdesigns.....	73
9.	Schlussfolgerung	75
10.	Literaturverzeichnis.....	77
11.	Anhang	87
11.1	Materialien	87
11.1.1	Geräte	87
11.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	88
11.1.3	Chemikalien und Reagenzien.....	88
11.1.4	Puffer und Lösungen	90
11.1.5	Primer	91
11.1.6	Antikörper	91
11.1.7	Software	92
11.2	Abbildungsverzeichnis	93
11.3	Tabellenverzeichnis	95

- Inhaltsverzeichnis -

11.4 Vota der Ethikkommission.....	96
11.5 Ehrenwörtliche Erklärung	97
11.6 Danksagung.....	98
11.7 Lebenslauf.....	99

2. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
AD	Alzheimer-Demenz
ADAS	<i>adipose-derived adherent stromal cells</i>
AdMSC	<i>adipose mesenchymal stem cells</i>
AK	Antikörper
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	Adenosinmonophosphat-abhängige Kinase
ASC	<i>adipose-derived stem cells</i> (fettabgeleitete Stammzellen)
bASC	<i>bovine adipose-derived stem cells</i>
BMSC	<i>bone marrow-derived stem cells</i>
CAK	<i>cyclin activating kinase</i>
CAL	<i>cell-assisted lipotransfer</i>
CAT	Katalase
CD	<i>Cluster of Differentiation</i> (immunphänotypische Oberflächenmerkmale)
CDK	<i>cyclin dependent kinase</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
Cip/Kip	<i>CDK interacting protein/Kinase inhibitory protein</i>
CKI	Cyclin-Kinase-Inhibitoren
cLSM	<i>confocal laser scanning microscope</i>
CuZn-SOD	Kupfer-Zink-enthaltende Superoxid-Dismutase
DMSO	Dimethylsulfoxid
E2	17 β -Estradiol
EC-SOD	Extrazelluläre Superoxid-Dismutase
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
EthD-2	Ethidium-Homodimer-2
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i> (Durchflusszytometer)
FBS	<i>fetal bovine serum</i> (Fetales Kälberserum)
Fe-S-Cluster	Eisen-Schwefel-Cluster
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FoxO	<i>Forkhead box class O</i>
G ₀ - / G ₁ - / G ₂ - Phase	<i>Gap phase</i>
GSH	Glutathione
GTP / GPX	Glutathionperoxidase
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
Hdm2	<i>human double minute 2</i>
ICC	<i>Immunocytochemistry</i> (Immunocytochemie)
IFATS	<i>International Fat Applied Technology Society</i>

- Abkürzungsverzeichnis -

INK	<i>inhibitors of CDK4</i>
ISCT	<i>International Society for Cellular Therapy</i>
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
Ki67	Protein, entdeckt in Kiel im Jahr 1967
LD	Letale Dosis
M-Phase	Mitose-Phase
Mdm2	<i>mouse double minute 2</i>
MnSOD	Mangan-Superoxid-Dismutase
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS	Multiple Sklerose
MSLP	<i>maximum life span potenzial</i>
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NF- κ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NMPG	<i>N-2-mercaptopropionyl-glycine</i>
Oct4	<i>Octamer binding transcription factor 4</i>
p21 / p27 / p53	Protein 21 / Protein 27 / Protein 53
P3 / P6 / P16	Passage 3 / Passage 6 / Passage 16
p38MAPK	p38-mitogenaktivierte Proteinkinasen
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBS-T	PBS-Triton X-100
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PD	<i>population doublings</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
pRb	<i>retinoblastoma protein</i> (Retinoblastom-Protein)
PRX	Peroxiredoxin
qPCR	<i>quantitative PCR (realtime-PCR)</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (freie Sauerstoffradikale)
rpm	<i>rotations per minute</i>
RT	Raumtemperatur
S-Phase	Synthese-Phase
SA- β -Galactosidase	Seneszenz-assoziierte- β -Galactosidase
SEM	<i>standard error of the mean</i> (Standardfehler)
Sirt1	<i>silent information regulator 2</i>
SIPS	stressinduzierte prämatüre Seneszenz
SNP	<i>single nucleoid polymorphism</i>
SOD	Superoxid-Dismutase
Sox2	<i>sex determining region Y box 2</i>
SVF	stromale vaskuläre Fraktion
Trolox	6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure
TRX	Thioredoxin

3. Zusammenfassung

Die Altersforschung untersucht die Ursachen und Mechanismen des Alterns. Verlören Stammzellen nicht die Fähigkeit, sich zu erneuern, würde die Anfälligkeit gegenüber Krankheiten im Alter nicht zunehmen und die derzeitige durchschnittliche Lebensdauer der Menschen könnte deutlich überschritten werden. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Zellproliferation und Seneszenz in mesenchymalen Stammzellen aus Fettgewebe (*adipose-derived stem cells*, ASCs) unter besonderer Berücksichtigung der Rolle von oxidativem Stress sowie von Radikalfängern zu untersuchen. ASCs haben im Unterschied zu anderen Stammzellen den Vorteil, dass sie leicht verfügbar sind und über ein großes Proliferations- und Differenzierungspotenzial verfügen.

Zunächst wurden ASCs von Fettgewebe isoliert. Eine erfolgreiche Zellpräparation gemäß der Minimalkriterien der Internationalen Gesellschaft für Zelltherapie (*International Society for Cellular Therapy*, ISCT) wurde anhand der positiven Stammzellmarker (CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166) und der negativen Stammzellmarker (CD31, CD34, CD133) in Passage 3 (P3) festgestellt.

Verglichen wurden ASCs in niedriger Passage (P6, *ex vivo**) und in hoher Passage (P16, *in vitro*) sowie Zellen von jungen (ASC_j, jünger als 35 Jahre) und alten Spendern (ASC_a, älter als 55 Jahre). Weitere Einflussgrößen waren erhöhter oxidativer Stress durch die Inkubation der Zellen mit Wasserstoffperoxid sowie der Schutz vor oxidativem Stress durch die Inkubation mit den Radikalfängern NMPG und Trolox. Messgrößen waren die Stammzellmarker, wobei drei positive mesenchymale Stammzellmarker (CD73, CD90 und CD105) sowie ein negativer hämatopoetischer Stammzellmarker (CD34) verwendet wurden. Weitere Messgrößen waren der Gehalt an freien Sauerstoffradikalen (*reactive oxygen species*, ROS), die Letalität der Zellen, die Proliferationsmarker Ki67, p27 und p21 sowie die Seneszenzmarker SA-β-Galaktosidase-Aktivität, Sirt1 und FoxO3a.

Es wurde eine verminderte Proliferation in P16 anhand der Stammzellmarker CD90 sowohl in ASC_j als auch in ASC_a nachgewiesen. Zudem konnte anhand des Proliferationsmarkers Ki67 gezeigt werden, dass in P16 die Proliferation der ASC_a (abhängig von der Zelldichte) im Ver-

* Es wurden keine Untersuchungen *in vivo* durchgeführt. Jedoch wird bei den Zellen in niedrigen Passagen ein *in vivo* Zustand ohne Zellkultureinfluss angenommen, der zur Unterscheidung als *ex vivo* bezeichnet wird.

gleich zu ASCj signifikant reduziert ist. Dies wurde ebenfalls auf der RNA-Ebene deutlich, indem eine erhöhte Genexpression von p27 und p21 aufgezeigt werden konnte. Zudem wurde eine erhöhte ROS-Bildung in ASCa im Vergleich zu ASCj, sowie in P16 im Vergleich zu P6 nachgewiesen. In P6 wurde in ASCa eine signifikant höhere SA- β -Galaktosidase-Aktivität als in ASCj festgestellt. Diese deutet auf einen Alterungsprozess *ex vivo* hin. Zudem konnte mit dem Anstieg der SA- β -Galaktosidase-Aktivität in P16 ein Hinweis auf einen Alterungsprozess *in vitro* festgestellt werden.

Bei den Zellen, die mit 500 nM und 1 μ M H₂O₂ inkubiert worden waren, wurden in P16 signifikant mehr letale Zellen detektiert als in P6. Dies deutet darauf hin, dass während des Alterungsprozesses *in vitro* die Effektivität des antioxidativen Systems der ASCs unabhängig vom Alter des Spenders nachlässt. Nach der H₂O₂-Inkubation mit 250 nM wurde ein negativer Effekt auf die Proliferation sowohl bei ASCj als auch bei ASCa nachgewiesen, zudem wurde in beiden Gruppen die SA- β -Galactosidase-Aktivität stimuliert. Die Ergebnisse belegen den negativen Einfluss von oxidativem Stress auf die Proliferation, welcher mit einer erhöhten Seneszenz einhergeht.

Nach der Inkubation mit den Radikalfängern Trolox und NMPG konnte eine nicht-einheitliche positive Wirkung auf die Proliferation nachgewiesen werden. Trolox bewirkte eine signifikante Hochregulation von Ki67 bei ASCj in P16 und eine signifikante Herunterregulation von p27 bei ASCa in P16. Eine signifikante positive Wirkung von NMPG auf Ki67 war bei ASCa in P16 zu sehen. Eine Wirkung auf die Seneszenzmarker durch Trolox wurde nur bei ASCa in P6 mit der herabgesetzten SA- β -Galactosidase-Aktivität festgestellt.

Somit konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Marker der Zellproliferation und der Seneszenz durch oxidativen Stress beeinflusst werden. Die Zellen von jungen Spendern zeigten eine höhere Proliferationsrate, eine geringere ROS-Bildung und ein effektiveres antioxidatives System. Zudem zeigte sich, dass die Anzahl der Passagen einen größeren Einfluss auf die Proliferation und Seneszenz hat als das Spenderalter. Folglich war der Alterungsprozess *in vitro* deutlicher ausgeprägt als *ex vivo*. Die Ergebnisse der Arbeit stehen in Übereinstimmung mit aktuellen Befunden, die nahelegen, dass oxidativem Stress eine enorme Bedeutung bei der Zellalterung beizumessen ist. Überdies konnte gezeigt werden, dass die untersuchten Radikalfänger keinen ausreichenden Schutz gegen oxidativen Stress bieten.

4. Einleitung

4.1 Stammzellen

Stammzellen sind besondere Zelltypen, die durch die Kombination der folgenden zwei Eigenschaften charakterisiert sind: sich selbst zu erneuern und sich in verschiedene Zelltypen differenzieren zu können. Man unterscheidet embryonale (ES-Zellen) und adulte Stammzellen. ES-Zellen werden von der Blastozyste isoliert; sie zeichnen sich durch Pluripotenz und die Fähigkeit zur Selbsterneuerung aus. Sie besitzen die Eigenschaft, Zelltypen aller drei Keimblätter (Entoderm, Mesoderm und Ektoderm) sowie Keimbahnzellen (Oozyten und Spermatogonien) auszubilden (Groebner et al. 2006). Adulte Stammzellen sind undifferenzierte pluripotente Zellen, welche im Gegensatz zu ES-Zellen in bereits differenzierten Organen und Geweben vorkommen. Stammzellen besitzen die Fähigkeit, sich unbeschränkt zu erneuern, indem sie durch Teilung eine Kopie der Stammzelle und eine spezialisierte Zelle des jeweiligen Gewebes entwickeln (Watt und Hogan 2000). Das pluripotente Differenzierungspotenzial wird als Plastizität bezeichnet (Bianco und Robey 2001). Bereits 1861 wurde die Existenz fibroblastartiger, nichthämatopoetischer Zellen im Knochenmark beschrieben, die an Entzündungsprozessen und der Geweberegeneration beteiligt sind (Cohnheim 1967). Neben Knochenmark, Periost und Muskeln wurde Fettgewebe als weitere Quelle mesenchymaler Stammzellen identifiziert.

Die Pluripotenz der Stammzellen ermöglicht ihre Verwendung in der Stammzelltransplantation für das Regenerieren von Gewebe. Experimentelle Studien haben gezeigt, dass die Stammzelltransplantation beim Myokardinfarkt die Funktion des Gewebes verbessert (Madonna und De Caterina 2010). Bei der terminalen Herzinsuffizienz ist die Herztransplantation eine therapeutische Option, allerdings ist die Anwendung aufgrund der limitierten Anzahl von Spenderorganen, der immunologischen Abstoßung und der infektiösen Komplikationen sehr begrenzt. Die Stammzelltransplantation, bei der die transplantierten Stammzellen zu Kardiomyozyten differenzieren, ermöglicht einen hoffnungsvollen therapeutischen Ansatz bei terminaler Herzinsuffizienz, sowie bei koronarer Herzkrankheit. Hervorzuheben ist die klinische Relevanz von Stammzellen bei altersabhängigen

Krankheiten, wie neurodegenerativen Krankheiten (Demenz Alzheimer-Typ und Morbus Parkinson), Diabetes Mellitus (Schöler 2003) und Tumoren (Pan 2009).

Ausdifferenzierte Zellen teilen sich nicht mehr, dagegen können sich Stammzellen unbegrenzt teilen, wobei eine Kopie der Stammzelle und eine ausdifferenzierende Zelle entstehen. Stammzellen erweisen sich durch ihre Selbsterneuerung als beständige Quellen für die Geweberegeneration. Der Aufrechterhaltung der Organfunktionen liegt die Plastizität der Stammzellen zugrunde. Diese bezeichnet die Fähigkeit der Stammzellen, sich in unterschiedlichen Zelltypen zu differenzieren. Die Definition der mesenchymalen Stammzellen beinhaltet drei Eigenschaften: Selbstreplikation, Plastizität und Hierarchie. Dabei gelten Selbstreplikation und Hierarchie als nicht mehr essenziell (Delorme et al. 2006). Das Hauptcharakteristikum ist die Plastizität. Die Untersuchung der Stammzellalterung trägt zur Erklärung einer Reihe von Erkrankungen bei, deren Pathogenese eng mit dem Alterungsprozess der Stammzellen und dem Verlust der Plastizität zusammenhängt. Die therapeutische Bedeutung der Stammzellen besteht vor allem darin, bei einem Funktionsausfall eines Organs durch die autologe Stammzelltransplantation eine langfristige Substitution zu ermöglichen.

4.2 ASCs

Für Stammzellen, die aus Fettgewebe abgeleitet wurden, existieren mehrere Bezeichnungen, wie *adipose(-derived) stem/stromal cells* (ADSCs), *adipose-derived adult stem cells*, *adipose mesenchymal stem cells* (AdMSCs), *adipose-derived adherent stromal cells* (ADASs) sowie *processed lipoaspirate cells* (PLA) (Zuk 2013). Die „*International Fat Applied Technology Society*“ und die „*International Federation of Adipose Therapeutics and Science*“ (IFATS) führten 2004 den Begriff der ASCs („*adipose-derived stem cells*“) (Daher et al. 2008) ein.

Im Jahr 1964 wurde das Enzym Kollagenase verwendet, um reife Adipozyten zu isolieren (Rodbell 1964). Später wurde die Existenz von Stammzellen im Fettgewebe bestätigt.

Das Fettgewebe besteht hauptsächlich aus reifen Adipozyten (mehr als 90%) und einer stromalen vaskulären Fraktion (SVF), in der Präadipozyten, Fibroblasten, glatte Muskelzellen,

Endothelzellen, Monozyten, Makrophagen, Lymphozyten und ASCs enthalten sind (Bourin et al. 2013).

Für die Charakterisierung der ASCs werden bislang die Minimalkriterien verwendet, welche von der Internationalen Gesellschaft für Zelltherapie (*International Society for Cellular Therapy*, ISCT) festgelegt wurden. Diese Kriterien beinhalten folgende Punkte:

- Fähigkeit der Zellen unter Standardkulturbedingungen zu adhären;
- Die Fähigkeit, spezifische Oberflächenmarker zu exprimieren (negativ: CD34, CD45, CD14; positiv: CD73, CD90, CD105);
- Differenzierungsfähigkeit zu Osteoblasten, Adipozyten und Chondrozyten *in vitro*.

ASCs besitzen ein Multidifferenzierungspotenzial, welches in zahlreichen Experimenten nachgewiesen wurde. Abgesehen von der Differenzierung zu Adipozyten und Osteoblasten wurden neuronale Differenzierungsprozesse und die Entstehung von Kardiomyozyten demonstriert. Dies verdeutlicht die Multipotenz von ASCs, aus denen sowohl mesodermale (Fett, Knochen, Knorpel, Muskel, Kardiomyozyten) (Liu et al. 2016, Song et al. 2016, Wystrychowski et al. 2016) als auch ektodermale (Neuronen) Zelltypen abgeleitet werden konnten (Salehi et al. 2016).

Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass ASCs ein größeres Proliferationspotenzial als andere Stammzellen besitzen (Fraser et al. 2006, Li et al. 2015). 2008 veröffentlichte Zhu mit seinen Kollegen eine Publikation mit dem Namen: „*Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC*“ (BMSC, *bone marrow-derived stem cells*), in der über die Vorteile der ASCs gegenüber aus Knochenmark isolierten Stammzellen berichtet wurde (Zhu et al. 2008).

Ein weiterer Vorteil der ASCs besteht darin, dass sie im menschlichen Organismus reichlich vorhanden sind und mit weniger invasiven Methoden in größerer Menge gewonnen werden können. Diese leichtere Verfügbarkeit, das große Differenzierungs- und Proliferationspotenzial sind starke Argumente für eine therapeutische und reparative Anwendung, insbesondere für die autologe Zelltransplantation (Shaun et al. 2016). Die autologe Zelltransplantation erscheint zudem als therapeutische Angiogenese für die Unterstützung der Bildung von kollateralen Gefäßen im ischämischen Gewebe vielversprechend (Freedman und Isner 2001).

Die Zelltherapie mit ASCs basiert neben der immunmodulatorischen und wundheilungsfördernden Wirkung auf dem Multidifferenzierungspotenzial in verschiedene Zelltypen und Gewebe. Die zellassistierte Fettgewebstransplantation (*cell-assisted lipotransfer*, CAL), in der das Fettgewebe mit SVF eingebracht wird, fand bereits in der Mamma- und Gesichtswichteilaugmentation klinische Anwendung (Yoshimura et al. 2008).

4.3 Zellproliferation und Regulation des Zellzyklus

Unter Zellproliferation (lat. *proles* „Nachwuchs“, *ferre* „tragen“) wird die Vermehrung des Gewebes verstanden. Diese beinhaltet die Zellteilung (Zytokinese) und das Zellwachstum. Der Lebenszyklus von Zellen wird in mehrere Phasen unterteilt: G₁-, S-, G₂- und M-Phase.

Die G₁-Phase ist die längste Zellzyklusphase, in der die Zelle unter dem Einfluss von extrazellulären Wachstumsfaktoren wächst und sich auf die DNA-Replikation vorbereitet. Bei starkem Nährstoff- bzw. Wachstumsfaktordefizit können die Zellen in die G₀-Phase übergehen und aus dem Zellzyklus austreten. Über eine neue Zellzyklusrunde wird am Restriktionspunkt (R-Punkt) entschieden, welcher von einem tumorsuppressorischen Retinoblastom-Protein (*retinoblastoma protein*, pRb) kontrolliert wird. Die in der G₀-Phase verbliebenen Zellen können durch einen Proliferationsreiz wieder in den Zellzyklus eintreten.

Der Ablauf der Zellzyklusphasen wird durch eine Vielfalt regulatorischer Proteine und Enzyme kontrolliert. Die wichtigsten Effektorkinasen des Zellzyklus, die Cyclin-abhängigen Kinasen (*cyclin dependent Kinases* - CDK), werden in ihrer Aktivität durch Cycline reguliert, deren Konzentrationen während des Zellzyklus schwanken (Draetta 1990, Sherr 1994) (siehe Abb. 1).

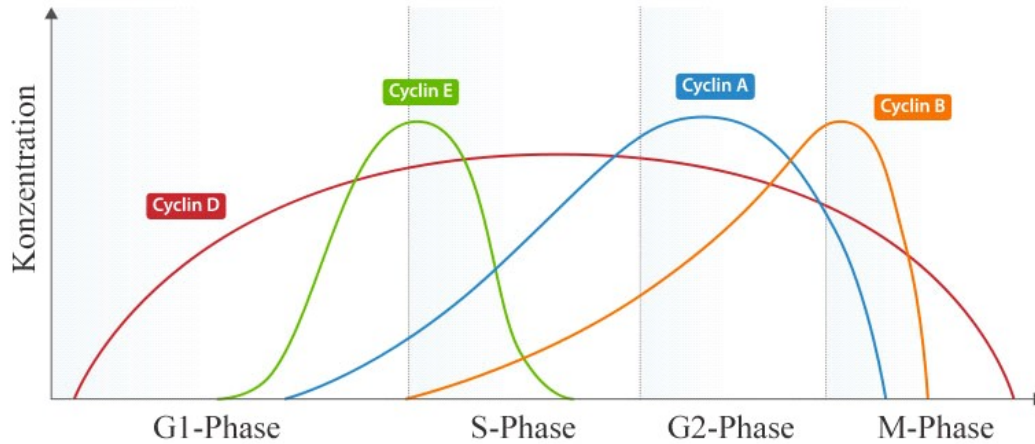


Abb. 1 Typische Konzentrationsschwankungen der Cycline im Zellzyklus. Cyclin D ist während des gesamten Zellzyklus vorhanden. Cyclin E bestimmt den Übergang von der G₁- zur S-Phase mit. Eine steigende Konzentration von Cyclin A leitet die Zelle in die G₂-Phase. Cyclin B ist für das Einsetzen der Mitose verantwortlich (WikiMiMa 2007).

Die Aktivitäten der Cyclin/CDK-Komplexe werden durch Phosphatasen (*cell division cycle*, CDC₂₅) und Kinasen (*cyclin activating kinase*, CAK) reguliert. Des Weiteren wird die Enzymaktivität durch spezifische Cyclin-Kinase-Inhibitoren (CKI) gesteuert. Der Übergang von G₁- zur S-Phase wird durch zwei Klassen von CDKs, nämlich CDK4/6 und CDK2 reguliert, deren Aktivität wiederum durch zwei unterschiedliche CKI-Familien – INK4 und Cip/Kip – kontrolliert wird (Dupont et al. 2003). Die Cip/Kip-Proteine, wie zum Beispiel p21^{cip/waf} (p21, *cell cycle inhibitory protein 1*) und p27^{kip1} (p27), binden sich bei der abnormalen Proliferation oder bei DNA-Schädigung an Cyclin/CDK-Komplexe, um deren katalysatorische Aktivität zu blockieren und einen Zellzyklusarrest zu induzieren (Kim et al. 2006). Cip/Kip-Proteine werden wiederum vom multifunktionalen Tumorsuppressor p53 reguliert. Um eine Reparatur der Schäden zu ermöglichen, wird der Zellzyklus in der jeweiligen Phase durch eine Steigerung der Zellzyklusinhibitoren aufgehalten. Schlägt dies fehl, kann p53 die Apoptose der Zelle induzieren. Daher findet sich ein hoher Gehalt an p21 sowie p27 in den ruhenden oder Kontakt-inhibierten Zellen. Antiproliferative Signale führen ebenfalls zur Kumulation der o.g. Proteine. Ein höheres Level von p21 ist am irreversiblen Zellzyklusarrest und der zellulären Seneszenz beteiligt (Torella et al. 2004).

4.4 Zelluläre Seneszenz und Alterung

Bereits 1961 entdeckte Leonard Hayflick, dass sich humane Fibroblasten in Zellkultur bis zu einer gewissen Anzahl an Zellteilungen (40-80) kultivieren lassen (Hayflick-Limit). Anschließend gehen sie in ein Stadium über, welches er als „Seneszenz“ bezeichnete. In diesem Stadium teilen sich die Fibroblasten auch nach Subkultivierung und Stimulation mit Wachstumsfaktoren nicht wieder (Hayflick 1977).

Senescente Zellen befinden sich in der G₀-Phase des Zellzyklus, ein Zustand, der auch als replikative Seneszenz bezeichnet wird. Hayflick beobachtete, dass dieser Zustand mit der Verkürzung der Telomere zusammenhängt.

Die zweite Form der zellulären Seneszenz, welche vorzeitig durch unterschiedliche Stressfaktoren, wie bestimmte Onkogene, reaktive Sauerstoffspezies oder andere DNA-schädigende Faktoren induziert wird, ist als prämaturne Seneszenz beschrieben und verläuft unabhängig von der vorprogrammierten Verkürzung der Telomere (Zhang 2007).

In Zellkultur wird die prämaturne Seneszenz meist induziert und folglich als stressinduzierte prämaturne Seneszenz (*stress-induced premature senescence*, SIPS) bezeichnet (Toussaint et al. 2000), welche durch einen der zwei großen Signalwege - p53/p21 und p16/pRb - vermittelt wird. Das aktivierte p53 führt zur Erhöhung des p21-Niveaus, welches den Zellzyklusarrest herbeiführt. Der p53/p21-Seneszenz-Signalweg wird durch oxidativen Stress sowie durch DNA-Schädigung, Verkürzung und/oder Schädigung der Telomere aktiviert (Campisi und d'Adda di Fagagna 2007). Schlägt die DNA-Reparatur fehl, wird der p53-abhängige Signalweg zur Seneszenz und zur Apoptose führen (siehe Abb. 2). In Experimenten wurde eine erhöhte Expression von p53 und p21 durch oxidatives Stress nachgewiesen (Choi et al. 2012, Westin et al. 2011). Die p53-Aktivität wird hauptsächlich durch Dephosphorylierung und Deacetylierung reguliert. Zu den negativen p53-Regulatoren gehört die NAD-abhängige Deacetylase Sirt1 (*human silent information regulator 2*). Die Überproduktion von Sirt1 inhibiert durch Deacetylierung die Aktivität des p53-Transkriptionsfaktors, wodurch der p53-abhängige Signalweg zum Zellzyklusarrest durchtrennt wird (Luo et al. 2001). Die Interaktion von Sirt1 mit den FoxO-Transkriptionsfaktoren (*forkhead box class O*) ist ebenso relevant bei oxidativ-stressinduzierter Apoptose. Durch oxidativen Stress wird Sirt1 aktiviert, welches wiederum

durch die Deacetylierung von FoxO-Transkriptionsfaktoren die Resistenz gegenüber oxidativem Stress und der Apoptose gewährleistet (Brunet et al. 2004).

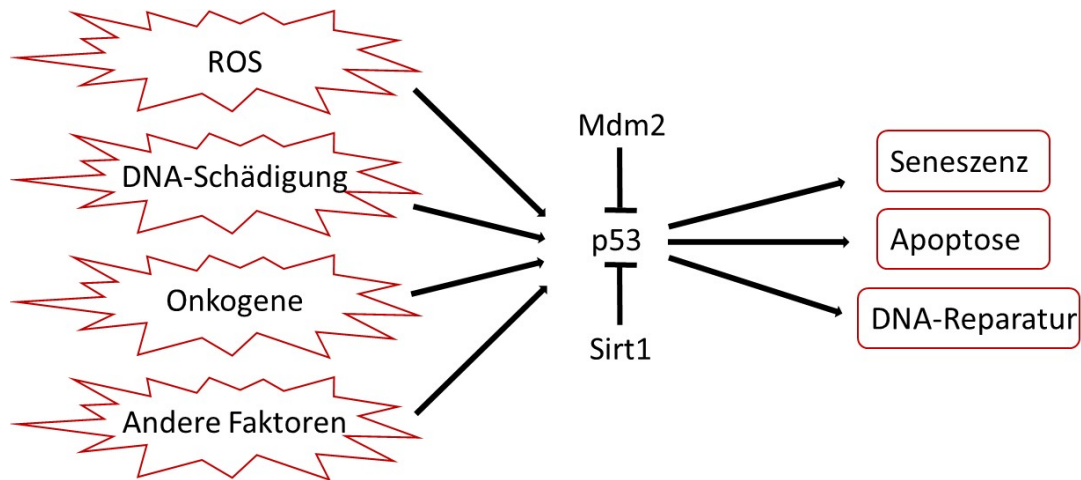


Abb. 2 Schematische Darstellung der Aktivierungsmöglichkeiten von p53 mit anschließenden Ausgangsmöglichkeiten: Seneszenz, Apoptose oder DNA-Reparatur.

In mesenchymalen Stammzellen wird *in vitro* durch oxidativen Stress oder ionisierende Strahlung die prämaturne Seneszenz ausgelöst. Viele normale Zellen sowie Tumorzellen werden durch radioaktive Belastung, nach Inkubation mit H₂O₂ oder Histon-Deacetylase-Inhibitoren in den Seneszenzzustand versetzt. Zellen in prämaturner Seneszenz weisen einige Merkmale der replikativen Seneszenz auf, sowohl morphologisch als auch auf molekularer Ebene, beispielsweise hinsichtlich des Anstiegs der SA- β -Galactosidase-Aktivität und des dauerhaften Zellzyklusarrests (Dumont et al. 1999, Toussaint et al. 2000).

In Experimenten an Krebszellen der Mundschleimhaut (*oral mucosa cancer cells*) wurde herabgesetzte Proliferation nach der 24-stündigen Applikation von 2-16 V/m Gleichstrom nachgewiesen. Dieser Zustand zeichnet sich durch die reduzierte Aktivität der Proliferationsmarker Ki67 und durch die Hochregulation der CDK p21 und p27 aus (Wartenberg et al. 2008).

Die Hypothese, die Seneszenz sei am Alterungsprozess beteiligt, beruht zudem darauf, dass die Zellen von alten Spendern nach wenigen Teilungen (*population Doublings PD*) zur Seneszenz tendieren, im Gegensatz zu Zellen von jungen Spendern (Schneider und Mitsui. 1976).

Während der Alterung erschöpft sich die Fähigkeit der Zellen, sich zu erneuern. Zudem tendieren Zellen von Lebewesen mit kurzer Lebensspanne schneller zur Seneszenz als jene von Lebewesen mit langer Lebensspanne. Dies gilt auch für humane Zellen von Erkrankten mit Progerie-Syndrom (*Progeria infantilis*, Hutchinson-Gilford-Syndrom, HGPS), beziehungsweise dem Werner-Syndrom (*Progeria adultorum*). Bei beiden Syndromen wird durch die Telomerenverkürzung und DNA-Schädigungen eine genetische Instabilität verursacht. Diese irreversible genetische Instabilität ruft über den p53-Signalweg die Seneszenz und die Apoptose hervor. Dieses Phänomen wurde in Experimenten bestätigt, in denen bei einer Überproduktion von hTERT (*human telomerase reverse transcriptase*) p53 deaktiviert wurde (Cao et al. 2011).

In einer anderen Studie wurden Probanden mit chronischen Krankheiten, wie Diabetes mellitus Typ 2, Krebs und koronarer Herzkrankheit untersucht und mit gesunden Probanden verglichen. Es wurden drei Einzelnukleotidpolymorphismen (*single nucleotid polymorphism*, SNP) im Gen von FoxO3a bei älteren gesunden Probanden entdeckt, deren geringerer Gehalt im Alter mit der Tendenz zu chronischen Erkrankungen zusammenhängt (Willcox et al. 2008). Zudem konnten in hundertjährigen Probanden 16 verschiedene SNPs von FoxO3a nachgewiesen und mit Langlebigkeit im Zusammenhang gebracht werden (Flachsbar et al. 2009).

Das Lungenemphysem gehört zu den Krankheiten, die durch SIPS verursacht werden. In einem Experiment an MEFs (*mouse embryonic fibroblasts*) wurde durch die Überproduktion von Caveolin-1 SIPS nachgewiesen (Volonte und Galbiati 2009). Caveolin-1 bindet sich an Mdm2 (*mouse double minute 2*; das menschliche Analogon ist Hdm2), welches, ebenso wie Sirt1, zu den negativen Regulatoren von p53 gehört. Dem Inaktivieren von Mdm2 folgt ein Aktivitätsanstieg von p53 und p21, woraus der Zellzyklusarrest und die prämaturre Seneszenz resultieren. Folglich gilt SIPS als ein bedeutender verantwortlicher Mechanismus für altersabhängige Krankheiten.

Die Theorie der sogenannten „verzögerten persistierenden genomischen Instabilität“ (*persistent delayed genomic instability*) wurde von Simons im Jahr 2000 als ein Entstehungsmodell für altersbedingte Krankheiten postuliert. Eine Vielzahl endogener und exogener Reize hat bei entsprechender Intensität eine karzinogene Wirkung. Diese Reize können chemische, biologische oder physikalisch wirkende Substanzen sein - vor allem ROS, Onkogene und ionisierende Strahlung. Wenn auch eine direkte Tumorentstehung ausbleibt, kommt es zu einer

Anhäufung chromosomaler Aberrationen und Mutationen, welche für die Entstehung der verzögerten persistierenden genomischen Instabilität und für den Alterungsprozess verantwortlich sind (Simons 2000).

Im zunehmenden Alter sinkt das systemische Level der Sexualhormone. Deren Auswirkung auf die Knochen ist die gut erforschte Pathogenese der Osteoporose. *In vitro* untersuchte Osteoblasten von Patienten mit Osteoporose wiesen eine verminderte Proliferation sowie die Charakteristik der zellulären Seneszenz auf. Zudem zeigten die Zellen nach dem mehrmaligen Passagieren eine Reduktion der Telomerenlänge, was in den Zellen von altersentsprechenden Kontrollgruppen nicht nachgewiesen werden konnte (Kassem et al. 1997).

Dass sich oxidativer Stress über die Oxidation des LDL-Cholesterins (*low density lipoprotein cholesterol*) zytotoxisch und atherogen auswirkt, wurde in mehreren Publikationen beschrieben (Steinberg et al. 1989, Witztum et al. 1991, Reid et al. 1993, Holland et al. 1996, Ohara et al. 1993).

4.5 Die Theorie der freien Radikale

Das Altern wurde von Comfort als altersabhängige Erhöhung der Anfälligkeit für Krankheiten und Sterblichkeit definiert (Comfort 1960). Auf den Alterungsprozess wirken unterschiedliche Faktoren, wie die genetische Disposition, Lebens- und Ernährungsstile sowie Umwelt- und endogene Faktoren. Zu den wichtigsten endogenen Faktoren gehört oxidativer Stress, der aus einer Dysbalance zwischen Produktion und Elimination von freien Radikalen resultiert.

Die Theorie der freien Radikale (*free radical theory of aging*) ist ein Erklärungsmodell für das Altern aller Organismen, welches von Harman vor über 50 Jahre entwickelt wurde (Harman 1956). Infolge von Stoffwechselprozessen der Zellen entstehen kontinuierlich freie Sauerstoffradikale (*Reactive oxygen species*, ROS), die umgewandelt und entgiftet werden. Die häufigsten ROS in der Zelle sind Superoxid-Anion ($O_2^{\cdot-}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hydroxylradikal (OH^{\cdot}), welche, neben dem schädlichen Effekt auf die verschiedenen zellulären Komponenten, feinsteuerliche Modulator-Effekte auf mehrere biologische Prozesse, wie die Signaltransduktion, die Proliferation und die Differenzierung haben (Finkel 2011,

Murphy et al. 2011). Ein vorübergehendes und kontrolliertes Generieren der ROS reguliert physiologische Prozesse. Hingegen führt ihre unbalancierte und anhaltende Produktion zu oxidativem Stress.

Oxidativer Stress wurde bereits im Jahr 1977 von Packer und Fuehr mit Seneszenz in Verbindung gebracht. In Experimenten mit humanen Fibroblasten konnte festgestellt werden, dass beim Kultivieren mit niedrigerem Sauerstoffgehalt (10 %) die Seneszenz der Zellen viel später eintrat als bei normalem Sauerstoffgehalt (20 %). Außerdem wurde festgestellt, dass Fibroblasten bei der Kultivierung mit 25 % Sauerstoff wesentlich schneller in den Seneszenzzustand versetzt wurden (Packer und Fuehr 1977).

Das maximale Potenzial der Lebensspanne (*maximum life span potential*, MLSP) ist durch die genetische Information festgelegt, jedoch wird es durch den oxidativen Stress beeinflusst. Die wichtigste physiologische Quelle der ROS sind die Mitochondrien, in denen die zelluläre Atmung stattfindet. In Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass die mitochondriale ROS-Produktion in den Lebewesen mit längerer Lebensspanne niedriger war als in denen mit kürzerer Lebensspanne (Barja et al. 2004).

Zudem wurde gezeigt, dass eine Kalorienrestriktion den Alterungsprozess verlangsamt und das MLSP stimuliert, indem die mitochondriale ROS-Produktion und dementsprechend die schädliche Wirkung abnimmt (Gredilla et al. 2005). In mehreren Publikationen wurde eine hemmende Wirkung der Kalorienrestriktion auf die Entstehung der altersabhängigen Erkrankungen sowie die Verlängerung der Lebensspanne beschrieben (Weindruch und Walford 1988, Mobbs et al. 2007, Arslan-Ergul et al. 2013). Die Hypothese, dass Altern durch die Funktionsminderung des antioxidativen Systems hervorgerufen wird, konnte jedoch nicht bestätigt werden.

In der inneren Membran der Mitochondrien entstehen freie Sauerstoffradikale durch vier Protein-Komplexe (Complex I, II, III und IV). Die meisten Elektronen werden durch die Protein-Komplexe in molekularen Sauerstoff und anschließend in Wasser umgewandelt. Ein kleiner Anteil (1-3%) der Elektronen kann der Elektronen-Transport-Kette entkommen und zur Entstehung von Superoxid-Anion (neue Bezeichnung: Hyperoxid-Anion) führen. Superoxide besitzen die Fähigkeit, durch die Zelle zu diffundieren und mit elektronenreichen Substanzen zu reagieren. Das Superoxyd $O_2^{\cdot-}$ reagiert mit inaktiven Enzymen, die Eisen-Schwefel-Cluster (Fe-S-Cluster) beinhalten, wie Dehydratase und Aconitase. $O_2^{\cdot-}$ wird durch Dismutation zu

H_2O_2 und O_2 entgiftet, was jedoch spontan sehr schnell durch Superoxid-Dismutase (SOD) geschieht. OH^* zeigt eine vielfältige Reaktivität und kann Lipide, DNA und Proteine oxidieren (siehe Abb. 3) (Castello et al. 2010).

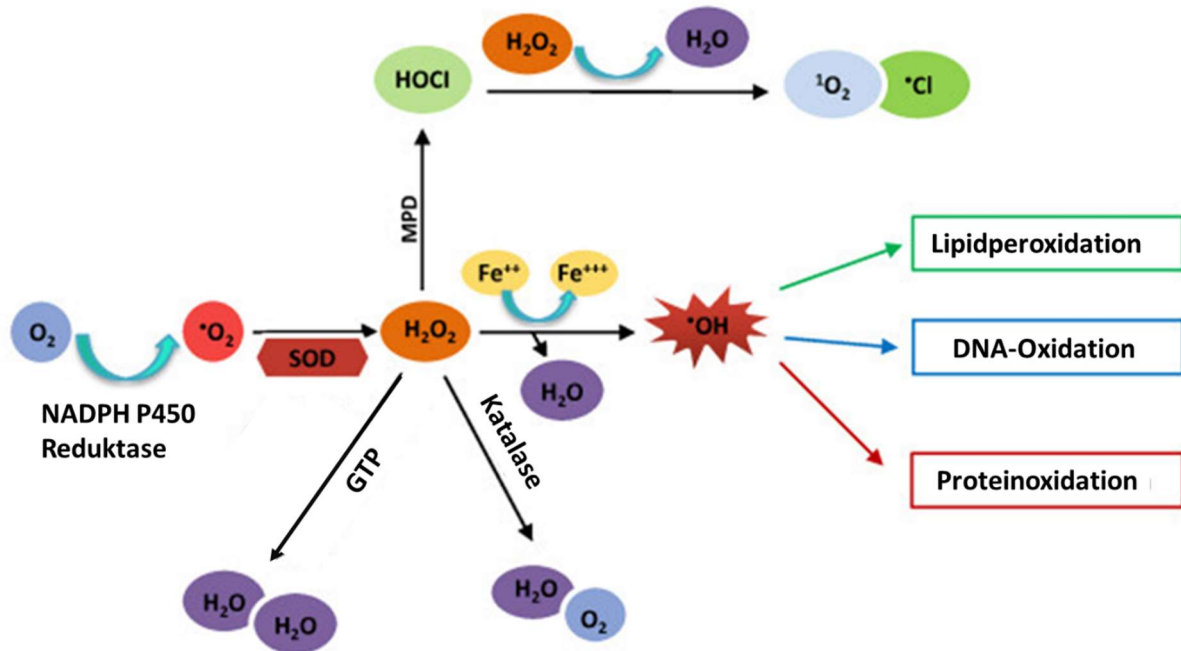


Abb. 3 ROS. Während des aeroben Stoffwechsels wird $\cdot\text{O}_2$ durch SOD in H_2O_2 umgewandelt, das durch glutathionperoxidase (GTP) oder Katalase in Wasser umgewandelt wird. Myeloperoxidase (MPD) konvertiert H_2O_2 zur Hypochlorsäure (HOCL), einem starken Oxidationsmittel. Während Fe^{2+} in Fe^{3+} oxidiert, wird H_2O_2 in das hochreaktive Hydroxylradikal ($\cdot\text{OH}$) umgewandelt. Modifiziert nach Castello et al. 2010.

Die Toxizität der Superoxide ist extrem hoch: das intrazelluläre Level von wenigen Pikomolen ist letal, dagegen können Zellen mehrere Mikromole von Wasserstoffperoxid tolerieren (Gus'kova et al. 1984, Takahashi et al. 1983). Die Aktivität von H_2O_2 ist gegenüber Fe-S-Cluster-haltigen Verbindungen oder Thiolen mit niedrigen pK_s (negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante [K_s]) eingeschränkt. Dennoch ist Wasserstoffperoxid hochreaktiv. Es ist durch seine Reaktivität und höhere Membranpermeabilität diffusionsfähiger als Superoxide.

Wasserstoffperoxid kann weit entfernt von der Stelle, wo es produziert wird, Zielmoleküle erreichen, Signaltransduktionsmechanismen auslösen und sowohl Apoptose als auch nekrotisches Zellsterben induzieren. DNA ist gegenüber H_2O_2 besonders sensibel. Durch eine oxidative Schädigung treten Einzel- und Doppelstrangbrüche (*single-* und *double-strand breaks*) auf, woraus genomische Instabilität und Mutationen entstehen. Die Menge, bei der der

apoptotische Effekt des H_2O_2 in den nekrotischen übergeht, ist vom Zelltyp abhängig. Hierbei konnte ebenso eine Korrelation zwischen dem Anstieg des ROS-Levels und der Seneszenz nachgewiesen werden (Lu und Finkel 2008).

4.6 Abwehrmechanismen gegen oxidativen Stress

Im Normalfall besteht ein Gleichgewicht zwischen oxidativen und antioxidativen Systemen. Diese Balance wird als Redox-Homöostase beziehungsweise Redoxreaktion bezeichnet. Sie wird durch eine chemische Reaktion erreicht, bei der durch Oxidation ROS reduziert wird (Dawane und Pandit 2014). An der Redoxreaktion sind Schlüssel-Effektoren und regulatorische Moleküle, wie Caspase, Protein Kinase B/Akt, FoxO-Transkriptionsfaktoren, Sirtuine, insbesondere Sirt1, und stressaktivierte Kinasen (JNK und p38MAPK) beteiligt (Hampton und Orrenius 1997, Park et al. 2009, Thornton und Rincon 2009).

Oxidativer Stress kann die Aktivität der Sirtuine auf unterschiedlichen Ebenen beeinflussen: Stimulation oder Unterdrückung der Genexpression von Sirtuinen, posttranslationale oxidative Modifikation der Sirtuine, Änderung der Sirtuine-Interaktion und Beeinflussung des NAD-Levels. Der durch Sirt1 blockierte p53-Transkriptionsfaktor beeinflusst wiederum die Aktivität antioxidativer Enzyme, wie SOD2 und GTP (Sablina et al. 2005). Ein anderer Redoxtranskriptionsfaktor, FoxO3a, gehört zu Klasse O der Transkriptionsfaktoren, die sich an spezifische Zielsequenzen binden und dadurch den Zellzyklus, Apoptose, Glukosemetabolismus und die antioxidative Abwehr regulieren. Sirt1 deacetyliert FoxO3a, welches eine antioxidative Antwort über SOD2 und Katalase hervorruft (Brunet et al. 2004, Hasegawa et al. 2008, Wang et al. 2007, Pardo et al. 2011). Andererseits können die FoxO-Proteine direkt durch oxidativen Stress aktiviert werden und den Abbau von reaktiven Sauerstoffradikalen über MnSOD induzieren (Haung und Tildall 2007). Bei Experimenten an Affen wurden in den Herzen von älteren Tieren ein dreifach erhöhtes Sirt1-Levels im Vergleich zu jüngeren Tieren festgestellt (Alcender et al. 2007).

Aus einem zu hohen H_2O_2 -Level, das die Ursache für Apoptose darstellt, resultiert der proteasomale Abbau und die Enzyminaktivierung von Sirt1 (Yang et al. 2007). In einem Experiment wurden humane Monozyten 24 h lang mit $250 \mu M H_2O_2$ inkubiert. Anschließend konnte eine reduzierte Aktivität sowie eine reduzierte Gen- und Proteinexpression von Sirt1

nachgewiesen werden (Kreutzenberg et al. 2010). Gleiche Ergebnisse zeigten sich in Lungenepithelzellen, die mit H₂O₂, Acrolein und Zigarettenrauchextrakt inkubiert wurden (Caito et al. 2010).

Die posttranslationale Modifikation von Sirtuinen erfolgt durch die Phosphorylierung der C- und N-terminalen Domänen. Diese Phosphorylierung wird durch Kinasen, wie CDK1 und CKII, durchgeführt, deren Aktivität von oxidativem Stress beeinflusst wird (Sasaki et al. 2008, Kang et al. 2009, Kim et al. 2012).

Das NAD-Level, welches in zunehmendem Alter, bei Adipositas und bei anderen metabolischen Krankheiten abnimmt (Yoshino et al. 2011), ist der wichtigste Faktor für die Regulation der Sirtuine. Es hat sich gezeigt, dass die Inkubation mit NAD-Präkursoren, wie Nicotinamid-Mononukleotid und Nicotinamid-Ribosid, die Entstehung der altersabhängigen und metabolischen Krankheiten, einschließlich Glukoseintoleranz, verhindert (Cantò et al. 2012, Bai et al. 2011).

FoxO-Transkriptionsfaktoren, Histone, p53, p73, NF-κB sowie weitere Proteine werden von Sirtuinen deacetyliert. Somit werden die Transkription, die Apoptose und metabolische Prozesse der Zellen beeinflusst. Eine FoxO-abhängige Steigerung der Gluconeogenese wurde in Zellen nach einer Resveratrol-Inkubation nachgewiesen (Frescas et al. 2005).

Neben der Förderung der Apoptose spielen FoxOs eine wichtige Rolle für das Überleben der Zellen sowie bei der Transaktivierung der ROS-detoxifizierenden Enzyme, wie Superoxid-Dismutase 2 (SOD2/MnSOD) und Katalase, indem FoxOs freie-Radikal-Scavenger-Enzyme hochregulieren (Huang und Tindall 2007). Die Balance zwischen der FoxO-Funktion und dem oxidativen Stress sowie der Apoptose wird durch Sirt1 reguliert, indem Sirt1 an FoxO bindet und diesen deacetyliert (Greer und Brunet 2005). Dabei ist entscheidend, ob die Zelle infolge des oxidativen Stresses abstirbt oder diesen erfolgreich abwehrt (siehe Abb. 4).

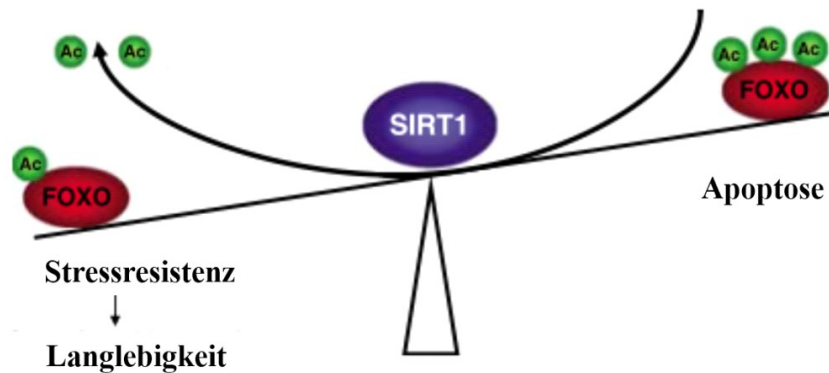


Abb. 4 Schematische Darstellung des Antioxidativen Systems. Sirt1 deacetyliert FoxO und fördert Stressresistenz um Apoptose zu verhindern. Modifiziert nach Greer und Brunet 2005.

Dies geschieht einerseits durch einen FoxO-bedingten suppressorischen Effekt auf die Gluconeogenese, wodurch die während der zellulären Atmung entstehenden ROS reduziert werden und andererseits durch die dem Insulineffekt entgegenwirkenden FoxOs, die den PI3K-Signalweg aktivieren. Dadurch wird die Progression des Zellzyklus inhibiert. Der FoxO-induzierte Zellzyklusarrest wird über Zellzyklusregulatoren, wie p27, pRb und Cyclin D herbeigeführt. Auf diese Weise werden Zellen und Organismen durch FoxO an den Nahrungsmangel gewöhnt.

Die zelluläre Antwort auf FoxO ähnelt derjenigen von p53. Die beiden eingeleiteten Signalwege führen zum Zellzyklusarrest oder zur Apoptose, abhängig vom zellulären Stress-Level und dem Zelltyp. Der von FoxOs eingeleitete Zellzyklusarrest erfolgt durch die Regulation von p27 (Medema et al. 2000). Wird der Zellzyklusarrest hingegen durch p53 eingeleitet, kommt es zu einer Aktivierung von p21 (El-Deiry et al. 1993). Beide CKI üben aber die gleiche Wirkung auf den Zellzyklus aus. Es wurde beschrieben, wie in HDFs (*human dermal fibroblast*) die Herunterregulation der FoxO3a-Expression die Seneszenz beschleunigt (Kim et al. 2005).

4.7 Antioxidativer Schutz

Das antioxidative System (*antioxidant defense system*), der Abwehrmechanismus gegen oxidativen Stress, dient dazu, die schädliche Wirkung der ROS zu neutralisieren und der

Entstehung von Tumoren und altersabhängigen Krankheiten vorzubeugen. Es fördert zudem das gesunde Zellwachstum, wirkt gegen prämaturre Alterung und trägt zur Unterstützung der Immunität bei. Die zum Redoxsystem beitragenden Substanzen werden in zwei Kategorien aufgeteilt: enzymatische und nicht-enzymatische (siehe Tab. 1). Außerdem werden Antioxidantien in Nahrungsderivate, endogene und metallbindende Proteine unterteilt.

Den größten Anteil am antioxidativen Schutzsystems hat SOD (drei Formen: CuZn-SOD, Mn-SOD, EC-SOD). Durch SOD werden hauptsächlich Superoxide neutralisiert. Dabei entstandenes H₂O₂ wird durch Glutathion Peroxidase (GTP), Katalase, und Peroxiredoxin (PRX) in Wasser umgewandelt.

Tab. 1 Aufteilung der Antioxidantien

Enzymatische Antioxidantien	Nicht-enzymatische Antioxidantien
Superoxid-Dismutase (SOD)	Vitamin A (Alle trans Retinol 2)
Katalase (CAT)	Vitamin C (Ascorbinsäure)
Glutathion Peroxidase (GTP)	Vitamin E (α -Tocopherol)
Thioredoxin (TRX)	Glutathione (GSH)
Peroxiredoxin (PRX)	β -Carotine, Tripeptide und andere Substanzen mit antioxidativen Aktivität
Glutathion Transferase (GST)	

Thiol-Verbindungen, wie TRXs (TRX1 und TRX2), Thioredoxin Reductase (TRRs), PRX und Glutaredoxine, gehören zu den enzymatischen Antioxidantien, welche der Erhaltung der Redox-Homöostase dienen. Diese sind sowohl im Zytosol als auch in Mitochondrien zu finden, deren Funktion im Reduzieren von H₂O₂ und Lipid-Hydroperoxiden besteht, die durch die Peroxidation der Membran-Lipide generiert werden. Das endogen-produzierte H₂O₂ wird hauptsächlich durch PRX neutralisiert, bei einer Überproduktion wird es dagegen von GTP und CAT entgiftet. In Experimenten an PRX-*knockout*-Mäusen wurden eine erhöhte oxidative Schädigung, eine höhere Krebsinzidenz sowie eine geringere Lebensspanne nachgewiesen (Neumann et al. 2003). Zudem wurde ein Auftreten der hämolytischen Anämie beschrieben (Lee et al. 2003). Dieser Phänotyp trat jedoch bei GTP- und CAT-*knockout*-Mäusen nicht auf.

N-(2-mercaptopropionyl)-glycin (NMPG) ist eine synthetische Thiol-Verbindung mit der Fähigkeit, ROS zu bekämpfen. Am Tiermodell wurde eine positive Wirkung von NMPG auf H₂O₂-induzierte Myokardschäden nachgewiesen (Canton et al. 2004).

Zu den nicht-enzymatischen Antioxidantien gehören Verbindungen mit niedrigem Molekulargewicht, wie die Vitamine C und E, β -Carotine, GSH und Tripeptide (L- γ -Glutamyl-L-Cysteinyl-L-Glycine), die zusätzlich noch in endogene und exogene Antioxidantien aufgeteilt werden. Der größte Teil der extrazellulären endogenen Antioxidantien befindet sich im Plasma als metallbindende Transport-Proteine, wie Zelluloplasmin, Transferin, Hepatoglobulin und Albumin. Sie binden mit Metallen und wirken den durch deren Katalyse entstandenen freien Radikalen entgegen.

Das lipidlösliche α -Tocopherol (Vitamin E) gehört zu den intrazellulären endogenen Antioxidantien. Es ist an der inneren hydrophobischen Seite der Zellmembrane konzentriert und schützt die Membran gegen radikalbedingte Schädigungen. Elektronen, die durch Lipid-Peroxidation entstanden sind, werden zu Peroxylradikale umgewandelt. Vitamin-E-Derivate besitzen regenerative und neuroprotektive Fähigkeiten. In der Synergie mit Liponsäure reduzieren sie oxidative Schädigungen bei kardialer Ischämie. Vitamin-E-Derivate, einschließlich Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure), werden wegen ihres antioxidativen und antiinflammatorischen Effekts immer häufiger in der Forschung und zu klinischen Zwecken verwendet. Es ist ebenfalls bekannt, dass Trolox einen modulatorischen Effekt bei Multipler Sklerose hat.

5. Zielstellung

Ziel dieser Arbeit ist die Erforschung der ROS-abhängigen Prozesse bei der Alterung von ASCs. Die Bestimmung der Proliferationsmarker und die Identifizierung von Seneszenzmarkern in den ASCs sollen zu einem besseren Verständnis des Seneszenzmechanismus beitragen. Proliferations- und Seneszenzmarker sollen in Zellen von Spendern unterschiedlicher Altersgruppen (ASCj, ASCa) identifiziert und miteinander verglichen werden. Eine weitere Aufgabe im Rahmen dieser Arbeit ist die Untersuchung der Alterung von ASCs in Zellkultur (P6, P16).

Das Ziel der Arbeit besteht in den folgenden Punkten:

- Die Gewinnung der ASCs von Fettgewebe.
- Die Charakterisierung der ASCs anhand der stammzellassoziierte Marker CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166 und der drei negativen Marker CD31, CD34, CD133.
- Die Untersuchung der Abhängigkeit der Zellproliferation vom Alter der Spender, von der Zelldichte und der Passagenzahl. Dies erfolgte anhand der Proliferationsmarker Ki76, p21 und p27.
- Die Identifizierung von Seneszenz anhand der Seneszenzmarker SA- β -Galactosidase-Aktivität, Sirt1, FoxO3a. Der Vergleich der ASCs von Spendern unterschiedlichen Alters und in unterschiedlichen Passagen.
- Die Untersuchung der Korrelation von Seneszenzmarkern mit der Zellproliferation und der ROS-Bildung.
- Die Untersuchung des Einflusses von exogenem ROS auf die Expression von Seneszenzmarkern und die Zellproliferation.
- Die Untersuchung des Einflusses von Radikalfängern auf die Expression von Seneszenzmarkern und die Zellproliferation.

6. Methodik

6.1 Isolierung der ASCs

Die ASCs wurden nach dem Bunnell-Protokoll isoliert (Bunnell et al. 2008). Das zur Isolation humaner ASCs verwendete Fettgewebe stammt aus Liposuktionen (siehe Abb. 5 A). 200 ml Fettgewebe wurden in sterilem PBS mit 0,5 % Pen/Strep resuspendiert. Die Materialien sind im Anhang aufgelistet. Der enzymatische Aufschluss des Gewebes erfolgte mit 4 mg/ml Kollagenase für 60 min bei 37° C (siehe Abb. 5 B), welche die Dissoziation der extrazellulären Matrix ermöglicht. Anschließend wurde die Wirkung der Kollagenase mit einem DMEM-Komplettmedium 1:2 aufgehoben.

Die Zellsuspension wurde in 50 ml Reaktionsgefäße überführt (siehe Abb. 5 C) und 10 min lang bei 500 x g zentrifugiert. Das Sediment wurde in DMEM-Komplettmedium resuspendiert, durch ein Zellsieb (40 µm) filtriert (siehe Abb. 5 D) und 10 min lang bei 500 x g zentrifugiert.

Das daraus resultierende Sediment wurde in Lysepuffer resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert (siehe Abb. 5 E). Anschließend wurde es mit PBS + Pen/Strep gewaschen und 5 min lang bei 500 x g zentrifugiert. Diese Zellsuspension wurde in DMEM-Komplettmedium resuspendiert und auf mit 0,1 % Gelatine beschichteten 6-Well-Platten ausplattiert (siehe Abb. 5 F).

Für die Experimente wurden Zellen verwendet, die von gesunden weiblichen Spendern liposukturiert wurden, deren Alter zum Zeitpunkt der Entnahme des Fettgewebes zwischen 25 und 60 Jahren lag. Die Vota der Ethikkommission zur Forschung an aus Fettgewebe isolierten mesenchymalen Stammzellen befinden sich im Anhang.

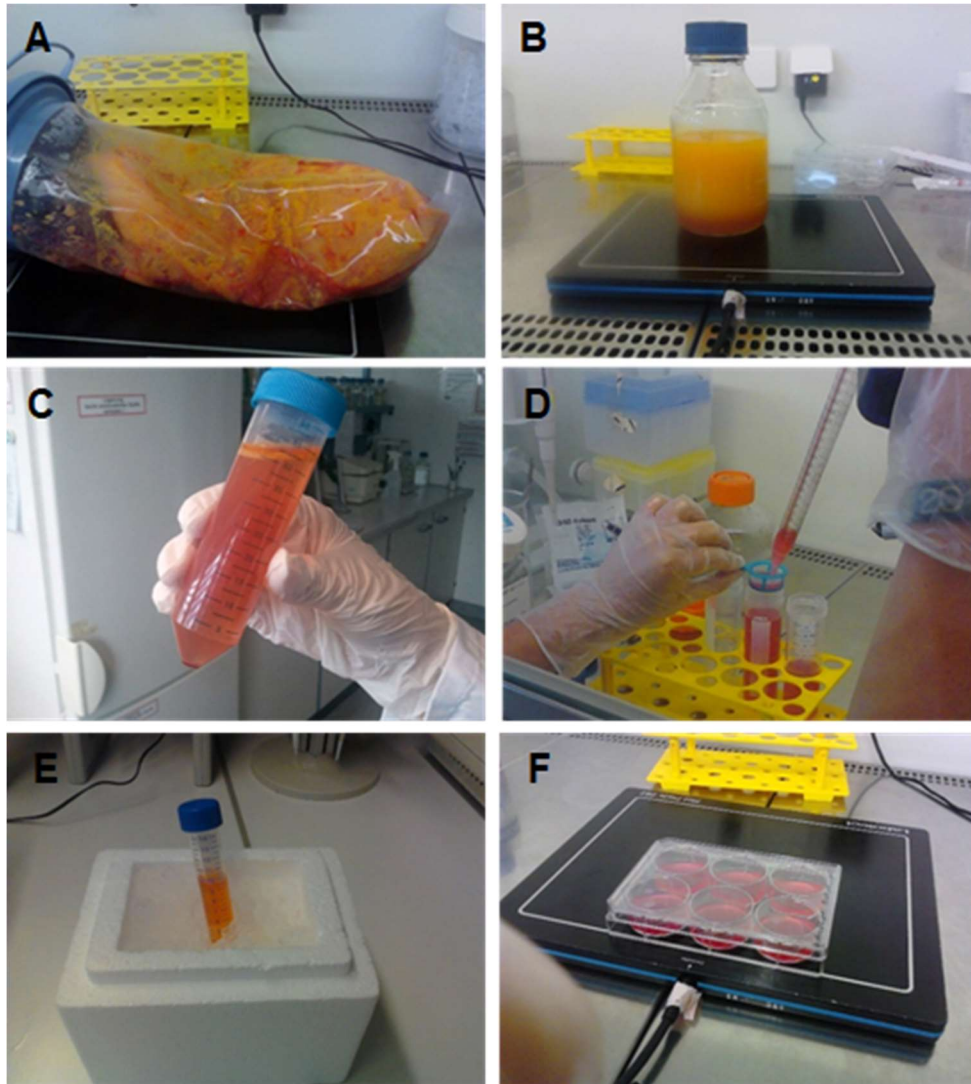


Abb. 5 Isolierung der ASCs. A: Durch Liposuktion gewonnenes Fettgewebe. B: Enzymatischer Aufschluss durch Zugabe von Kollagenase. C: Überführung in das Reaktionsgefäß. D: Filtrieren mit Zellsieb. E: Inkubation mit Lysepuffer auf Eis. F: Ausplattieren in 6-Well-Platten.

6.2 Kultivierung der ASCs

Die Zellen wurden in mit 0,1 % Gelatine beschichteten Zellkulturflaschen bei 37°C und 5 % CO₂ in Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte alle zwei Tage.

Bei einer Konfluenz von 80 % wurden die adhären gewachsenen Zellen mit Trypsin/EDTA dissoziiert, danach wurde im Verhältnis 1:2 ein DMEM- Kompletmedium zugegeben und 4 min lang bei 220 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml

DMEM- Kompletmedium resuspendiert. Die Zellen in der Zellsuspension wurden mittels Neubauer-Zählkammer gezählt. Die benötigte Menge der Zellsuspension wurde in T25-Zellkulturflaschen mit je 4 ml Medium überführt. Die T25-Zellkulturflaschen waren mit 0,1 % Gelatine beschichtet.

Bei dem Einfrieren der ASCs wurde das Zellpellet mit 1 ml Einfriermedium resuspendiert und in Cryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden einen Tag lang bei -80° C, danach bei -150°C in einem Container mit flüssigem Stickstoff gelagert.

Beim Auftauen wurden eingefrorene Zellen aus dem Stickstoff-Container entnommen und auf Eis gestellt. Die Zellsuspension wurde in Reaktionsgefäße mit 10 ml 37°C warmen DMEM-Kompletmedium überführt und 4 min lang bei 220 x g zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet mit 1 ml DMEM- Kompletmedium resuspendiert und die Zellen abschließend wie oben beschrieben kultiviert.

6.3 Durchflusszytometrie

Alle isolierten ASCs wurden bis Passage 3 kultiviert und zur Charakterisierung auf stammzellosoziierte Marker (CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166) und drei negative Marker (CD31, CD34, CD133) am Durchflusszytometer FACS Calibur (*fluorescence-activated cell sorting*) untersucht. Diese Methode ermöglicht es, die Ergebnisse zu quantifizieren, indem Zellen durch hydrodynamische Fokussierung einzeln und hintereinander durch die Flusszelle geleitet und von einem Laser bestrahlt werden. Dabei wird das von markierten Zellen erzeugte Fluoreszenzsignal photometrisch detektiert.

Für die Untersuchung wurden ASCs mit Trypsin/EDTA dissoziiert. Auf die dissoziierten Zellen wurde DMEM- Kompletmedium gegeben (1:2) und 4 min lang bei 150 x g zentrifugiert. Nach Zugabe von PBS wurde das Zellpellet erneut zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 3 ml PFA (4 %) resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Danach wurde es dreimal mit PBS gewaschen. Auf das Zellpellet wurde FACS-Puffer (2 % FBS in PBS) gegeben und alles in Eppendof-Tubes aufgeteilt. Nach dem Zentrifugieren (3 min lang bei 150 x g und 4°C) wurde der Überstand abpipettiert, das Zellpellet mit primärer Antikörper-Lösung (1:100 in FACS-Puffer) resuspendiert und 1 h lang bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Im nächsten

Schritt wurden die Zellen dreimal gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpern (PE oder Cy3, entsprechend der primären Antikörper. Siehe Tab. 2) beladen. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur (RT) wurden die Zellen dreimal gewaschen und in FACS-Röhrchen überführt.

Tab. 2 Sekundäre Antikörper entsprechend der primären Antikörper

Primäre Antikörper	Sekundäre Antikörper
CD29	Cy3
CD44	Cy3
CD73	PE
CD90	Cy3
CD105	PE
CD166	PE
CD31	PE
CD34	Cy3
CD133	Cy3

Die Messungen und die Auswertung erfolgten am FACS Calibur. Die Auswertung erfolgte durch das Überlagern der Negativkontrolle mit der sekundären Antikörper-Kontrolle (siehe Abb. 6).

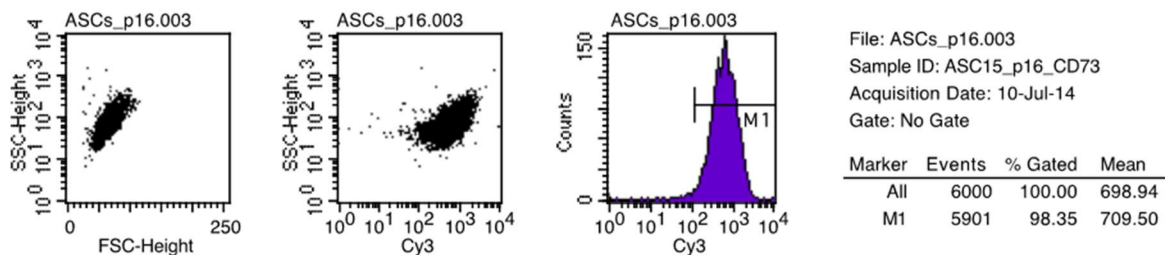


Abb. 5 Beispielhafte Auswertung der Durchflusszytometriergebnisse am FACS Calibur. Untersucher Marker CD73 bei ASCj in P16.

Um die Zellen hinsichtlich der Alterungsmerkmale vergleichen zu können, wurden ASCs in zwei Gruppen aufgeteilt: ASCj (Spender waren zum Zeitpunkt der Liposuktion jünger als 35 Jahre) und ASCa (Spender waren zum Zeitpunkt der Liposuktion älter als 55 Jahre) (siehe Tab.

3). In weiteren Versuchen wurde die Markerausdrückung der ASCs bei der Alterung in Zellkultur untersucht. Die Untersuchungen erfolgten in Passage 6 (P6) und in Passage 16 (P16). Für die Charakterisierung wurden drei typischen Stammzellmarker, CD73, CD90 und CD105, sowie ein negativer Marker (CD34) ausgewählt.

Tab. 3 Verwendete ASCs

ASCs	laborinterne Bezeichnung	Alter zum Zeitpunkt der Liposuktion	Körperstelle des entnommenen Fettgewebes	Geschlecht
ASCj	ASC 5	27	Ober- und Unterschenkel	♀
	ASC 15	24	Oberschenkel	♀
	ASC 16	25	Oberschenkel	♀
	ASC 36	30	Bauch	♀
	ASC 39	31	Oberschenkel	♀
ASCa	ASC 20	57	Oberschenkel	♀
	ASC 23	56	Oberschenkel	♀
	ASC 24	59	Oberschenkel	♀
	ASC 26	57	Oberschenkel	♀
	ASC 41	58	Oberschenkel	♀

6.4 cLSM – *confocal Laser Scanning Microscope*

Am cLSM erfolgte die Detektion folgender Methoden: Immunocytochemie (ICC), Messung der intrazellulären Sauerstoffradikale (ROS-Messung), Letalitätssmessung durch Ethidium-Homodimer-2 (EthD-2) und Seneszenz-assoziierte β -Galactosidase-Aktivität mittels *Quantitative Cellular Senescence Assay Kit*.

Über das Objektiv wird der vom Laser ausgehende Lichtstrahl auf das Präparat ausgerichtet. Dadurch werden die Fluorophore zur Fluoreszenzmission angeregt. Das Objektiv bündelt die

Fluoreszenzstrahlung und leitet diese über die Farbteiler, das *Detector Pinhole* und die Emissionsfilter zum *Photomultiplier* zur Detektion weiter. Eine Besonderheit des cLSM gegenüber gewöhnlichen Lichtmikroskopen besteht in der ausschließlichen Fokussierung eines kleinen Objektausschnitts. Lediglich in diesem und nicht im gesamten Objekt wird eine Wechselwirkung erzeugt. Das Objekt kann jedoch schrittweise mithilfe zweier x/y Scannern abgerastert werden. So ist es möglich, eine einzige Objektebene eines dreidimensionalen Objekts darzustellen und mehrere dieser Darstellungen mit einer Software zu einem Bildstapel zusammenzufügen. Der Vorteil dieser Methode gegenüber herkömmlichen Techniken der Mikroskopie besteht darin, auch Prozesse an lebenden Organismen und Systemen untersuchen zu können.

Die verwendeten Laser mit den entsprechenden Anregungswellenlänge sowie die Einstellungen der Emissionsdetektion der jeweiligen Messungen sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tab. 4 cLSM510meta® Einstellungen für die Messungen

Fluoreszenzfarbstoffe	Laser / Anregungs- /Emissionsmaxima	Detektionsbereich der Emission [nm]
DAPI	Diode / 405 nm	405
H ₂ DCFDA-AM, SA-β-gal	Argonlaser / ~488/505 nm	505-570
EthD-2, Cy3	Helium/Neon-Laser / ~535/624 nm	550-563

6.4.1 Immunozytochemie (ICC)

Mittels ICC wurde der Proliferationsmarker Ki67 untersucht, welcher im Zellzyklus in der G₁-S-, G₂- und in der M-Phase exprimiert wird. Ruhende Zellen, die sich in der G₀-Phase befinden, exprimieren das Ki67-Antigen nicht.

Zuerst wurden ASCs von beiden Gruppen in P6 und P16 mit unterschiedlicher Zellzahl pro cm² (2 x 10³, 4 x 10³, 1 x 10⁴ und 2 x 10⁴) ausplattiert, um den Einfluss der Zelldichte auf die Proliferation zu untersuchen und eine optimale Zelldichte festzustellen. Die Zellzahl wurde mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Für die weitere ICC-Untersuchungen wurde die Zellzahl 1×10^4 Zellen/cm² verwendet und die Gruppen beziehungsweise Passagen miteinander verglichen.

Um die Wirkung von Wasserstoffperoxid beziehungsweise der Radikalfänger auf die Proliferation zu untersuchen, wurden Zellen für 2 h mit den jeweiligen Substanzen inkubiert. Als Radikalfänger wurden NMPG (100µM) und Trolox (100µM) verwendet. Da Trolox in DMSO gelöst wurde, diente 0,1 % DMSO als Lösungsmittelkontrolle.

Nach der Inkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen; zum Fixieren wurden 500 µl Methanol/Aceton (7:3) zugegeben. Die Inkubation erfolgte bei -20°C für 1 h. Nach dreimaligem Waschen erfolgte das Permeabilisieren mit 1 % PBS-T bei RT für 10 min. Als Block-Lösung wurde 10 % Milch in 0,01% PBS-T verwendet. Die Inkubation fand bei RT statt. Die Block-Lösung wurde nach 30 min abgenommen und die Zellen mit 0,01 % PBS-T gewaschen. Nach einstündiger Inkubation bei RT mit dem primären Antikörper (1:100 in 10% Milch) wurden die Zellen dreimal gewaschen. Die Inkubation mit dem Sekundären Antikörper Cy3 (1:200 in 10 % Milch) sowie mit Dapi (1:1000) zur Visualisierung des Zellkerns erfolgte bei RT für 1 h (siehe Tab. 5).

Tab. 5 ICC-Protokoll für Ki67

Fixierung	Permeabilisierung	Blocken	Primärer AK	Sekundärer AK
Methanol/Aceton 7:3 1 h, -20° C	1 % PBS-T 10 min, RT	10 % Milch in 0,01 PBS- T 20 min, RT	Ki67 1:100 in 10 % Milch 1 h, RT	Cy3 1:200 + Dapi 1:1000 in 10 % Milch 1 h, RT

Die Messung fand am cLSM510meta statt. Für die Auswertung wurden 150-200 Zellen ausgezählt und davon prozentuale Anteile der Ki67-positiven Zellen errechnet.

6.4.2 ROS-Messung

Um den Unterschied des ROS-Gehalts zwischen den Zellen feststellen zu können, wurde die Messung der intrazellulären Sauerstoffradikale verwendet. Hierbei kam der Fluoreszenzfarbstoff H₂DCFDA-AM (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate) zum Einsatz, welcher zellpermeabel ist. Durch intrazelluläre Esterasen wird der Acetat-Rest abgespalten. Intrazelluläre freie Radikale oxidieren nicht-fluoreszierenden H₂DCFDA zu stark fluoreszierendem DCF.

ASCj und ASCa wurden in P6 und P16 dissoziiert, zentrifugiert, auf die mit 0,1 % Gelatine beschichteten 24-Wellplatten mit 1×10^4 Zellen/cm² ausplattiert und für 24 h kultiviert. Das Medium wurde abgenommen, 1 ml warmes DMEM-Komplettmedium mit einer Konzentration von 0,1 % H₂DCFDA-AM-Farbstoff zugegeben und 10 min lang im Brutschrank inkubiert. Das farbstoffhaltige Medium wurde abgenommen und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Für die Auswertung wurde durch die Negativkontrolle der untere Schwellenwert (*low threshold*) festgelegt.

6.4.3 Letalitätsmessung

Um eine Aussage hinsichtlich der H₂O₂-konzentrationsabhängigen Letalität der ASCs und der Abhängigkeit von der Alterung in der Zellkultur treffen zu können, wurde Ethidium-Homodimer-2 (EthD-2) verwendet. EthD-2 ist nicht membranpermeabel und kann nur in Zellen gelangen, deren Membran nicht mehr intakt ist. Dort erhöht EthD-2 durch Bindung mit DNA seine Fluoreszenzintensität. Folglich kann seine Fluoreszenz in den letalen Zellen detektiert werden.

Die ASCs mit der Zellzahl 1×10^4 Zellen/cm² wurden auf die mit 0,1 % Gelatine beschichteten 24-Well-Platten ausplattiert. P6- und P16-Zellen beider Gruppen wurden nach 24 h Kultivierungszeit mit verschiedenen H₂O₂ Konzentrationen (10 µM, 1 µM, 500 nM, 250 nM und 100 nM) für 1,5 h inkubiert. Anschließend wurden 2 µM/ml von einer 1 mM EthD-2-Stammlösung (in DMSO) in das Medium mit Wasserstoffperoxid zugegeben und für weitere

30 min inkubiert. Für die Auswertung wurden 100-150 Zellen ausgezählt und der prozentuale Anteil der letalen Zellen berechnet.

6.4.4 Messung der SA- β -Galactosidase-Aktivität

Die Aktivität der SA- β -Galaktosidase wurde mittels *Quantitative Cellular Senescence Assay Kit (SA- β -gal, Fluorometric)* gemessen. Der Farbstoff ist membranpermeabel, jedoch zuerst nicht fluoreszierend. Nach der Hydrolyse des Galactosyl-Restes emittiert grüne Fluoreszenz, welche in der Zelle begrenzt bleibt. Die Färbung wurde nach dem CELL BIOLABS, INC.-Protokoll durchgeführt (Campisi 2000).

Die Zellen der beiden Gruppen (ASCj, ASCa) wurden dissoziiert, zentrifugiert und auf die mit 0,1 % Gelatine beschichteten 24-Well-Platten mit 1×10^4 Zellen/cm² ausplattiert. Nach 24-stündiger Kultivierung mit DMEM-Komplettmedium wurde das Medium abgenommen und durch Medium mit H₂O₂ beziehungsweise mit Radikalfängern ersetzt. Nach zweistündiger Inkubation wurde *1 x Cell Pretreatment Solution* im Verhältnis 1:1000 dem Medium zugegeben und die Zellen damit 2 h lang bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde *200 x SA- β -Gal* im Verhältnis 1:200 mit dem Medium den Zellen zugegeben. Die Zellen wurden mit der Substratlösung über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen, bevor die Messung durchgeführt wurde. Anschließend wurden die Zellen gezählt und der prozentuale Anteil der SA- β -Gal-positiven Zellen berechnet.

6.5 Semiquantitative PCR

6.5.1 RNA-Isolation

Zur RNA-Isolation wurde das RNeasy® Mini Kit verwendet. Die Zellen der beiden Gruppen, sowohl unbehandelt als auch behandelt (mit Wasserstoffperoxid und Radikalfängern), wurden dissoziiert, einmal mit PBS gewaschen, das Zellpellet mit 350 μ l Lyselösung (1ml RLT-Puffer

+ 10 µl 2-Mercaptoethanol) in ein Kit-Reaktionsgefäß überführt und 2 min lang bei 8000 x g zentrifugiert. Auf das Zentrifugat wurden 350 µl 70 %-iger Ethanol zugegeben, resuspendiert, in eine neue RNeasy Spin Säule überführt und 15 s lang bei 8000 x g zentrifugiert. Auf die in der RNeasy Spin Säule verbliebenen Zellbestandteile wurden 700 µl RW1-Puffer gegeben und 15 s lang bei 8000 x g zentrifugiert. Danach wurde 500 µl RPE-Puffer zugegeben und 15 s lang bei 8000 x g zentrifugiert. Der Schritt wurde wiederholt, wobei die Zentrifugation nur noch 2 min dauerte. Als letztes wurden 25 µl RNase-freies Wasser zugegeben und 1 min lang bei 8000 x g zentrifugiert. Die Schritte sind schematisch in Abbildung 7 dargestellt. Die Proben wurden bei -80°C eingefroren.

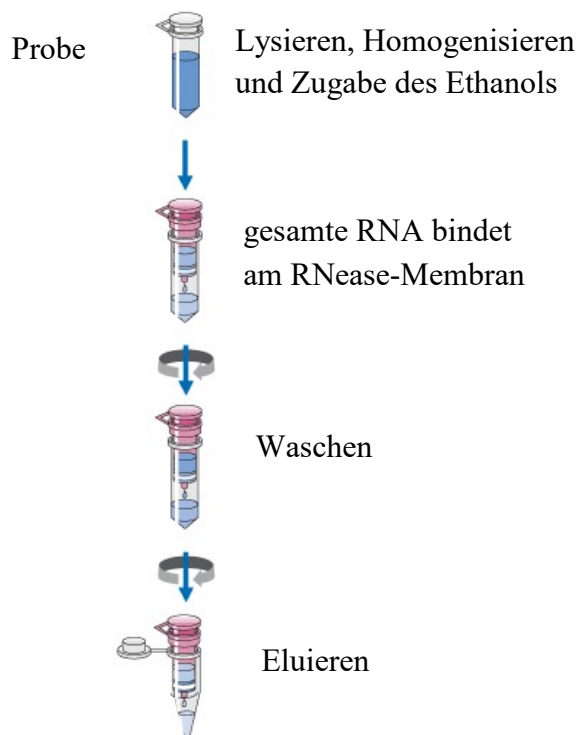


Abb. 6 RNA-Isolation mittels RNeasy® Mini Kit. Schritte der RNA-Isolation. (*RNeasy Mini Handbook* 2019).

6.5.2 cDNA-Synthese

Um aus der isolierten RNA cDNA herstellen zu können, wurde zunächst die in der Probe vorhandene RNA-Konzentration am UV/VIS-Spektralphotometer (Nanodrop) gemessen. Dies erfolgte bei einer Absorption von 260 nm. Es wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt,

der Mittelwert bestimmt und dieser als Ausgangskonzentration zur Berechnung der für die cDNA-Synthese notwendigen Menge verwendet. Es wurde eine Konzentration von 1 µg / 10 µl RNase freiem Wasser eingesetzt. Die Reverse Transkription wurde gemäß den Schritten in Tabelle 6 durchgeführt.

Tab. 6 Schritte der cDNA-Synthese

Zugegebene Reagenz	Inkubation
1 µl DNase I Reaction Buffer (10x) 1 µl DNase I	15 min bei RT
1 µl EDTA (25 mM) 1 µl Randomprimer (250 ng) 1 µl dNTP-Mix (10 mM)	5 min bei 65°C
4 µl First-strand Puffer (5x) 2µl DTT (0,1 M) 1 µl RNase freies Wasser	2 min bei 37°C
1 µl M-MLV-Rtase	10 min bei 25°C 50 min bei 37°C 15 min bei 70°C

6.5.3 PCR-Gelelektrophorese

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ermöglicht die Amplifizierung der spezifischen DNA-Sequenzen. Mittels PCR-Gelelektrophorese wurde die mRNA-Expression der Proliferationsmarker p27 und p21 sowie der Seneszenzmarker Sirt1 und FoxO3 untersucht. Dazu wurde der folgende Reaktionsmix hergestellt: 5 µl Red Load Taq Master, 2 µl Primermix (bestehend aus Rückwärts- und Vorwärts-Sequenz des jeweiligen Primers), 17 µl RNase-freies Wasser und 1 µl cDNA. Als *housekeeping*-Gen wurde GUSP verwendet.

Nach initialer Denaturierung bei 94°C für 2,5 min liegen von dem zu verwendenden DNA-Doppelstrang Einzelstränge vor. Anschließend folgt die Hybridisierung (*annealing*) der Primer mit den komplementären DNA-Zielsequenzen. Die Hybridisierungstemperatur und Zyklenzahl sind von der Sequenz der Primer abhängig (siehe Tab. 7). Anschließend erfolgte die Elongation bei 72°C für 30 s. Die Wiederholung des Amplifizierungszyklus ermöglicht es, die Zahl der

PCR-Amplifikate zu multiplizieren. Allerdings besteht die Gefahr, dass bei zu hoher Anzahl der Amplifizierungszyklen die Sättigung der PCR-Amplifikate erreicht wird, wodurch der Unterschied zwischen den Proben nivelliert würde.

Tab. 7 Hybridisierungstemperatur und Zyklenzahl der Primer-Paare

Primer	Hybridisierungstemperatur	Zyklenzahl
p27	59°C	29
p21	58°C	29
Sirt1	61°C	35
FoxO3a	61°C	33
GUSP	60°C	39

Die Auftrennung der PCR-Amplifikate erfolgte in einem 2%-igen Agarosegel, dem Ethidiumbromid zugesetzt wurde, für 45 min bei einer Spannung von 110 V. Die Banden wurden bei UV-Licht an der Gel-Dokumentationsanlage G:BOX EF® visualisiert und aufgenommen (siehe Abb. 8).



Abb. 7 Repräsentative Aufnahme der mRNA-Expressionanalyse anhand der G:BOX EF®. GUSP

6.5.4 Semiquantitative Kalkulation der relativen mRNA-Expression

Die Auswertung der PCR-Gelelektrophorese wurde anhand der Intensitätsmessung der detektierten Banden mittels GeneSnap durchgeführt.

Die ermittelten Banden-Intensitäten wurden im Anschluss zur Berechnung der relativen Genexpression verwendet. Hierbei wurde das Verhältnis der Bandenintensitäten des Zielgens

und der entsprechenden Bandenintensitäten des Referenzgens (*housekeeping-Gen* GUSP) bezüglich der gleichen Kondition bestimmt.

$$\text{relative mRNA – Expression} = \frac{\text{Banden – Intensität}_{\text{Zielgen}}}{\text{Banden – Intensität}_{\text{Referenzgen}}}$$

6.6 Statistik

Zur Auswertung der Aufnahmen, welche mittels des cLSM510meta gewonnen wurden, wurde die Software LSM Image Examiner (Carl Zeiss) verwendet.

Die Auswertung der Durchflusszytometrie erfolgte mittels der Software Cell Quest Pro (Becton Dickenson, Deutschland).

Die statistische und graphische Auswertung aller Daten erfolgte mit der Software SigmaPlot 12.0 von Synstat. Für die Signifikanzbewertung wurden anhand der Mittelwerte, Standardfehler und Anzahl der Versuche mit unterschiedlichen biologischen Replikaten der t-test beziehungsweise One Way ANOVA, Dunnett verwendet.

Die Auswertung der RNA-Expression erfolgte nach der Gel-Dokumentation mit der Software GeneSnap beziehungsweise GeneTools von Syngene.

7. Ergebnisse

7.1 Charakterisierung der ASCs

Für die Charakterisierung der ASCs wurden die vom ISCT festgelegten Minimalkriterien verwendet, um alle isolierten Zellen als adulte fettabgeleitete Stammzellen zu identifizieren. Dafür wurden in P3 die stammzellassozierten Marker CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166 sowie die negativen Marker CD31, CD34 und CD133 betrachtet und mittels Durchflusszytometrie untersucht. Abbildung 9 zeigt, dass mindestens 95 % der Zellpopulation positiv bezüglich der Stammzellmarker sind und weniger als 1 % die negativen Marker aufweisen.

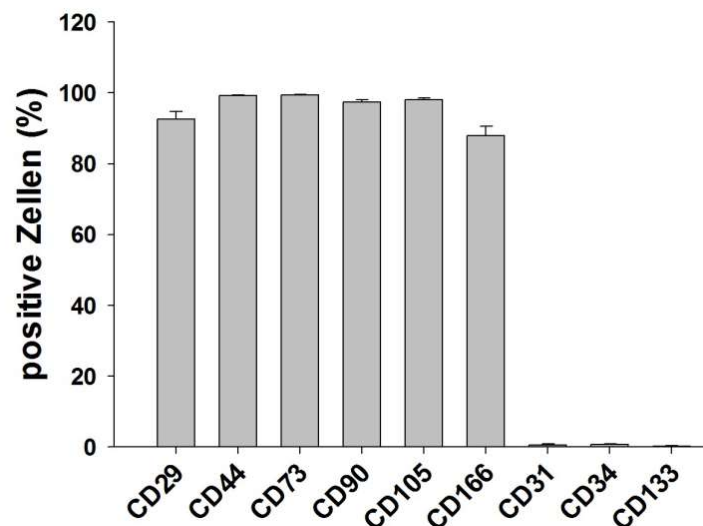


Abb. 8 Charakterisierung der ASCs. Alle isolierten Zellen, wurden mittels Durchflusszytometrie auf 6 stammzellassozierte und 3 negative Marker untersucht. Die Auswertung erfolgte durch das Überlagern der Negativkontrolle mit der sekundären Antikörper-Kontrolle, n=12.

Anschließend wurden die Oberflächenantigene mittels cLSM detektiert. In Abbildung 10 ist die Expression der positiven Oberflächenmarker im Vergleich zu den negativen Markern deutlich zu sehen. Diese Ergebnisse erlaubten es, die charakterisierten ASCs für die weiteren Untersuchungen zu verwenden und weiter zu passagieren.

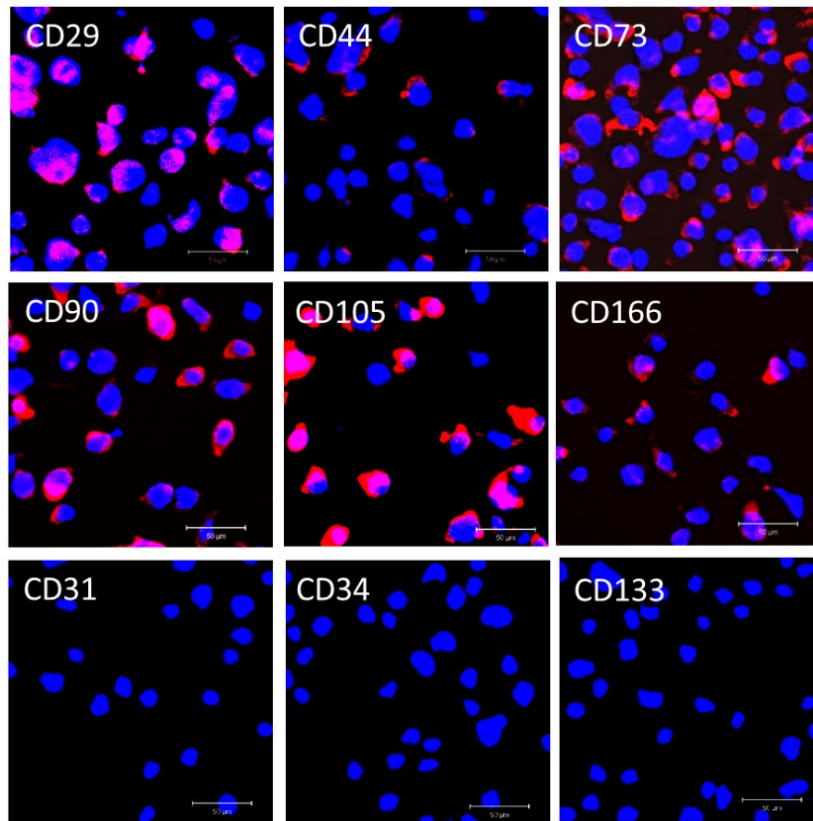


Abb. 9 Charakterisierung der ASCs anhand von Oberflächenmarkern. Repräsentative Aufnahme am cLSM. Blau: Zellkern, gefärbt mit Dapi. Rot: Oberflächenmarker, Maßstabsbalken 50 μm .

7.2 Vergleich der Zellen von jungen und alten Spendern in P6 und P16

ASCj und ASCa wurden hinsichtlich der Expression der Stammzellmarker mittels Durchflusszytometrie, sowie hinsichtlich der Proliferation und der Seneszenz anhand von ICC und semiquantitativer PCR miteinander verglichen. Außerdem wurde der Seneszenzmarker SA- β -Galactosidase-Aktivität mittels *Quantitative Cellular Senescence Assay Kit* untersucht. Der ROS-Gehalt wurde anhand der DCF-Messung ermittelt. Um die Empfindlichkeit der beiden Altersgruppen gegenüber H_2O_2 feststellen zu können, erfolgten die Untersuchungen mit unterschiedlichen H_2O_2 -Konzentrationen. Letale Zellen wurden mittels Letalitätsmessung detektiert. Zur Beantwortung der Frage, wie sich die Zellen im Alterungsprozess unterscheiden, wurden Experimente *ex vivo* in einer niedrigen Passage (P6) sowie *in vitro* in einer höheren Passage (P16) durchgeführt.

7.2.1 Untersuchung der Stammzellmarker

Um festzustellen, ob sich die Expression der Stammzellmarker zwischen ASCj und ASCa unterscheidet und um zu ermitteln, wie sich die Expression der ASCs im Laufe der Passagen verhält, wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie in P6 und P16 untersucht. Dafür wurden drei typische mesenchymale Stammzellmarker (CD73 [Ecto-5'-Nucleotidase], CD90 [*thymocyte differentiation antigen 1* - Thy1], CD105 [Endogil]) und ein negativer Marker (CD34 [hämatopoetischer Stammzellmarker]) verwendet. Festgestellt wurde, dass kein Unterschied zwischen P6 und P16 bei den Stammzellmarkern CD73, CD105 und CD34 besteht. Dagegen wird der Marker CD90 bei P16 herunterreguliert (siehe Abb. 11). Thy 1 ist ein Glykosylphosphatidylinositol-verankertes Glykoprotein, welches auf mesenchymalen Stammzellen, Thymozyten und Neuronen exprimiert wird. Außerdem reguliert es die Adhäsion und Signaltransduktion in T-Zellen. Thy 1 wird ebenfalls in Tumorstammzellen von hepatozellulären Karzinomen exprimiert (Crawford et. al. 2008). Diese Zellen weisen alle auf eine höhere Proliferationsfähigkeit hin. Die Herunterregulation von Thy 1 gibt einen Hinweis auf eine verminderte Zellteilung.

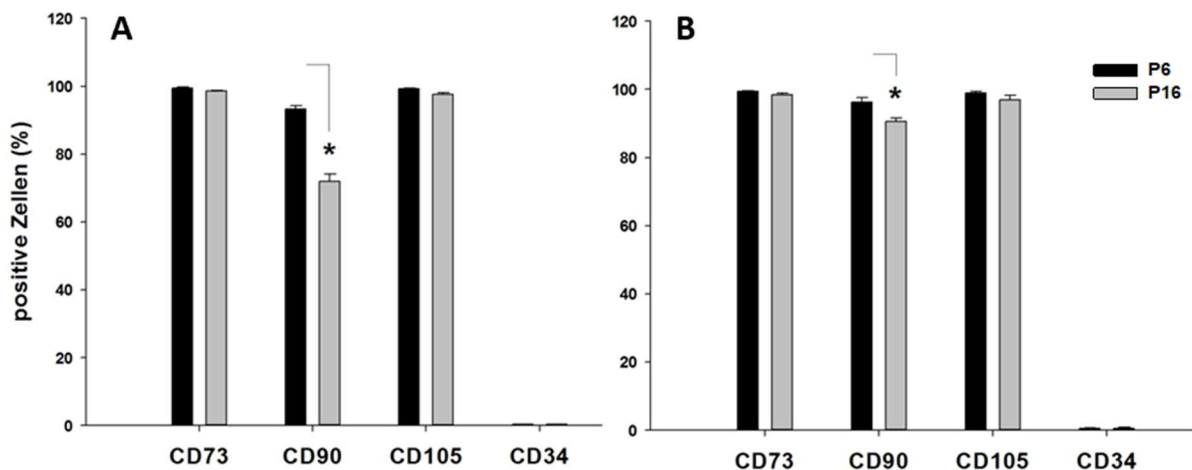


Abb. 10 Vergleich der Oberflächenmarkerexpression in P6 und P16. A: ASCj. B: ASCa. Dargestellt sind MW \pm SEM, n=3, *p \leq 0,05 (t-test).

7.2.2 Dichteabhängige Proliferation

Um eine Abhängigkeit der Proliferation von der Zelldichte auszuschließen und eine optimale Zelldichte für die Proliferation zu ermitteln, wurden ASCj und ASCa bei P6 und P16 in verschiedenen Zellzahlen pro cm^2 (2×10^3 , 4×10^3 , 1×10^4 , 2×10^4) ausplattiert und mittels ICC auf den Proliferationsmarker Ki67 untersucht. Das Ki67, entdeckt in Kiel im Jahr 1967, ist ein Protein, das von Zellen exprimiert wird, die sich im Teilungsprozess befinden. Die ruhenden Zellen weisen keine Aktivität des Markers auf. Daraus lässt sich unmittelbar eine Aussage über proliferierende Zellen ableiten. Abbildung 12 präsentiert die unterschiedlichen Zellzahlen pro cm^2 und die Aktivität des Ki67.

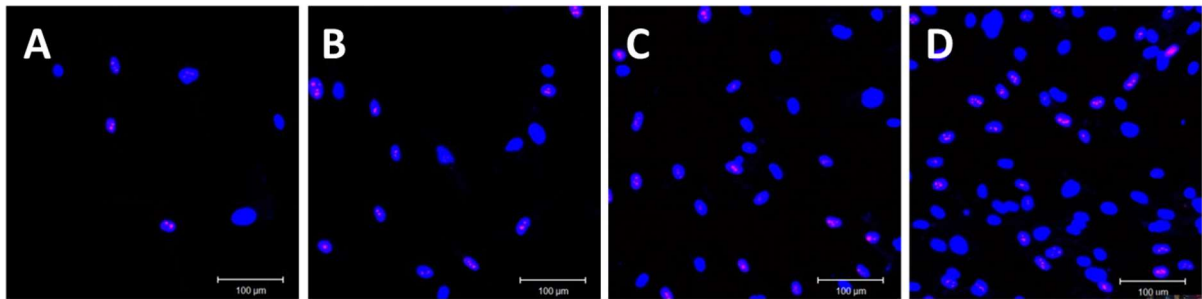


Abb. 11 Beispielaufnahmen von unterschiedlichen Zelldichten. A: 2×10^3 Zellen/ cm^2 . B: 4×10^3 Zellen/ cm^2 . C: 1×10^4 Zellen/ cm^2 . D: 2×10^4 Zellen/ cm^2 . Blau: Zellkern, gefärbt mit Dapi. Rot: Ki67. Maßstabsbalken 100 μm .

In Abbildung 13 A ist zu sehen, dass die Zellen von jungen Spendern (< 30 Jahre alt) in P16 deutlich weniger proliferieren als jene in P6 bei der jeweiligen Zelldichte. Die gleichen Ergebnisse konnte man bei den Zellen von alten Spendern feststellen (siehe Abb. 13 B). Dies erlaubt die Aussage zu treffen, dass die Proliferation beim Passagieren sinkt. Dieser Prozess lässt sich als Alterung in Zellkultur bezeichnen. Außerdem besteht ein signifikanter Unterschied in beiden Altersgruppen bei unterschiedlicher Zelldichte: ASCj und ASCa proliferieren in P6 bei einer Zelldichte von 2×10^4 Zellen/ cm^2 signifikant weniger als bei 4×10^3 Zellen/ cm^2 und 1×10^4 Zellen/ cm^2 . Bei zu niedrigerer (1×10^3 Zellen/ cm^2) und zu hoher Zelldichte (2×10^4 Zellen/ cm^2) proliferieren die Zellen langsamer. Der Einfluss der Zelldichte bleibt in beiden Gruppen in P16 aus. Dieses Phänomen ist mit der bereits herabgesetzten Proliferation bei ansteigenden Passagen zu erklären.

- Ergebnisse -

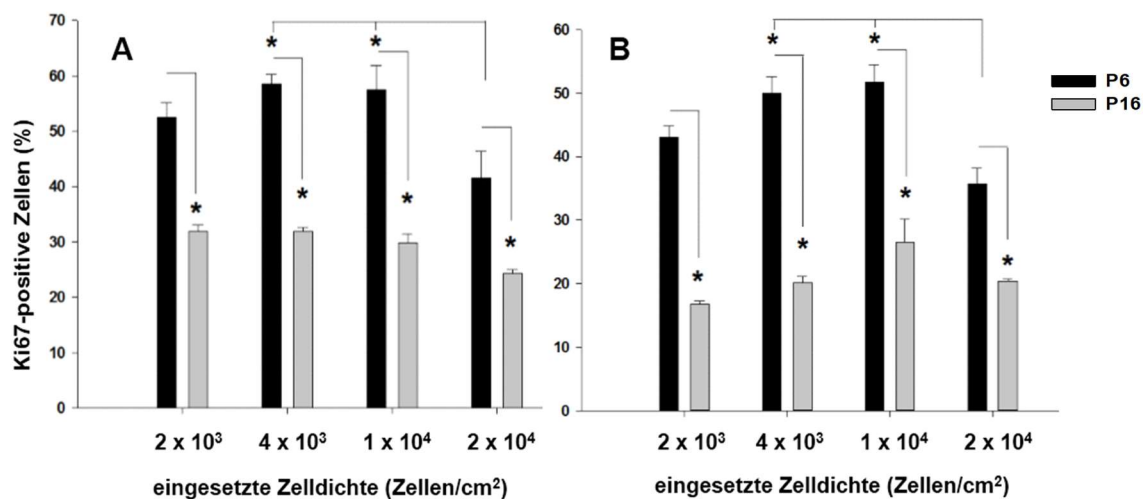


Abb. 12 Dichteabhängige Proliferation gemessen anhand einer Ki67-Färbung. A: ASCj. B: ASCa. Dargestellt sind MW ± SEM, n=3, *p ≤ 0,05 (One Way ANOVA, Dunnett, t-test).

Um ASCj und ASCa miteinander vergleichen zu können, wurden die Werte von Abbildung 13 in Abbildung 14 zusammengefasst.

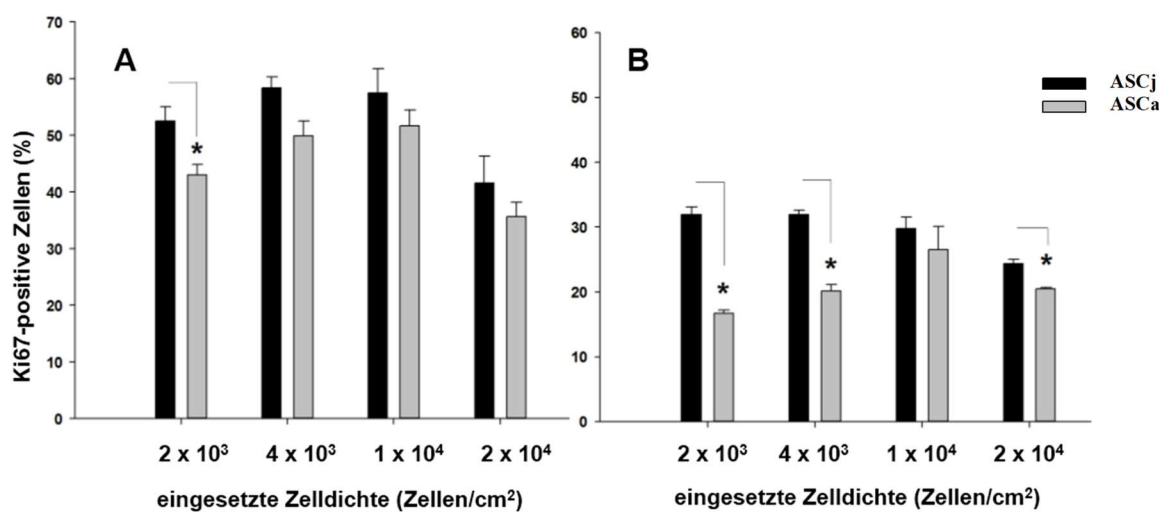


Abb. 13 Dichteabhängige Proliferation gemessen anhand einer Ki67-Färbung. A: P6. B: P16. Dargestellt sind MW ± SEM, n=3, *p ≤ 0,05 (t-test).

Bei der Zelldichte 2 x 10³ Zellen/cm² unterscheiden sich die Zellen hinsichtlich der Proliferation sowohl bei P6 als auch bei P16. Bei ASCa ist die Proliferation signifikant niedriger als bei ASCj, also haben die Zellen von jungen Spendern bei dieser Zelldichte eine höhere

Proliferationsrate als die Zellen von alten Spendern. Die Proliferationsfähigkeit unterscheidet sich bei der Alterung in Zellkultur, das heißt, dass ASCa in P16 mit der Zelldichte 4×10^3 und 2×10^4 Zellen/cm² weniger proliferieren als in P6, in der diese Zelldichte keinen Einfluss auf die Zellteilung zeigte. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass je älter die Zellen von alten Spendern in der Zellkultur werden, sie desto unflexibler auf die Variabilität der Zelldichte hinsichtlich der Zellteilung reagieren.

Um ASCj mit ASCa miteinander vergleichen zu können, wurden 1×10^4 Zellen/cm² verwendet, da diese Zelldichte keinen signifikanten Unterschied bei der Zellteilung gezeigt hat.

7.2.3 Genexpression der Marker p27 und p21

Die mRNA-Expressionen von p27 und p21, die in der G₀-Phase hochreguliert werden, sind Regulatoren des Zellzyklus und ermöglichen es, eine Aussage über die Proliferation zu treffen. Sie wurden mittels semiquantitativer PCR untersucht. Abbildung 15 A zeigt, dass es bei ASCj einen signifikanten Unterschied zwischen P6 und P16 gibt. Die Genexpression von p27 ist in P16 höher als in P6. Bei ASCa ist kein Unterschied hinsichtlich der Genexpression von p27 während der Alterung in Zellkultur zu sehen. ASCj zeigt im Vergleich mit ASCa weder in P6 noch in P16 einen Unterschied bei der Genexpression von p27.

Abbildung 15 B zeigt, dass bei ASCa in P6 die mRNA-Expression von p21 geringer ist als in P16, was eine verminderte Zellproliferation in der *in-vitro*-Alterung bedeutet. Beide Gruppen (ASCj, ASCa) unterscheiden sich nur in P16, wobei die p21-Genexpression in ASCa gegenüber ASCj signifikant erhöht ist. Es zeigt sich also ein Einfluss des Spenderalters auf die Genexpression von p21 in P16. Anhand der Genexpression von p21 lässt sich gut erkennen, wie die Alterung *in vitro* in Erscheinung tritt.

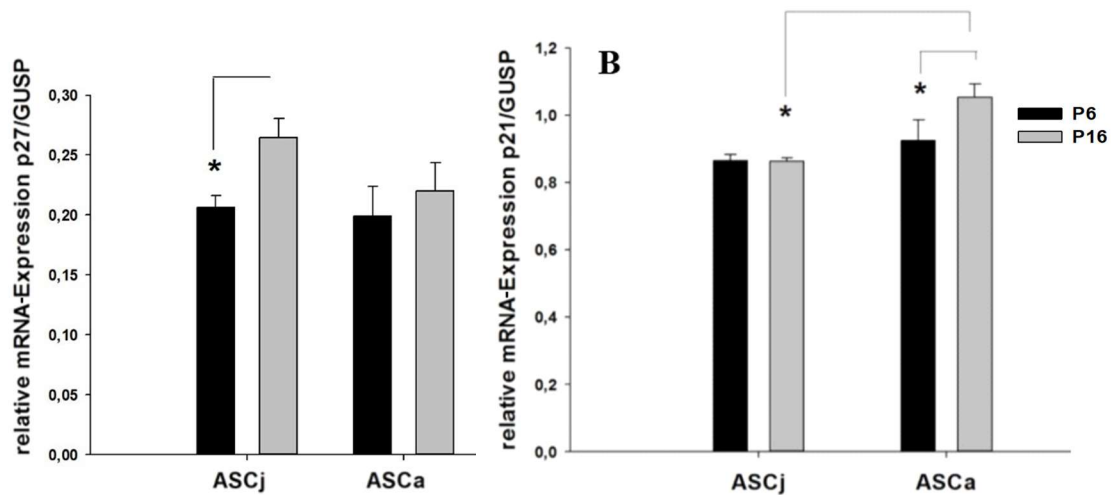


Abb. 14 Relative mRNA-Expression. A: p27/GUSP. B: p21/GUSP. Dargestellt sind MW \pm SEM, n=3, *p \leq 0,05 (t-test).

7.2.4 Untersuchung der SA- β -Galactosidase-Aktivität

Um eine Aussage treffen zu können, ob sich ASCj und ASCa bezüglich der Seneszenz unterscheiden, wurde die Seneszenz-assoziierte β -Galactosidase-Aktivität mittels des *Quantitative Cellular Senescence Assay Kit* untersucht. Es wurde festgestellt, dass die SA- β -Galactosidase-Aktivität während der Alterung sowohl *ex vivo* als auch *in vitro* hochreguliert wird (siehe Abb. 16 A). In P6 sind bei ASCa prozentual mehr SA- β -Galactosidase-positive Zellen vorhanden als bei ASCj. Bei der Alterung in der Zellkultur, das heißt beim Passagieren bis P16, wächst der Anteil von Seneszenzmarker-positiven Zellen in beiden Gruppen signifikant.

- Ergebnisse -

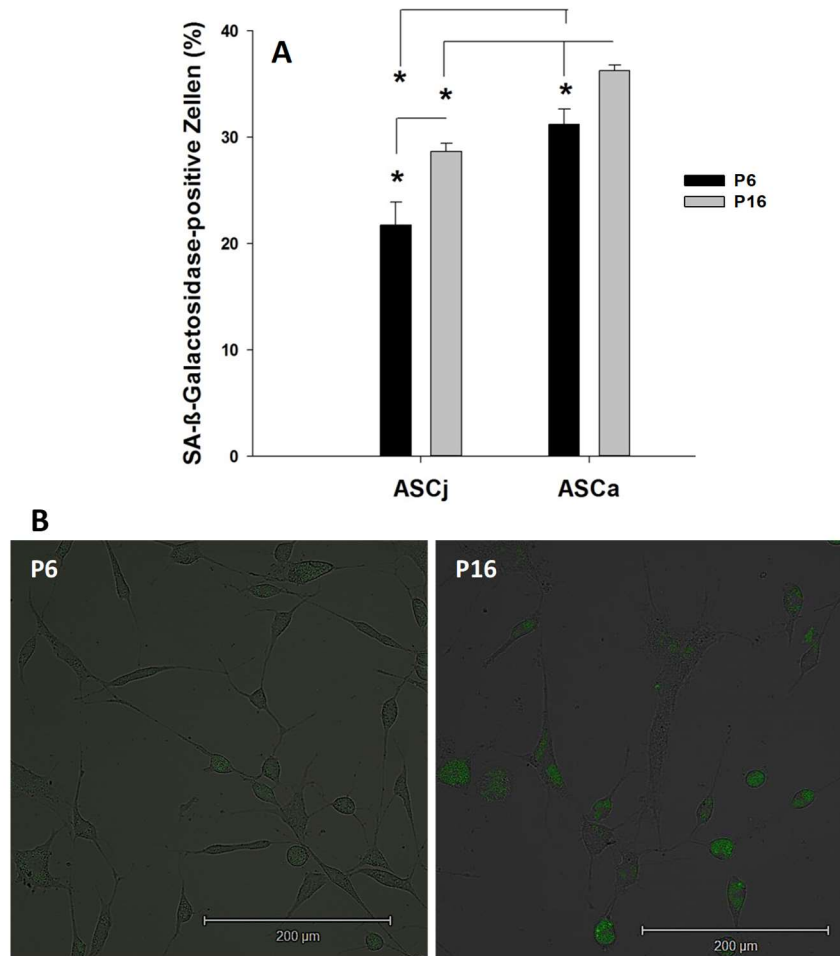


Abb. 15 SA-β-Galactosidase-Aktivität. **A:** Dargestellt sind MW ± SEM, n=3, *p ≤ 0,05 (t-test). **B:** Beispielaufnahme von ASCa, links P6, rechts P16. Grün – SA-β-Galactosidase-positive Zellen. Maßstabsbalken 200 μm.

7.2.5 Genexpression der Marker Sirt1 und FoxO3a

Die Genexpression von Sirt1, auch als SIR2 (*Silent Information Regulator 2*) bezeichnet, welcher an dem antioxidativen System und an der Zellalterung beteiligt ist, wurde mittels semiquantitativer PCR untersucht. Eine geringe tendenzielle, jedoch nicht signifikante, altersabhängige Herunterregulation wurde sowohl in P6 zwischen den ASCj und ASCa als auch in P16 beobachtet. Auch eine tendenzielle Herunterregulation von Sirt1 ist zwischen P6 und P16 bei beiden Altersgruppen erkennbar (siehe Abb. 17 A). Da FoxO3a, ein Mitglied der FoxO-Transkriptionsfaktoren (*forkhead box class O*), mit dem Zellzyklus, der Stressregulation, der Apoptose und der Seneszenz eng verbunden ist, stellt sich die Frage, ob sich die FoxO3a-

Expression zwischen ASCj und ASCa unterscheidet und ob sich die Expression bei der Alterung in der Zellkultur ändert. Die mRNA-Expression von FoxO3a hat keinen signifikanten Unterschied gezeigt (siehe Abb. 17 B); es ist jedoch eine tendenzielle Herunterregulation bei ASCa im Vergleich zu ASCj sowohl in P6 als auch in P16 zu sehen. Die Genexpression von FoxO3a zeigt bei beiden Altersgruppen in P6 im Vergleich zu P16 keinen Unterschied. Sie bleibt in der *in-vitro*-Alterung unverändert.

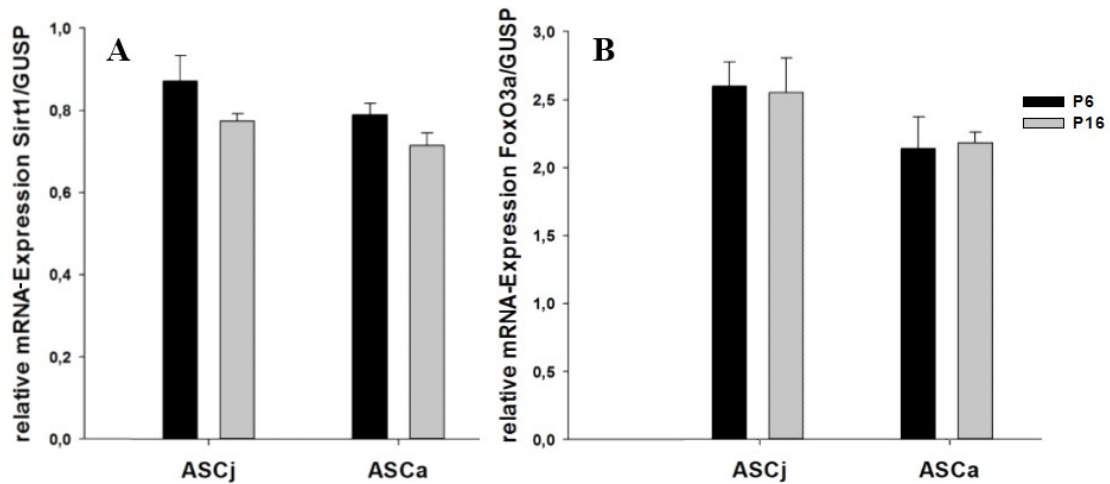


Abb. 16 Relative mRNA-Expression. A: Sirt1/GUSP. **B:** FoxO3a/GUSP. Dargestellt sind MW \pm SEM, n=3, *p \leq 0,05 (t-test).

7.2.6 Untersuchung des ROS-Gehalts

Das ROS-Level in den Zellen, welches mittels ROS-Messung untersucht wurde, ermöglicht eine Beurteilung des antioxidativen Systems und der davon abhängigen Proliferation sowie der Seneszenz. Die Abbildung 18 A zeigt, dass die Zellen sich deutlich unterscheiden. ASCj generieren in P6 weniger ROS als ASCa. Das heißt, es besteht ein signifikanter Unterschied *ex vivo* hinsichtlich des ROS-Levels. Außerdem steigt das ROS-Level in P16. Daran lässt sich ablesen, dass bei Alterung *in vitro* der ROS-Gehalt von den Zellen nicht mehr niedrig gehalten werden kann.

- Ergebnisse -

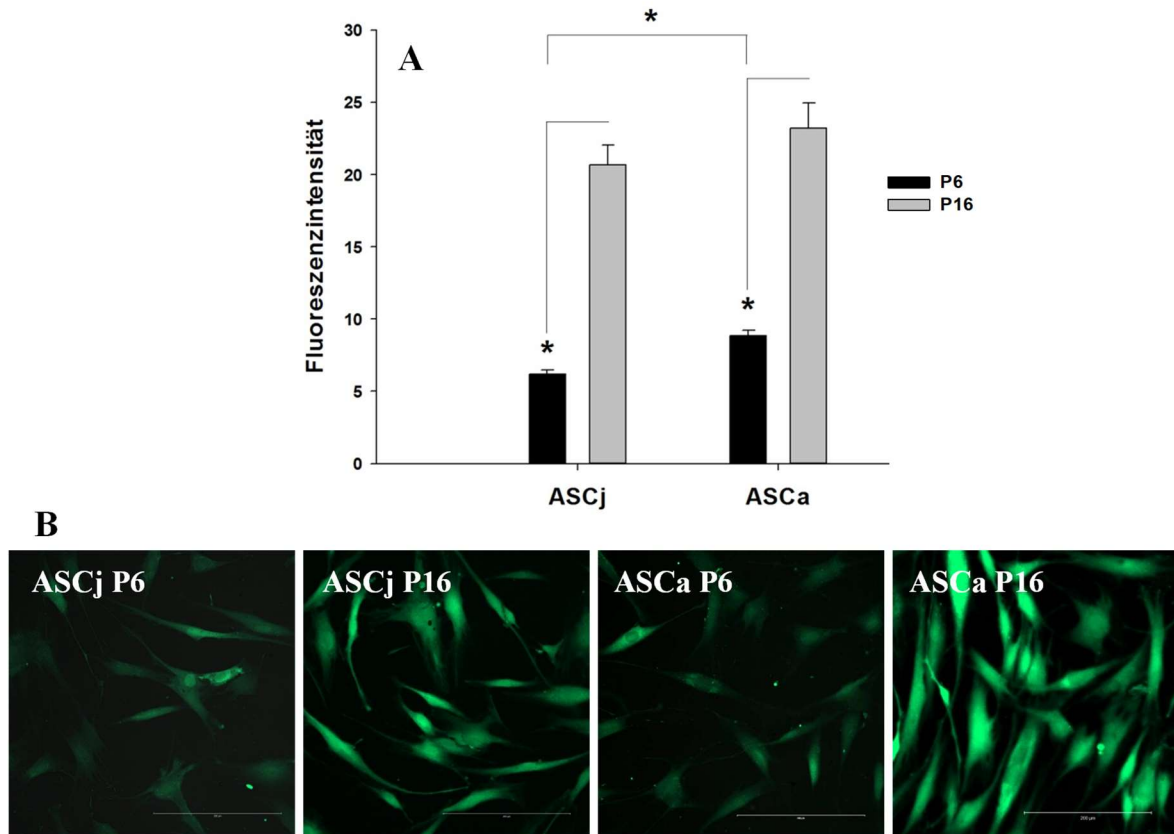


Abb. 17 ROS-Level Untersuchung mittels DCF-Messung. A: Fluoreszenzintensität bei ASCj und ASCa. Dargestellt sind MW \pm SEM, n=3, *p \leq 0,05 (One Way ANOVA, Dunnett). **B:** Repräsentative Aufnahmen der DCF-Messung, Maßstabsbalken 100 μ m.

7.2.7 Untersuchung der Letalität

Um eine subletale Dosis (LD) des Wasserstoffperoxids für die Experimente verwenden zu können, wurde zuerst die Letalität nach der Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an H₂O₂ (250 nM, 500 nM, 1 μ M, 10 μ M) untersucht. Das toxische Wasserstoffperoxid zerstört die Membran der Zellen, sodass der Farbstoff in sie eindringen kann. Der Farbstoff interkaliert in die DNA, was eine erhöhte intrazelluläre Fluoreszenzintensität bedingt. In vorbereitenden Untersuchungen für diese Arbeit wurde beobachtet, dass sich die Zellen nach der Inkubation mit Wasserstoffperoxid innerhalb von 24 h regeneriert haben. Um eine Regeneration der Zellen ausschließen und einen direkten Effekt festhalten zu können, erfolgte die Messung der Letalität anschließend an die 1,5-stündige Inkubation mit Wasserstoffperoxid. Es wurde festgestellt, dass die Inkubation mit 10 μ M H₂O₂ für die beiden Altersgruppen einer LD99 sowohl bei P6 als auch bei P16 entspricht (siehe Abb. 19).

- Ergebnisse -

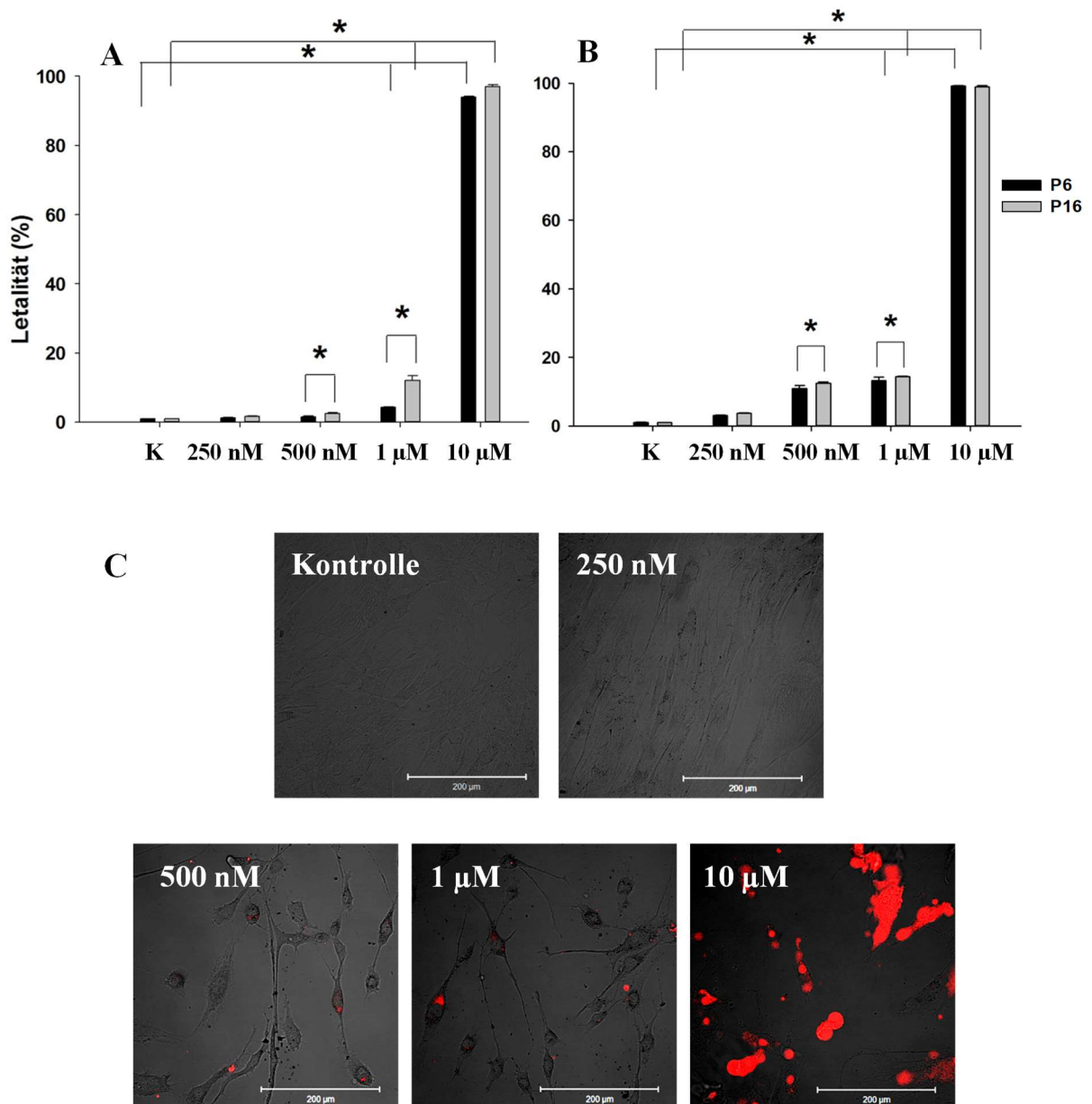


Abb. 18 Ermittlung der letalen Dosis von H₂O₂. A: ASCj. B: ASCa. Inkubation mit unterschiedlichen H₂O₂-Konzentrationen. Dargestellt sind MW ± SEM, n=3, *p ≤ 0,05 (One Way ANOVA, Dunnett). C: Repräsentative Aufnahmen von ASCj, P6. Maßstabsbalken 200 µm.

Der Anteil letaler Zellen steigt innerhalb der beiden Altersgruppen mit der Passagenzahl sowohl bei einer Inkubation mit 500 nM als auch mit 1 µM H₂O₂. In P6 wurden jedoch bei ASCj nach der Inkubation mit 500 nM H₂O₂ weniger letale Zellen detektiert als bei ASCa. Damit kann eine H₂O₂-Konzentration von 500 nM als LD₁₀ (*Lethal Dosis Low*) betrachtet werden. Da bei 250 nM H₂O₂ kein Einfluss auf die Letalität der Zellen nachgewiesen werden konnte und zugleich die Möglichkeit bestand, bei dieser Konzentration den Effekt des oxidativen Stresses

in vitalen Zellen zu untersuchen, wurde in den weiteren Experimenten eine Konzentration von 250 nM H₂O₂ verwendet.

7.3 Inkubation mit Wasserstoffperoxid

Mit dem Ziel, den Einfluss von Wasserstoffperoxid auf die Proliferation und die Seneszenz festzustellen, wurden die Zellen beider Gruppen (ASCj, ASCa) mit der in Vorversuchen festgestellten subletalen Dosis des Wasserstoffperoxids (250 nM) für 2 h inkubiert und die Proliferationsmarker (Ki67 mittels ICC; p27 und p21 mittels semiquantitativer PCR) sowie die Seneszenzmarker (SA-β-Galactosidase-Aktivität mittels *Quantitative Cellular Senescence Assay Kit*; Sirt1 und FoxO3a mittels semiquantitativer PCR) untersucht. Ebenso wurden die ASCs in P6 und P16 mit der gleichen Konzentration von H₂O₂ inkubiert und mit den unbehandelten Zelle als Kontrolle verglichen.

7.3.1 Untersuchung der Proliferationsmarker

Zur Untersuchung der Wirkung des Wasserstoffperoxides auf die Proliferation wurden die Zellen für 2 h mit 250 nM H₂O₂ inkubiert. Als Proliferationsmarker wurde Ki67, p27 und p21 gewählt. Nach dieser akuten Stressexposition wurden die Zellen fixiert und mittels ICC auf den Proliferationsmarker Ki67 untersucht. Wie man in der Abbildung 20 A sieht, verringert Wasserstoffperoxid die Proliferation tendenziell bei allen Gruppen, wobei in P16 sowohl bei ASCj als auch bei ASCa ein signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrolle festgestellt werden konnte.

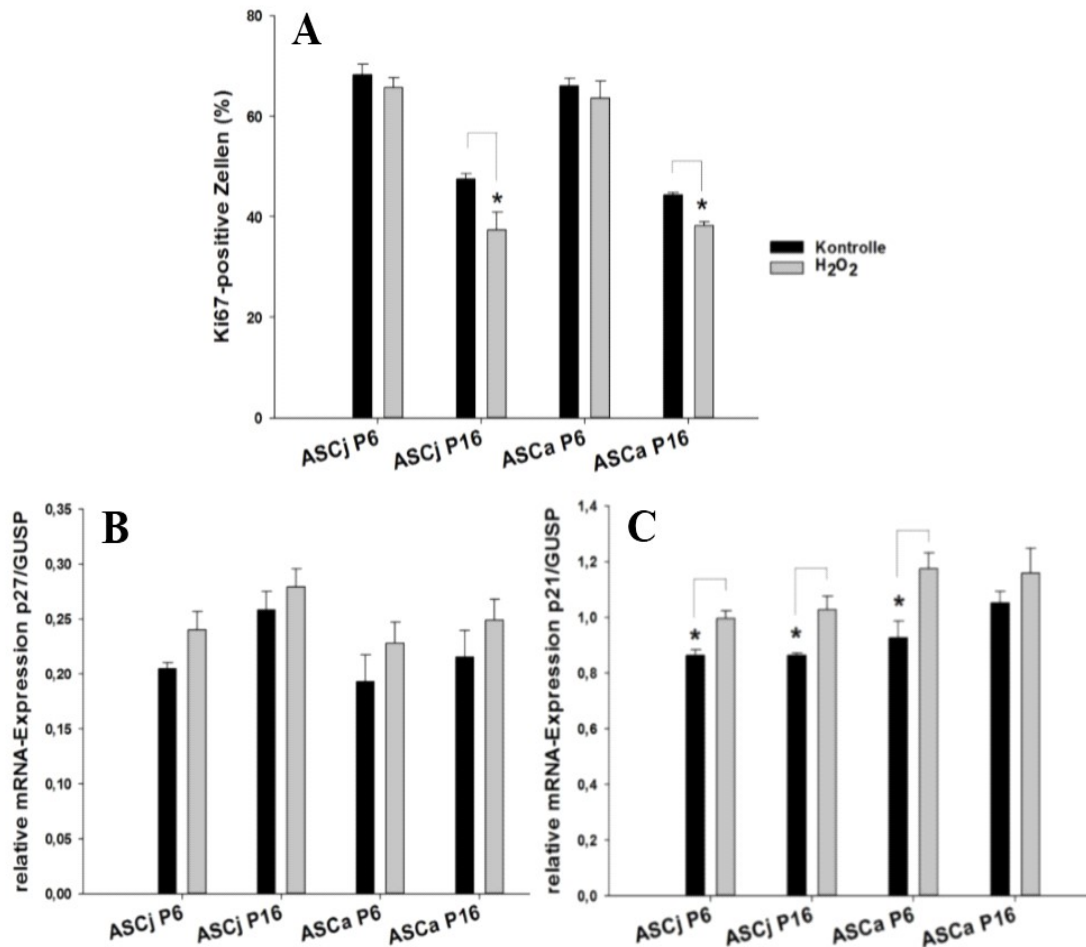


Abb. 19 Untersuchung der Proliferationsmarker nach der Inkubation mit 250 nM H₂O₂. **A:** Ki67-Aktivität mittels ICC. **B:** Relative mRNA-Expression p27/GUSP. **C:** Relative mRNA-Expression p21/GUSP. Dargestellt sind MW ± SEM, n=3, *p ≤ 0,05 (t-test).

Die reduzierte Proliferation der Zellen bei Alterung *in vitro* deutet auf das oxidativ-stressinduzierte Sinken der Zellteilungsrate hin. Dementsprechend wird die mRNA-Expression von p27 und p21 in allen Gruppen hochreguliert, wobei eine signifikant hochregulierte mRNA-Expression von p21 bei ASCj in beiden Passagen und bei ASCa in P6 festgestellt werden konnte (siehe Abb. 20 C). Der minimale Einfluss der H₂O₂-Inkubation auf die ASCa in P16 ist mit dem bereits bestehenden alterungsabhängigen Abfall der Proliferation zu erklären.

7.3.2 Untersuchung der Seneszenzmarker

Um den Einfluss von Wasserstoffperoxid auf die Seneszenz zu untersuchen, wurden die Zellen für 2 h mit 250 nM H₂O₂ behandelt und die Aktivität der SA-β-Galactosidase, sowie die Genexpression von Sirt1 und FoxO3a untersucht. Die Inkubation mit H₂O₂ zeigte einen deutlichen Effekt auf die Aktivität der SA-β-Galaktosidase. In den ASCj und ASCa steigt der Anteil der SA-β-Galactosidase-positiven Zellen sowohl bei P6 als auch bei P16 nach der Inkubation mit H₂O₂ (siehe Abb. 21 A). Dies verdeutlicht das Auftreten der oxidativ-stressinduzierten Seneszenz in beiden Altersgruppen.

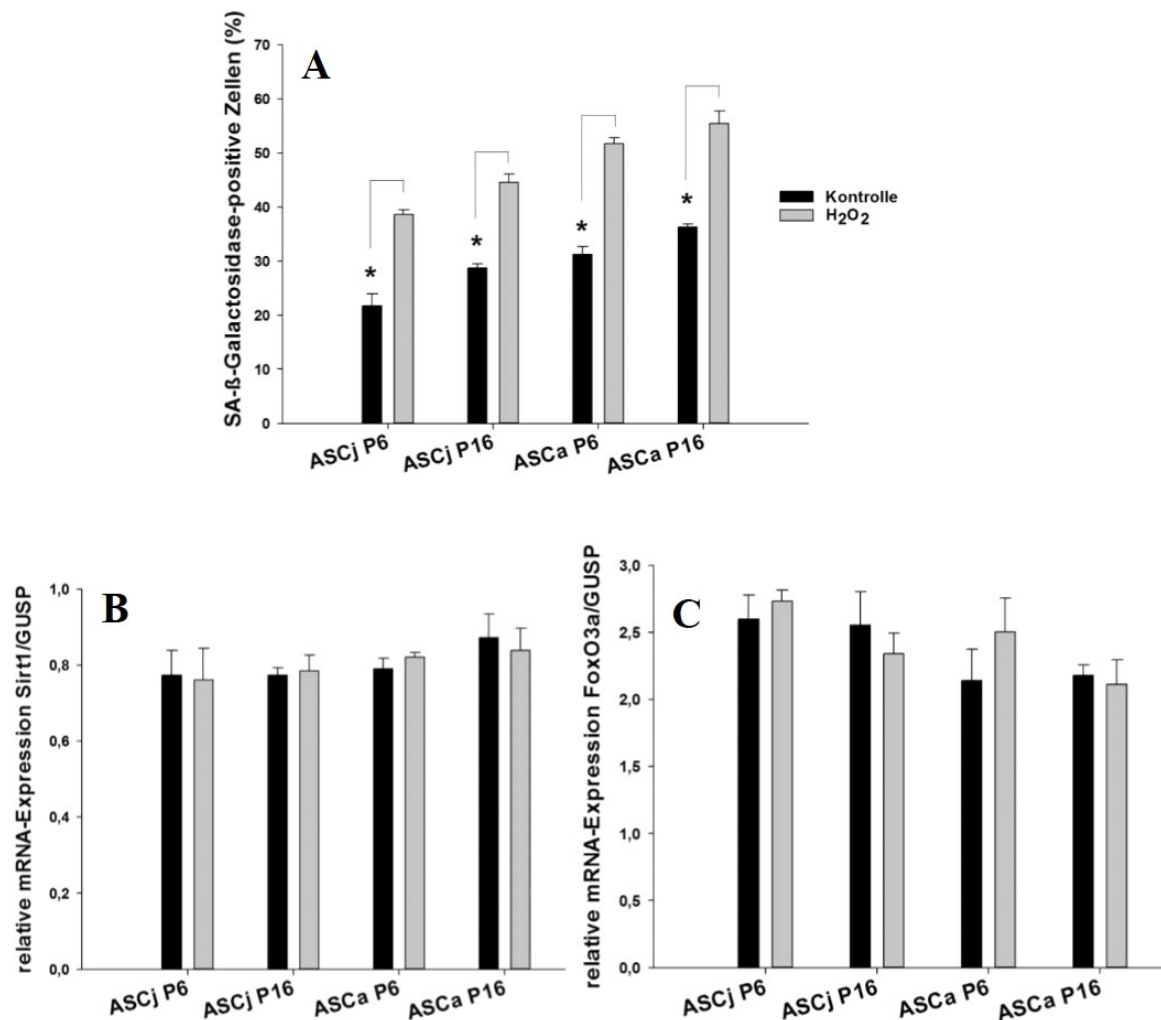


Abb. 20 Untersuchung der Seneszenzmarker nach der Inkubation mit 250 nM H₂O₂. **A:** der SA-β-Galactosidase-Aktivität. **B:** Relative mRNA-Expression Sirt1/GUSP. **C:** Relative mRNA-Expression FoxO3a/GUSP. Dargestellt sind MW ± SEM, n=3, *p ≤ 0,05 (t-test).

Dagegen konnte nach akuter Stressexposition keine statistisch signifikante Änderung der mRNA-Expression von Sirt1 sowie von FoxO3a zwischen Kontroll- und Expositionsgruppe festgestellt werden. Die nach zweistündiger oxidativer Stressexposition gewonnene RNA wies jedoch keinen Anstieg der Genexpression auf. Ebenso konnte keine Wirkung der Wasserstoffperoxid-Inkubation auf die mRNA-Expression von FoxO3a festgestellt werden. Diese Ergebnisse waren sowohl in ASCj als auch in ASCa in verschiedenen Passagen einheitlich (siehe Abb. 21 B, C).

7.4 Inkubation mit Radikalfängern

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Radikalfänger eingesetzt, um eine Wirkung auf die Proliferation und die Seneszenz zu untersuchen sowie um einen möglichen gegenteiligen Effekt zur Wirkung von Wasserstoffperoxid zu ermitteln. Um die Wirkung der freien Radikale aufzuheben, die während des zellulären Stoffwechsels entstehen, wurden ASCs mit Radikalfängern inkubiert. Die Inkubation wurde ohne zusätzliche Zugabe von H₂O₂ durchgeführt, folglich lag keine Koinkubation vor. In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt der Radikalfänger *ex vivo* und *in vitro* untersucht. Die *ex-vivo*-Untersuchung ohne Koinkubation stellt eine Möglichkeit dar, den bereits bestehenden chronischen Stress in Spenderzellen ohne akuten Stress festzustellen, und überdies zu untersuchen, ob die Veränderungen des Alterungsprozesses aufgehoben werden können. Als Radikalfänger wurden die enzymatische antioxidative Substanz NMPG (*N*-(2-mercapto-propionyl)-glycine) und das nicht-enzymatische Vitamin-E-Derivat Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure) ausgewählt. Da Trolox in DMSO gelöst wurde, ist DMSO in den Grafiken als Kontrolle (Lösungsmittelkontrolle) dargestellt.

7.4.1 Untersuchung der Proliferationsmarker

Wie die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen gezeigt haben, ist eine verminderte Proliferation durch oxidativen Stress nachweisbar (siehe Abb. 20). Ein Anstieg der Proliferation äußert sich in dem erhöhten Anteil der Ki-67-positiven Zellen sowie in der verminderten Genexpression von p21 und p27. Um herauszufinden, ob die Inkubation mit den Radikalfängern einen Anstieg der Proliferation hervorrufen kann, wurden ASCs mit NMPG und Trolox inkubiert und o.g. Proliferationsmarker untersucht. Für die Inkubation wurden jeweils 100 μ M NMPG und 100 μ M Trolox verwendet.

Die Inkubation mit NMPG hat einen positiven Effekt auf die Proliferation – tendenziell in allen Zellen mit NMPG-Exposition im Vergleich zur Kontrollgruppe; allerdings konnte ein signifikanter Anstieg des Anteils der Ki67-positiven Zellen nur bei ASCa in P16 nachgewiesen werden (Abb. 22 A). Die Inkubation mit Trolox führte zu einem statistisch signifikant erhöhten Anteil Ki67-positiver Zellen bei ASCj in P16 gegenüber der Kontrollgruppe. Eine tendenziell positive Wirkung von Trolox auf die Proliferation ist auch bei den ASCa in den beiden Passagen sowie bei ASCj in P6 zu beobachten (siehe Abb. 22 B).

Wie man in Abbildung 22 C sieht, zeigt die Inkubation mit NMPG auf die Genexpression von p27 sowohl bei ASCj als auch bei ASCa in beiden Passagen tendenziell eine Herunterregulation. Nach der Inkubation mit Trolox wurde die mRNA-Expression, ähnlich wie nach der Inkubation mit NMPG, tendenziell inhibiert, zudem wurde in ASCa in P16 eine signifikante Herunterregulation nachgewiesen (siehe Abb. 22 D).

Nach der Inkubation mit NMPG blieb die Genexpression von p21 – sowohl in ASCj als auch in ASCa – in beiden Passagen (P6, P16) sowie nach der Inkubation mit Trolox nahezu unverändert (siehe Abb. 22 E, F).

- Ergebnisse -

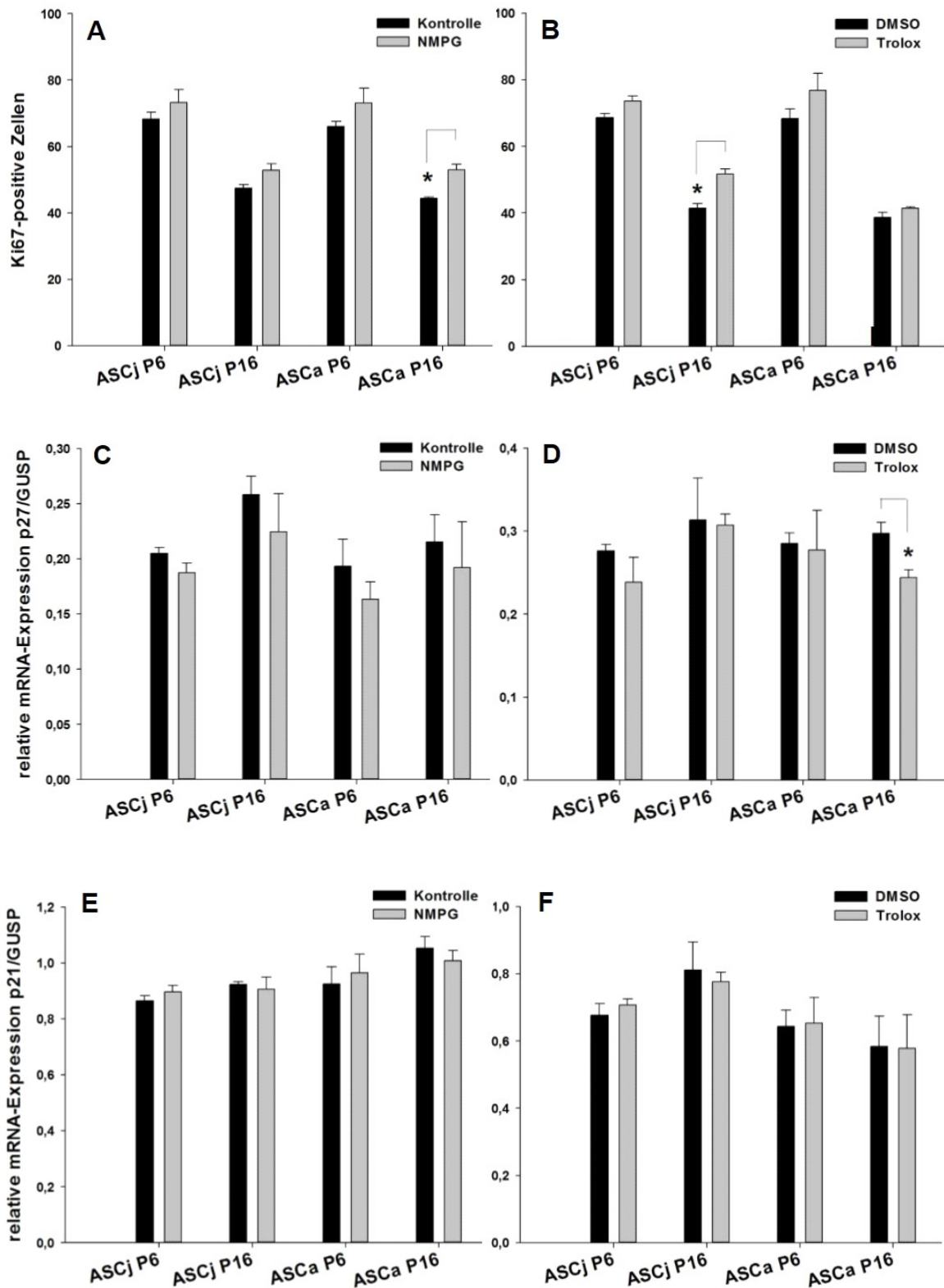


Abb. 21 Untersuchung der Proliferationsmarker nach der Inkubation mit Radikalfängern. **A:** Ki67 nach NMPG-Inkubation. **B:** Ki67 nach Trolox-Inkubation. **C:** mRNA-Expression von p27/GUSP nach NMPG-Inkubation. **D:** mRNA-Expression von p27/GUSP nach Trolox-Inkubation. **E:** mRNA-Expression von p21/GUSP nach NMPG-Inkubation. **F:** mRNA-Expression von p21/GUSP nach Trolox-Inkubation. Dargestellt sind MW \pm SEM, n=3, *p \leq 0,05 (t-test).

7.4.2 Untersuchung der Seneszenzmarker

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob Radikalfänger der Seneszenz entgegenwirken. Für einen positiven Effekt würde man nach der Inkubation mit Radikalfängern einen Abfall der SA- β -Galactosidase-Aktivität erwarten, sowie eine erhöhte Genexpression von FoxO3a und Sirt1.

Eine Veränderung der SA- β -Galactosidase-Aktivität nach Inkubation mit NMPG konnte weder zwischen den Gruppen (ASCj, ASCa) noch in verschiedenen Passagen (P6, P16) festgestellt werden (siehe Abb. 23 A).

Nach der Inkubation mit Trolox wurde auch die SA- β -Galactosidase-Aktivität untersucht. In ASCj war keine Auswirkung auf die SA- β -Galactosidase-Aktivität weder bei P6 noch bei P16 festzustellen (siehe Abb. 23 B). In ASCa (P6) sank der Anteil SA- β -Galactosidase-positiver Zellen nach Trolox-Inkubation im Vergleich zur Kontrolle. Jedoch war bei P16 keine Wirkung zu erkennen.

Die Inkubation, sowohl mit NMPG als auch mit Trolox, hat auf die mRNA-Expression von Sirt1 keine Wirkung gezeigt (siehe Abb 23 C, D).

Nach der Radikalfänger-Inkubation, sowohl mit NMPG als auch mit Trolox, konnte, ähnlich wie bei der Genexpression von Sirt1, keine Wirkung auf die Genexpression von FoxO3a festgestellt werden (siehe Abb 23 E, F). Aus dem festgestellten diffusen Einfluss der Radikalfänger auf die Proliferation und die Seneszenz lässt sich keine allgemeine Aussage treffen.

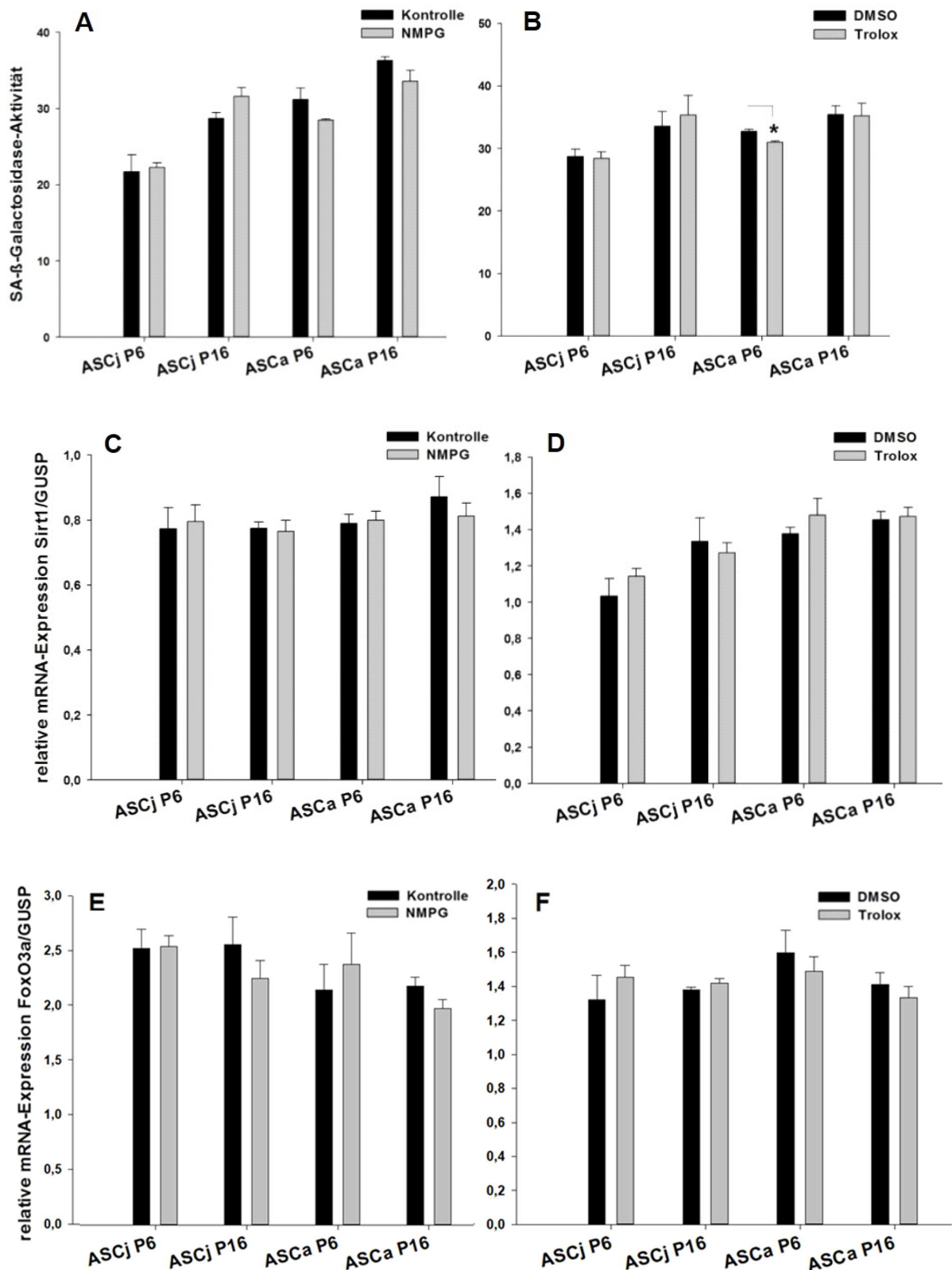


Abb. 22 Untersuchung der Seneszenzmarker nach der Inkubation mit Radikalfängern. **A:** SA-β-Galactosidase-Aktivität nach NMPG-Inkubation. **B:** SA-β-Galactosidase-Aktivität nach Trolox-Inkubation. **C:** mRNA-Expression von Sirt1/GUSP nach NMPG-Inkubation. **D:** mRNA-Expression von Sirt1/GUSP nach Trolox-Inkubation. **E:** mRNA-Expression von FoxO3a/GUSP nach NMPG-Inkubation. **F:** mRNA-Expression von FoxO3a/GUSP nach Trolox-Inkubation. Dargestellt sind MW ± SEM, n=3, *p ≤ 0,05 (t-test).

8. Diskussion

8.1 Die klinische Bedeutung der Stammzellen und deren Plastizität

Die im menschlichen Genom determinierte Alterung begrenzt die menschliche Lebensspanne. Nur selten sterben Menschen im hohen Alter an Altersschwäche, ohne zuvor von altersbedingten Krankheiten betroffen zu sein. Eine nachvollziehbare Erklärung dafür liefert die Theorie der freien Radikale, der zufolge die Entstehung altersbedingter Krankheiten mit der Schädigung der Zellstrukturen durch freie Radikale zusammenhängt, die während des zellulären Stoffwechselprozesses entstehen. Auch zwischen der Alterung der Stammzellen, dem Verlust der Selbsterneuerung, dem oxidativen Stress und der damit einhergehenden Seneszenz besteht ein Zusammenhang. Die entscheidende Rolle des oxidativen Stresses bei der Entstehung von Diabetes mellitus Typ 2 sowie deren Komplikationen, wie Makroangiopathien (Atherosklerose), Mikroangiopathien (Niereninsuffizienz) und Neuropathie (diabetisches Fußsyndrom), wurde bereits vor 30 Jahren erkannt (Wolff et al. 1991).

Zudem werden oxidativer Stress und prämatüre Seneszenz in Zusammenhang mit neurodegenerativen Krankheiten gebracht, wie Alzheimer-Demenz (AD) und Morbus Parkinson (Parkinson-Krankheit). Im Gegensatz zu der familiären Form der AD, deren Ätiopathogenese mit genetischen Mutationen und der Amyloid-Kaskaden-Hypothese erklärt wird, scheint die sporadische Form der AD auf oxidativem Stress zu basieren (Frölich und Riederer 1995). Laut der Theorie der freien Radikale kommt es bei einem Ungleichgewicht zwischen pro- und antioxidativen Systemen zur Schädigung der Zellen, einschließlich der Stammzellen. Deren Fähigkeit, sich zu erneuern und die Stoffwechselhomöostase zu bewahren, geht verloren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Fragestellung nachgegangen, wie sich Stammzellen, in diesem Fall ASCs, von jungen und alten Spendern unterscheiden, welche Auswirkung freie Radikale auf die Proliferation und Plastizität haben und wie diese Wirkung aufgehoben werden kann.

8.2 Gewinnung und Charakterisierung der ASCs

In der vorliegenden Arbeit wurden ASCs verwendet, die mittels Liposuktion aus Fettgewebe weiblicher Spender gewonnen und nach dem Bunnell-Protokoll (Bunnell et al. 2008) isoliert wurden (siehe Abb. 5). Das Fettgewebe besteht zu über 90 % aus reifen Adipozyten und einer stromal-vaskulären Fraktion (SVF). Die SVF beinhaltet eine heterogene mesenchymale Zellpopulation. Außer ASCs befinden sich hämatopoetische Stammzellen, Präadipozyten, Fibroblasten, glatte Muskelzellen, Endothelzellen, Erythrozyten, Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen im Fettgewebe (Cawthorn et al. 2012, Han et al. 2010). Für die Charakterisierung der ASCs wurden die von ISCT und IFATS festgelegten Kriterien angewendet (Bourin et al. 2013). Diesem zufolge muss der Anteil der positiven Oberflächenmarker CD13, CD29, CD44, CD73 und CD90 über 90 % und derjenige von CD105 über 80 % betragen, um als reine ASC-Population zu gelten. Zudem soll die Expression der negativen Oberflächenmarker CD31, CD45 und CD235a unter 2 % liegen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden alle isolierten Zellen in P3 auf positive Marker (CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166) sowie auf negative Marker (CD31, CD34, CD133) untersucht. Die Ergebnisse sprachen für eine reine ASC-Population mit einer positiven Markerexpression von über 95 % und einer negativen Markerexpression von unter 1 % (siehe Abb. 9). Dadurch konnten die isolierten ASCs für weitere Untersuchungen verwendet werden.

Die Stammzellmarker wurden bereits an Tiermodellen unterschiedlicher Altersgruppen untersucht (Wu et al. 2014, Lee et al. 2016). Die Ergebnisse der Untersuchung der Expression von Oberflächenmarkern tierischer Stammzellen lässt sich nicht exakt auf menschliche Stammzellen übertragen, da sich einerseits die Oberflächenmarker unterscheiden und andererseits die Lebensspanne und dementsprechend das Auftreten der Seneszenz bei tierischen und menschlichen Organismen nicht übereinstimmt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zum ersten Mal menschliche Stammzellen von Spendern verschiedener Altersgruppen in unterschiedlichen Passagen charakterisiert und miteinander verglichen. Konkret wurden die ASCs von jungen und alten Spendern in P6, sowie in P16 auf die positiven Oberflächenmarker CD73, CD90 und CD105 sowie auf den negativen hämatopoetischen Marker CD34 untersucht. In P6 konnte kein Zusammenhang zwischen der Expression der Marker und dem Alter der Spender nachgewiesen werden. Dagegen wurde in

P16 eine signifikante Herunterregulation des Stammzellmarker CD90 sowohl von jungen als auch von alten Spendern festgestellt (siehe Abb. 11). CD90, auch als Thy 1 bezeichnet, kommt in Zellen vor, die durch eine hohe Proliferationsrate charakterisiert sind. Grundsätzlich bedeutet eine verminderte Expression des Markers eine gesunkene Proliferation. Diese Ergebnisse lassen sich mit der in Zellkultur stattgefundenen Alterung erklären.

In anderen Arbeiten der Forschungsgruppe Molekulare Kardiologie und Stammzellforschung des Uniklinikums Jena um Prof. M. Wartenberg wurden die stammzelloassoziierten Gene Oct4, Sox2 und Nanog untersucht. Dabei wurden keine signifikanten Veränderungen der stammzelloassoziierten Gene während der Alterung in Zellkultur nachgewiesen. Die Zellen wurden allerdings bis P12 kultiviert (Bekhte et al. 2014).

8.3 Die Bedeutung des Spenderalters, der Zelldichte und der Passagen

Der Alterungsprozess äußert sich in einer Verschlechterung der physiologischen Funktionen, einer Beeinträchtigung der Homöostase des Organismus und einer Anfälligkeit gegenüber Krankheiten. Alterung ist ein bedeutender Risikofaktor für mehrere Erkrankungen, einschließlich Krebs, Diabetes mellitus Typ 2, kardiovaskuläre und neurodegenerative Krankheiten. Die Lebensspanne des Organismus ist begrenzt; dies wird mit der Telomerverkürzungstheorie erklärt. Alle Zellen, inklusive der ASCs, unterliegen altersabhängigen Veränderungen. Diese Veränderungen zeigen sich in einem verminderten Proliferations- und Differenzierungspotenzial, sowie in Apoptose.

Als Proliferationsmarker kommen zur objektiven Quantifizierung der Proliferation, außer dem oben beschriebenen CD90, verschiedene Proteine, Antikörper und Gene infrage. Eine wichtige Rolle spielt dabei das Protein Ki67, welches als monoklonaler Antikörper eingesetzt werden kann. Ki67 erkennt ein in proliferierenden Zellen exprimiertes Zellkernantigen (Gerdes et al. 1983). Im Unterschied zu PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) und Bromodeoxyuridin, welche nur in der S-Phase des Zellzyklus markiert werden, wird Ki67 in den G₁-, S-, G₂- und M-Phasen detektiert. Ki67 wird zudem in der klinischen Anwendung zur Therapieevaluation bei Tumorerkrankungen, wie Hypophysenadenom (Honegger et al. 2003, Wolfsberger et al. 2004) und Mamakarzinom (Wirtz et al. 2016) verwendet.

Auch die Aktivität der Cyclin-abhängigen Kinasen (*cyclin dependent Kinases*, CDK) und deren Inhibitoren (Cyclin-Kinase-Inhibitoren, CKIs) geben Auskunft über die Zellaktivität. Je nach Zellzyklusphase variieren die Konzentrationen der Cycline (Draetta 1990, Sherr 1994). Nur Cyclin-D ist in allen aktiven Zellzyklusphasen vorhanden. Die Cyclin-D-Konzentration steigt in Zellen in der G₁-Phase langsam an, erreicht in der S-Phase ihren Höhepunkt und fällt am Ende der M-Phase wieder ab. Auch im klinischen Kontext ist die Bestimmung der Cyclin-D-Konzentration relevant, da mehrere Tumore, wie Nebenschilddrüsenadenom, Follikuläres Lymphom, Plattenepithel-, Mamma- und Ösophaguskarzinom, eine Überexpression aufweisen (Qie et al. 2016, Alao et al. 2007). Die Regulation von Cyclin-D geschieht über die CKIs, insbesondere über die Cip/Kip-Familie: p21, p27 und p57. Eine erhöhte Genexpression der CKIs spricht für einen Zellzyklusarrest (Kim et al. 2006). Senescente Zellen befinden sich dauerhaft im Zellzyklusarrest, sodass die Genexpression von CKIs als Seneszenzmarker zu bewerten ist. Zu den wichtigen Seneszenzmarkern zählen außerdem SA-β-Galactosidase und Gene, die an der Redox-Homöostase beteiligt sind. Diese werden im nächsten Abschnitt dieser Arbeit detailliert beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde die Proliferation anhand der Proliferationsmarker Ki67, p21 und p27 untersucht. Die beiden letztgenannten sind Zellzyklusarrestproteine.

An menschlichen Stammzellen wurde bereits das Proliferations- und Differenzierungspotenzial in unterschiedlichen Altersstufen der Spender experimentell verglichen. Bereits im Jahr 2004 konnte nachgewiesen werden, dass ASCs, die von alten Spendern isoliert wurden, nur eine beschränkte Differenzierungsfähigkeit besitzen (van Harmelen 2004). Diese Aussage konnte mit den Forschungsergebnissen des Teams um Wu bestätigt werden, denen zufolge ASCs von Spender zu Spender ein unterschiedlich ausgeprägtes Differenzierungspotenzial aufweisen und dies auf das Alter der Spender zurückzuführen ist (Wu et al. 2013). In einer experimentellen Arbeit von Bodle und Kollegen aus dem Jahr 2014 wurden menschliche ASCs in drei Gruppen (prämenopausale Gruppe: 24 - 36 Jahre, perimenopausale Gruppe: 48 - 55 Jahre und postmenopausale Gruppe: 60 - 81 Jahre) aufgeteilt und hinsichtlich ihres Proliferations- und Differenzierungspotenzials untersucht. Die Gruppen bestanden aus gepoolten Zellen der jeweiligen Altersgruppe. Im Gegensatz zum Differenzierungspotenzial wurde kein Unterschied bei der Proliferation festgestellt. Es wurde lediglich eine verminderte adipogene und osteogene Differenzierung in der peri- und postmenopausalen Gruppe nachgewiesen. Nicht untersucht wurde die Abhängigkeit von der Zelldichte. Es wurde kontinuierlich eine Zellzahlkonzentration von $1,3 \times 10^3$ Zellen/cm² verwendet. Die Proliferation wurde anhand einer Formel für das

kumulative Populationswachstum (*cumulative population doubling level*) untersucht. Als Seneszenzmarker wurden SA- β -Galactosidase, p21, p27 und p53 bis P9 bestimmt (Bodle et al. 2014).

Die Proliferation und das Differenzierungspotenzial hängen miteinander zusammen, jedoch sind die genauen Auswirkungen des Spenderalters auf die Proliferation bisher umstritten. Das Team um Chen an der Universität Cambridge geht davon aus, dass das Alter der Spender keinen Einfluss auf die Proliferation hat (Chen et al. 2012).

Eine Abnahme des Differenzierungspotenzials wurde in ASCs ab P15 von Arbeitsgruppe um Zuk nachgewiesen (Zuk et al. 2001). Dieses Phänomen wurde auch bei bASCs (*bovine adipose-derived stem cells*) beschrieben (Zhao et al. 2012). Dies legt nahe, dass nichtmenschliche Stammzellen den gleichen altersabhängigen Veränderungen unterliegen wie menschliche.

Erst im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, wie Proliferation und Seneszenz zusammenhängen, welche Rolle dabei das Alter der Probanden spielt und welchen Einfluss die Zelldichte auf die Proliferation hat. Dabei wurden unterschiedliche Zelldichte verwendet.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Proliferation der Zellen abhängig von der Zelldichte ist. Die Proliferation (untersucht anhand von Ki67) von jungen und alten Spendern unterscheidet sich in P6 nur bei einer Zellzahlkonzentration von 2×10^3 Zellen/cm²; bei zu niedriger Zelldichte proliferieren ASCs von alten Spendern langsamer (siehe Abb. 13). Dieser Unterschied wird in P16 größer. Bei 2×10^3 Zellen/cm², 4×10^3 Zellen/cm² und 2×10^4 Zellen/cm² proliferieren ASCs von alten Spendern langsamer. Sowohl eine zu niedrige als auch eine zu hohe Zelldichte schränkt die Proliferation der Zellen von alten Spendern ein. Die Zellen von jungen Spendern sind *ex vivo* weniger empfindlich gegenüber der Zellzahlkonzentration. Hingegen nimmt bei *in-vitro*-Alterung der Einfluss der Zelldichte auf die Proliferation zu, wobei der Unterschied zwischen jungen und alten Spendern schwindet.

Ab dem 45. Lebensjahr kommt es verstärkt zu altersabhängigen Veränderungen des Bewegungssystems, insbesondere zu einer Minderung der Knochenmasse (Knochenschwund, Osteopenie) und zu einer gestörten Remodellierung der Knochensubstanz (Osteoporose) während und nach der Menopause (Brockstedt et al. 1993, Riggs et al. 2002). Die zellulären und molekularen Mechanismen sind bislang nicht ausreichend erforscht. Es wurde lediglich die Auswirkung der Alterung auf BMSCs (*bone marrow-derived stem cells*) untersucht. Dabei

wurden die Zellen von Spendern unterschiedlichen Alters miteinander verglichen. Die BMSCs wurden in zwei Gruppen (jung: 18 - 29 Jahre, alt: 68 - 81 Jahre) aufgeteilt und bis zur maximalen Lebensspanne passagiert. Die Lebensspanne der Zellen konnte bei zunehmender Passagenzahl in drei Phasen unterteilt werden: in eine frühe Phase mit einem rapiden Zellwachstum, in der weniger als 50 % der Zellen die Seneszenz aufwiesen, in eine Zwischenphase mit reduziertem Zellwachstum (50 - 80 % der BMSCs mit Seneszenz), sowie in eine letzte Phase mit Zellwachstumsarrest (über 80 % der BMSCs mit Seneszenz). Die Zellen von alten Spendern erreichen die dritte Phase schneller als die Zellen von jungen Spendern (Stenderup et al. 2003).

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Ergebnissen wurde in Experimenten vom Team um Alt eine altersabhängige Reduktion der Proliferation in ASCs nachgewiesen, welche mit einer Seneszenz einherging (Alt et al. 2012). Untersucht wurden dabei stammzellassoziierte Marker, sowie p16, p53 und Caspasen, die im engen Zusammenhang mit der Einleitung der Apoptose stehen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden ASCs ebenfalls in zwei Gruppen aufgeteilt: jung (25 - 35 Jahre) und alt (55 - 60 Jahre). Bei zunehmender Passagenzahl nimmt die Proliferation in beiden Gruppen ab (siehe Abb. 14, 15). Die Proliferation ist jedoch in ASCs von alten Spendern stärker herabgesetzt. Das Fortschreiten des Alterungsprozesses und der zusätzliche zellkulturbedingte Stress lassen den Unterschied zwischen den Gruppen deutlicher hervortreten. Somit konnte die Theorie, dass die Alterung der Organismen mit dem Verlust der Proliferationsfähigkeit der Stammzellen einhergeht, bestätigt werden.

8.4 Die Korrelation der Expression von Seneszenzmarkern mit der Zellproliferation und der ROS-Bildung

Das zweitwichtigste Charakteristikum der Zellalterung sind Seneszenzmarker, welche mit einem erhöhten ROS-Level korrelieren (Lu und Finkel 2008). Oxidativer Stress wurde bereits als beteiligter Faktor am Alterungsprozess der Stammzellen beschrieben (Torella et al. 2004). Auf der Theorie der freien Radikale basiert die *Oxidative stress theory of aging* von R. S. Sohal (Sohal und Weindruch 1996, Sohal und Orr 2012). Dieser Theorie zufolge verändern sich mit dem Anstieg des ROS-Levels die Zellmorphologie und die Zellphysiologie. Der typische Marker für seneszente Zellen ist ein erhöhter Gehalt der SA- β -Galactosidase, was in zahlreichen Experimenten in seneszenten Zellen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nachgewiesen wurde (Dimri et al. 1995, Chen et al. 2007, Toussaint et al. 2000, Stenderup et al. 2003).

Dass die Zellen von alten Spendern im Gegensatz zu den Zellen junger Spender bereits nach wenigen PDs (*population doubling*) zur Seneszenz tendieren, wurde in der Literatur schon in den 70er Jahren beschrieben (Schneider und Mitsui 1976, Hayflick 1977). Choudhery und seine Kollegen haben im Jahr 2014 eine erhöhte SA- β -Galactosidase-Aktivität in hAT-MSCs (*human adipose tissue derived mesenchymal stem cells*) von alten Spendern festgestellt (Choudhery et al. 2014). Ein Anstieg der seneszenten Zellfraktion geht mit einem Abfallen der regenerativen Kapazität einher; dies wurde am Beispiel von Hepatozyten (Satyanarayana et al. 2003) und hämatopoetischen Stammzellen (Part et al. 2003) experimentell nachgewiesen. Weiterhin wurde eine Korrelation zwischen dem Anstieg des ROS-Levels und der Seneszenz beschrieben (Lu und Finkel 2008).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die SA- β -Galaktosidase und deren Korrelation mit dem ROS-Level untersucht. Es wurde nachgewiesen, dass ASCs von jungen Spendern in niedrigen Passagen eine geringere SA- β -Galactosidase-Aktivität sowie einen niedrigeren ROS-Gehalt zeigten als ASCs von alten Spendern (siehe Abb. 16, 18). Zudem wurde eine Erhöhung der SA- β -Galactosidase-Aktivität und des ROS-Levels in ASCs bei höheren Passagen im Vergleich zu jenen Zellen in niedrigen Passagen nachgewiesen. Damit konnte die Korrelation zwischen ROS-Bildung und SA- β -Galactosidase-Aktivität bestätigt werden. Diese Ergebnisse untermauern die Theorie der Entstehung altersabhängiger Krankheiten, der zufolge Stammzellen altern und während der Alterung ihre Proliferationsfähigkeit verlieren und zudem

die Charakteristika der Seneszenz aufweisen (gesteigerte SA- β -Galactosidase-Aktivität und erhöhter ROS-Gehalt).

Sirtuine und FoxO-Transkriptionsfaktoren (FoxOs) sind sowohl an der Abwehr von oxidativem Stress als auch an der Einleitung der Seneszenz und der Induktion der Apoptose beteiligt. Zudem werden weitere wichtige Prozesse, wie Zellzyklus und Glucosemetabolismus von FoxOs kontrolliert. Eine Aktivierung von FoxOs erfolgt durch Phosphorylierung, Acetylierung oder Ubiquitinierung. Je nach Aktivierung werden entsprechende Funktionen ausgeführt. Zudem besteht ein Rückkopplungsmechanismus: FoxO3a stimuliert die Expression der FoxO-Gene. Durch die Phosphorylierung wird FoxO3a deaktiviert. Dies führt zu einer verminderten Expression der FoxO-Gene. Eine Überexpression von FoxOs führt den Zellzyklusarrest herbei, da FoxOs den Kinase-Inhibitor p27 aktivieren. Das Protein p27 verhindert wiederum den Übergang von der G₁- in die S-Phase (Medema et al. 2000, Collado et al. 2000).

Redox-Homöostase wird durch die Deacetylierung von FoxOs durch Sirtuine reguliert. FoxOs aktivieren durch Transkription antioxidative Gene, wie SOD2, Katalase und Peroxidredoxin, die dem oxidativen Stress entgegenwirken und eine erhöhte Lebensspanne fördern. Mit zunehmendem Alter sowie beim Passagieren wird die Effektivität des antioxidativen Systems gemindert (Zheng und Lu 2011). Dieser Effekt zeigt sich in der Herunterregulation der Genexpression von FoxO3a. Zudem wird eine signifikant verminderte Aktivität der FoxO-Transkriptionsfaktoren bei degenerativen Prozessen in menschlichen Bandscheiben (*intervertebral disc*, IVD) beschrieben (Alvarez-Garcia et al. 2017). Bei der Untersuchung der FoxOs in menschlichen degenerativen Bandscheiben wurde eine Herunterregulation von FoxO1 und FoxO3 nachgewiesen, jedoch nicht von FoxO4. In der gleichen Veröffentlichung wurden Bandscheiben von Mäusen unterschiedlicher Altersgruppen untersucht, wobei eine altersabhängige reduzierte FoxO-Genexpression in zervikalen und lumbalen Bandscheiben nachgewiesen werden konnte.

Mit zunehmendem Alter sinkt auch die Aktivität der Sirtuine (Ramsey et al. 2009). Eine altersabhängige Herunterregulation von Sirt1 wurde auch in Zellen festgestellt, die aus der vorderen Linsenkapsel entnommen wurden. Dabei zeigte sich ein Anstieg von Sirt1 in Zellen von Probanden mit altersabhängigem Katarakt im Vergleich zu gesunden alten Probanden (Zheng und Lu 2011).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine tendenzielle altersabhängige Herunterregulation von FoxO3a und Sirt1 in ASCs nachgewiesen (siehe Abb. 17). Die altersabhängige verminderte Proliferation scheint in ASCs nicht durch eine Überexpression von FoxOs bedingt zu sein. Der FoxO-abhängige Signalweg über p27 zeigte ebenso keinen Unterschied zwischen den Altersgruppen (siehe Abb. 15 A). Die Hochregulation der Genexpression von p27 in Zellen von jungen Spendern *in vitro* kann durch FoxO-unabhängige Signalwege, zum Beispiel über p53, zustande gekommen sein.

Eine direkte Interaktion von Sirt1 mit FoxO3a wurde in Fibroblasten bei einer oxidativen Stressreaktion nachgewiesen, welche durch H₂O₂, Menadion oder Hitzeschock induziert wurde (Brunet et al. 2004). Auf die induzierte oxidative Stressreaktion wird im nächsten Kapitel der vorliegenden Arbeit eingegangen.

8.5 Der Einfluss von exogenen ROS

Die Theorie der freien Radikale besagt, dass die Alterung durch die schädliche Wirkung der freien Radikale hervorgerufen wird. ROS ist in Zellen sowohl an physiologischen als auch an pathologischen Prozessen beteiligt (Nissanka und Moraes 2018). Dabei ist die Menge der ausgesetzten freien Radikale und die Effektivität des entgegenwirkenden Redoxsystems entscheidend. Eine Überproduktion von ROS bei insuffizientem antioxidativen System kann zu zellulären Schäden, wie Mutationen oder Deletionen der mitochondrialen DNA, Lipidperoxidationen und Störungen in der zellulären Atmungskette führen (Massaad und Klann 2011). Der Zustand, in dem keine Zellteilung mehr stattfindet und ein dauerhafter Zellzyklusarrest herrscht, etwa bei der Alterung, wird als Seneszenz bezeichnet.

Im Unterschied zur replikativen Seneszenz, die beim Erreichen der maximalen Anzahl an Teilungen (Hayflick-Limit) mit einer Telomärenverkürzung einhergeht, tritt eine prämaturre Seneszenz bereits zuvor aufgrund der schädlichen Wirkung von Umweltfaktoren ein. Diese spezielle Art prämaturer Seneszenz wird daher auch stressinduzierte prämaturre Seneszenz (SIPS) genannt (Zhang 2007, Toussaint et al. 2000). Oxidativer Stress ist die am häufigsten nachgewiesene Ursache für SIPS. Jedoch sind Zellen unterschiedlich empfindlich gegenüber oxidativem Stress und der Konzentration von freien Radikalen. Um eine subletale Dosis des

Wasserstoffperoxids in den Experimenten einsetzen zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit zuerst die Empfindlichkeit von ASCs gegenüber H_2O_2 mittels EthD-2 untersucht. Dabei wurden unterschiedliche Konzentrationen für die Inkubation verwendet.

Das Team um Higuchi am *Centre for Eye Research Australia* hat die Auswirkung von oxidativem Stress auf die adipogene Differenzierung untersucht (Higuchi et al. 2013). Dabei wurden ASCs für acht Tage mit $100 \mu\text{M}$ H_2O_2 inkubiert. Durch die Inkubation wurde die adipogene Differenzierung stimuliert. Das Team um Taskiran und Evren hat verschiedene Konzentrationen ($1\text{--}400 \mu\text{M}$) von H_2O_2 eingesetzt, vier Stunden inkubiert und die protektive Wirkung von Estradiol (E2) untersucht (Taskiran und Evren 2012). Es wurde eine hohe Letalität der ASCs nach der Inkubation mit $400 \mu\text{M}$ H_2O_2 festgestellt. Dabei entsprach $200 \mu\text{M}$ H_2O_2 einer LD_{50} . In einem anderen Experiment wurden ASCs nach einer 24-stündigen Inkubation mit den Radikalfängern VOR (Vitexin-2''-O-rhamnosid) und VOG (Vitexin-4''-O-glucoside) für weitere vier Stunden mit $500 \mu\text{M}$ H_2O_2 inkubiert (Wei et al. 2014). Die Zellen zeigten nach der Inkubation mit $500 \mu\text{M}$ H_2O_2 ohne vorherige Behandlung mit Radikalfängern eine deutliche Reduktion der Zellzahl und morphologisch Veränderungen, wie eine Verminderung des Zellkörpervolumens, den Verlust der Membranintaktheit und der Adhärenz. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass eine subletale Dosis von H_2O_2 ($200 \mu\text{M}$) eine prämaturne Seneszenz in hMESC (*human endometrium-derived mesenchymal stem cells*) verursacht. Dies äußert sich in einer phänotypischen Veränderung, dem Verlust der Ki67-Aktivität, einer Hochregulation der SA- β -Galactosidase-Aktivität und des Zellzyklusarrestproteins p21, sowie in einer Hochregulation der Genexpression der antioxidativen Enzyme SOD1, SOD2 und GTP1 (Burova et al. 2013). Aus diesen Veröffentlichungen geht hervor, dass die Widerstandsfähigkeit der ASCs gegenüber Wasserstoffperoxid variiert und von mehreren Faktoren, wie der Zelldichte, der Zusammensetzung des Mediums und des Vorhandenseins verschiedener Substanzen, abhängt. Eine Inkubation mit einer Kombination aus Radikalfängern und Wasserstoffperoxid kann die Zelle vor oxidativem Stress schützen, dieser Schutz hängt jedoch von der Menge der Substanzen, die das antioxidative System stärken, und von der Menge des Wasserstoffperoxids ab.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass durch die Inkubation mit $1 \mu\text{M}$ und 500 nM H_2O_2 weniger ASCs von jungen Spendern absterben als von alten (siehe Abb. 19). Dies bedeutet, dass die Effektivität des antioxidativen Systems in Zellen von jungen Spendern höher ist. Während der Alterung in Zellkultur lässt die Effektivität dieses Systems nach, was

sich in einer höheren Empfindlichkeit gegenüber Wasserstoffperoxid äußert. Als subletale Konzentration wurden in den Versuchen zum Einfluss von exogenen ROS auf die Proliferation- und Seneszenzmarker 250 nM H₂O₂ eingesetzt, da diese Konzentration keine Wirkung auf die Vitalität gezeigt hatte.

Um in den Zellen oxidativen Stress zu verursachen, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine subletale Dosis H₂O₂ (250 nM) eingesetzt und zwei Stunden lang inkubiert. Die ROS-Wirkung auf die Proliferation ist eindeutig. Beim Anstieg des mitochondrialen ROS-Levels in Präadipozyten wurde eine Inhibition der Proliferation nachgewiesen (Carrière et al. 2003). Durch die Zugabe von ROS wurde in dieser Arbeit ebenso eine Herunterregulation des Ki67-Proliferationsmarkers in P16 bei ASCs junger und alter Spender nachgewiesen (siehe Abb. 20 A). Dass in P6 exogenes Wasserstoffperoxid keine Wirkung auf die Ki67-Expression hat, lässt sich damit erklären, dass ASCs in relativ niedrigen Passagen noch ein starkes antioxidatives System besitzen. Die Genexpression von p21 wurde durch die Wasserstoffperoxid-Exposition *ex vivo* sowohl in Zellen von jungen als auch von alten Spendern hochreguliert (siehe Abb. 20 C). Eine Hochregulation der Genexpression von p21 wurde auch in Zellen von jungen Spendern *in vitro* festgestellt. In der Literatur ist ein Anstieg der p21-Aktivität nach der H₂O₂-Inkubation in Keratozyten (Ido et al. 2012), sowie nach der Inkubation mit Indoxylsulfat (Superoxid) in hASMCs (*human aortic smooth muscle cells*) beschrieben (Muteliefu et al. 2012). Hingegen wurde im Rahmen dieser Arbeit festgestellt, dass die Genexpression von p27 sowohl in P6 als auch in P16 nur tendenziell hochreguliert wird (siehe Abb. 20 B). In T24-Zellen (gewonnen aus einem humanen urothelialen Karzinom) wurde bei einer dualen Immunfluoreszenz-Färbung nach wiederholten BCG-Expositionen (Bacillus Calmette-Guérin) nachgewiesen, dass 10% der p21-Aktivität im Zellkern im Gegensatz zur zytoplasmatischen p21-Aktivität unabhängig von p27 war (Watanabe et al. 2019). Obwohl die beiden Zellzyklusregulatoren p21 und p27 zur Cip/Kip-Familie der CKIs gehören, sind sie nicht äquivalent. Folglich kann von einer verminderten Proliferation durch eine Hochregulation von p21 und eine Herunterregulation von Ki67 gesprochen werden, auch wenn p27 dabei keine wesentliche Aktivierung zeigte.

Um herauszufinden, welche Wirkung Wasserstoffperoxid auf die Seneszenz hat, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Aktivität der SA- β -Galactosidase mittels des *Quantitative Cellular Senescence Assay Kit* sowie die Genexpression von Sirt1 und FoxO3a mittels der semiquantitativen PCR untersucht. Der stimulierende Effekt von H₂O₂ auf die SA- β -

Galactosidase-Aktivität konnte in allen Gruppen gezeigt werden (siehe Abb. 21 A). Das heißt, dass durch die Inkubation mit H_2O_2 der Anteil der seneszenten Zellen gestiegen ist. Zahlreiche in der Literatur beschriebene Experimente konnten nachweisen, dass oxidativer Stress in mesenchymalen Stammzellen stressbedingte prämaturre Seneszenz *in vitro* verursacht (Brandl et al. 2011, Ko et al. 2012). Das Team um Dimri beschrieb eine *in vivo* erhöhte SA- β -Galactosidase-Aktivität in den Epithelzellen von alten Spendern (Dimri et al. 1995). Außerdem wurde gezeigt, wie sich nach der H_2O_2 -Inkubation (zwei Mal innerhalb von fünf Tagen) die prämaturre Seneszenz in Keratozyten einstellte, welche durch ein Absinken der DP und eine Zunahme der SA- β -Galactosidase-positiven Zellen charakterisiert ist (Bernard et al. 2001). Neben morphologischen Veränderungen weisen die Zellen mit prämaturer Seneszenz eine erhöhte Aktivität der SA- β -Galactosidase und einen dauerhaften Zellzyklusarrest auf (Dumont et al. 1999, Toussaint et al. 2000). Die Ergebnisse dieser Arbeit stimmen mit den in der Literatur beschriebenen Zusammenhängen zwischen der Alterung (sowohl *ex vivo* als auch *in vitro*) und der SA- β -Galactosidase-Aktivität überein.

Um die Ursache und den Mechanismus der Seneszenz zu verstehen und um den Zusammenhang zwischen Seneszenz und Alterung zu untersuchen, wurde eine Vielzahl an Experimenten durchgeführt (Campisi und d'Adda di Fagagna 2007, Momtaz und Abdollahi 2012, Rodier und Campisi 2011). Aufgrund der etymologischen Herleitung des Wortes *senex* (lat.: alt) kann der Begriff der zellulären Seneszenz als Synonym für die Zellalterung verwendet werden. Er kann aber auch die Vorstufe der Zellalterung bezeichnen. Als ein Mechanismus für stressinduzierte Seneszenz wird ein p16-vermittelter Zellzyklusarrest beschrieben. Dieser Mechanismus findet jedoch nicht in allen Zellen statt (Campisi und d'Adda di Fagagna 2007). Ein weiterer Mechanismus ist ein p21- und/oder p27-vermittelter Zellzyklusarrest, der durch unterschiedliche Signalwege eingeleitet werden kann, die oben beschrieben wurden.

Das wichtige regulatorische Protein der Gruppe III Deacetylase, Sirt1, ist an der Bekämpfung von oxidativem Stress beteiligt. Es kann durch den FoxO-Signalweg die Expression von Antioxidantien stimulieren. Auch die FoxO-Transkriptionsfaktoren induzieren die Expression von intrazellulären Antioxidantien (Finkel 2011). In einem anderen Experiment wurde demonstriert, dass eine verminderte Expression von antioxidativen Proteinen, etwa Superoxid-Dismutase und Katalase, durch einem Mangel an FoxO-Transferasen in HSCs (*hematopoietic stem cells*) hervorgerufen wird. Dies geht mit einem Anstieg des ROS-Levels einher (Tothova und Gilliland 2007). Die Stimulation der endogenen FoxOs durch das ROS-Level wirkt auf die

pro-apoptotischen Gene ebenfalls stimulierend (Nakamura und Sakamoto 2008). Eine Einleitung der Apoptose als Antwort auf den oxidativen Stress wird über den Molekularsignalweg, inklusive der Proteinkinase B/Akt, der FoxOs sowie der stressaktivierten Kinasen (JNK und p38MAPK) reguliert (Hampton und Orrenius 1997, Park et al. 2009, Thornton und Rincon 2009). Eine Hochregulation der FoxOs korreliert jedoch nicht mit dem Anstieg von SA- β -Galactosidase in Zellen, da diese lediglich eine Aussage über das Vorliegen von Seneszenz macht und kein Marker für Apoptose ist.

Die weiteren im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Seneszenzmarker, Sirt1 und FoxO3a, wiesen nach der Inkubation mit Wasserstoffperoxid keine Veränderungen auf (siehe Abb. 21 B, C). Dass sich die Genexpression dieser beiden Seneszenzmarker nicht signifikant verändert hat, könnte ein Hinweis auf eine größere Widerstandsfähigkeit der Stammzellen gegenüber einer geringen Menge von exogenen ROS sein. Die unveränderte Genexpression von Sirt1 und FoxO3a bei der Zugabe von 250 nM H₂O₂ deutet auf eine kompensatorische Stressantwort hin, da eine Dekompensation mit einer Veränderung der Genexpression einhergehen würde. Es gibt Hinweise, dass sich Stammzellen, im Unterschied zu ausdifferenzierten Zellen, wirksam gegen oxidativen Stress wehren können (Kim et al. 2011, Noble et al. 2011). Des Weiteren besitzen Zellen unterschiedliche Signalwege zur Einleitung der Seneszenz (siehe Abschnitt 4.4). Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine erhöhte Seneszenz anhand der SA- β -Galactosidase-Aktivität, ohne Hinweise auf eine Beteiligung von Sirt1 und FoxO3a, nachgewiesen wurde, könnte ein Sirt1-FoxO3a-unabhängiger Signalweg für die Seneszenz in Frage kommen.

8.6 Der Einfluss von Radikalfängern auf die Expression von Seneszenzmarkern und die Zellproliferation

Das ROS-Level trägt nicht nur zur Alterung, sondern auch zur Entstehung von altersabhängigen Krankheiten bei (Harman 1956). Der Einsatz der Radikalfänger stellt eine Möglichkeit dar, den Alterungsprozess zu verlangsamen und altersabhängige Krankheiten zu vermeiden. Es wurden zahlreiche Experimente durchgeführt, in denen Antioxidantien eingesetzt wurden, um einen positiven Effekt auf das Redoxsystem nachzuweisen. In hADMSCs (*human adipose-derived mesenchymal stem cells*) wurde nach der Inkubation mit Antioxidantien (N-acetyl-L-cystein

und L-ascorbicacid-2-phosphatase) ein Absinken der CDK-Inhibitoren p21 und p27 nachgewiesen (Sun et al. 2013). Das heißt, dass durch die Antioxidantien die Proliferation gefördert und der durch oxidativen Stress verursachte Zellzyklusarrest vermieden wird. Antioxidantien wurden erfolgreich eingesetzt, um Osteogenese in ASCs zu beschleunigen. Nach einer fünftägigen Inkubation mit 1 μM Fullerol wurde ein verringertes ROS-Level in den ASCs gemessen (Yang et al. 2014). Auch Resveratrol wurde als Antioxidans in Experimenten an humanen Keratozyten verwendet, wobei festgestellt wurde, dass durch die Resveratrol-Inkubation über den AMPK-Foxo3a-Signalweg eine H_2O_2 -induzierte Seneszenz verhindert und die Proliferation gefördert wurde. Zudem wurde durch Resveratrol eine Aktivierung der Sirtuine beobachtet (Frescas et al. 2005). Sirt1 ist wiederum an der Redox-Homöostase beteiligt (Yasuo et al. 2014). Hingegen haben Antioxidantien keine Wirkung auf die Stammzellplastizität (Yu et al. 2014).

NMPG (*N*-2-mercaptopropionyl-glycine) besitzt die Fähigkeit, intrazelluläre freie Radikale unschädlich zu machen. Bei einem am Tiermodell untersuchten Herz mit Ischämie-Reperfusion wurde nach der NMPG-Inkubation eine verringerte Größe der Infarktstelle beschrieben (Beyersdorf et al. 1989, Koerner et al. 1991). In der vorliegenden Arbeit konnte nach der NMPG-Inkubation (100 μM) bei ASCa in P16 eine Stimulation der Proliferation gezeigt werden, die mittels Ki67 untersucht wurde (siehe Abb. 22 A). Die SA- β -Galactosidase-Aktivität und die Genexpression von p27, p21, Sirt1 und FoxO3a wurden nicht beeinflusst.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Trolox, ein Vitamin-E-Derivat (*L*-ascorbic acid 2-phosphatase), als weiteres Antioxidans verwendet. Es konnte eine Stimulation der Proliferation nach der Trolox-Inkubation (100 μM) in P16 sowohl durch Ki67 in ASCj als auch durch die Genexpression von p27 in ASCa nachgewiesen werden (siehe Abb. 22 B, D). Zudem sank der Anteil der SA- β -Galactosidase-positiven Zellen nach der Trolox-Inkubation bei ASCa in P6 (siehe Abb. 23 B). Allerdings konnte keine Trolox-Wirkung auf die Genexpression von p21, Sirt1 und FoxO3a festgestellt werden.

Aus dem im Rahmen der vorliegenden Arbeit festgestellten diffusen Einfluss der Radikalfänger auf die Proliferation und die Seneszenz lässt sich keine allgemeine Aussage ableiten. Wie die Untersuchungen gezeigt haben, war eine einmalige Inkubation mit den untersuchten Radikalfängern in der verwendeten Konzentration nicht ausreichend, um der bereits eingetretenen Seneszenz entgegenzuwirken und die Proliferation wirksam zu stimulieren. In einer weiterführenden Arbeit könnten mehrfache Inkubationen mit Radikalfängern und

gegebenenfalls in höheren Konzentrationen zu einem deutlich ausgeprägten positiven Effekt führen.

8.7 Stärken und Limitationen des Versuchsdesigns

Die wichtigsten Anforderungen, die gemäß den Minimalkriterien der ISCT zur Isolation und Charakterisierung der ASCs eingehalten werden müssen (Bourin et al. 2013), werden von der vorliegenden Arbeit erfüllt. Trotzdem weist die Untersuchung Limitationen auf, die bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden müssen.

Zellproben: Die Zellen der im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente wurden in möglichst homogene Gruppen aufgeteilt. Es wurden ausschließlich ASCs verwendet, die von weiblichen Spendern durch Liposuktion gewonnen wurden. Zudem wurden die Altersgruppen mit ausreichendem Abstand generiert. Außerdem wurden die untersuchten Passagen anhand der Alterungskriterien *in vitro* ausgewählt. Da es viele Ausschlusskriterien gab, blieb die Gruppengröße relativ klein. Relativ große Gruppen von vergleichbaren Untersuchungen stammen meistens aus gepoolten Proben.

Repräsentativität der Zellproben und Verallgemeinbarkeit: die Kriterien für das Versuchsdesign waren Geschlecht, Alter und Gesundheitszustand. Diese drei Kriterien schränken die Repräsentativität der Ergebnisse ein. Zur Aussagengeneralisierung wären Untersuchungen an ASCs männlicher Spender notwendig sowie vergleichbare Stichproben von Spendern mit altersabhängigen Erkrankungen. Repräsentativer wären Untersuchungen an verschiedenen Stammzellen aus bevölkerungsrepräsentativen Stichproben. Dieser organisatorische und finanzielle Aufwand war im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht umsetzbar.

Methodik der Untersuchung: Der fehlende Nachweis einer signifikanten Wirkung der Radikalfänger könnte an den ausgewählten Radikalfängern (Trolox und NMPG), an der verwendeten Konzentration (100 μ M) oder an der Untersuchungsmethode (semiquantitative PCR) liegen. Eine genauere Aussage über die Genexpression ließe sich mittels der qPCR treffen, welche im Rahmen dieser Arbeit aus forschungsökonomischen Gründen nicht durchgeführt werden konnte. Aus den genannten Gründen wurden Proteinuntersuchungen

mittels ICC durchgeführt; hier könnte ein materialaufwendiger Western Blot zur Proteinuntersuchung aussagekräftigere Ergebnisse liefern. Weiterführende Untersuchungen mit höherer Konzentration der Radikalfänger, längerer Inkubationszeit oder wiederholter Inkubation würden die Erkenntnisse über die Wirkung der Radikalfänger ergänzen. Diese Untersuchungen könnten Gegenstand einer nachfolgenden Forschungsarbeit sein.

Die wichtigsten Limitationen der vorliegenden Arbeit ergaben sich aus den relativ kleinen Stichproben sowie aus den Untersuchungsmethoden der Genexpression, die aus forschungsökonomischen Gründen ausgewählt wurden.

9. Schlussfolgerung

Beim Altern werden grundlegende Funktionen der Stammzellen, wie Proliferation, Differenzierung und Widerstandsfähigkeit gegen oxidativen Stress herabgesetzt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass sich die Proliferation *ex vivo* (P6) in ASCs von jungen und alten Spendern nicht unterscheidet. Der einzige Unterschied ergab sich bei der Untersuchung des Proliferationsmarkers Ki67 bei einer Zelldichte von 2×10^3 Zellen/cm²; hier zeigte sich bei ASCj eine höhere Proliferationsrate als bei ASCa. Allerdings konnte ein signifikanter Anstieg des ROS-Gehaltes *ex vivo* in ASCa nachgewiesen werden. Zudem wurde in ASCs von alten Spendern eine erhöhte Aktivität der SA- β -Galactosidase, sowie eine höhere Empfindlichkeit gegenüber 500 nM und 1 μ M H₂O₂ festgestellt. Die Genexpression von Sirt1 und FoxO3a zeigte in ASCs von jungen und alten Spendern keinen Unterschied. Bei der *in-vitro*-Alterung (P16) wurde eine Herunterregulation der Proliferation, sowie eine Hochregulation der Seneszenzmarker und ein erhöhtes ROS-Level nachgewiesen. Zudem wurde festgestellt, dass sich in P16 der Anteil der letalen Zellen nach der H₂O₂-Inkubation mit 500 nM und 1 μ M erhöhte.

Folglich war die *ex-vivo*-Alterung (Vergleich von ASCj mit ASCa in niedriger Passage) weniger ausgeprägt als die *in-vitro*-Alterung (Vergleich von P6 mit P16).

Freie Radikale werden für die prämatüre Seneszenz und altersabhängige Erkrankungen verantwortlich gemacht. Die Inkubation mit 250 nM H₂O₂ zeigte sowohl einen Einfluss auf die Proliferation als auch auf die Seneszenz. Eine negative Wirkung auf die Proliferation war bei Ki67 und p21 ersichtlich, die Genexpression von p27 blieb unbeeinflusst. Während der Seneszenzmarker SA- β -Galactosidase-Aktivität durch H₂O₂-Inkubation stimuliert wurde, konnte kein Einfluss der H₂O₂-Inkubation auf die anderen beiden Seneszenzmarker, Sirt1 und FoxO3a, festgestellt werden.

Die Inkubation mit den Radikalfängern Trolox und NMPG lieferte weder hinsichtlich der Proliferation noch hinsichtlich der Seneszenz ein aussagekräftiges Ergebnis.

Zusammenfassend hat die zellkulturbedingte Alterung eine stärkere Auswirkung auf die Proliferation und die Seneszenz als das Alter der Spender. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen die Theorie der freien Radikale, der zufolge die Alterung durch freie Radikale

- Schlussfolgerung -

verursacht wird. Dieser Prozess wird von exogenen freien Radikalen beschleunigt. Die Auswirkung von freien Radikalen kann durch die untersuchten Radikalfänger nicht aufgehoben werden. Eine effektive Möglichkeit, freien Radikalen entgegen zu wirken, ist von großer klinischer Bedeutung und die Suche danach wäre eine wichtige Aufgabe für nachfolgende Forschungsarbeiten.

10. Literaturverzeichnis

- Alao JP. The regulation of cyclin D1 degradation: roles in cancer development and the potential for therapeutic invention. *Mol Cancer*. 2007;6:24. Published 2007 Apr 2. doi:10.1186/1476-4598-6-24
- Alcendor R. R, Gao S, Zhai P. et al. 2007. Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart. *Circulation Research*, Vol. 100, No. 10, Pages 1512–1521, 2007.
- Alt EU, Senst C, Murthy SN, Slakey DP, Dupin CL, Chaffin AE, Kadowitz PJ, Izadpanah R. 2012. Aging alters tissue resident mesenchymal stem cell properties. *Stem Cell Res*, 8 (2):215-225.
- Arslan-Ergul AI, Ozdemir AT, Adams MM. Aging, neurogenesis, and caloric restriction in different model organisms. *Aging Dis*. 2013 Jun 17;4(4):221-32.
- Alvarez-Garcia O, Matsuzaki T, Olmer M, Masuda K, Lotz MK. Age-related reduction in the expression of FOXO transcription factors and correlations with intervertebral disc degeneration. *J Orthop Res*. 2017 Apr 21. doi:10.1002/jor.23583.
- Bai P, Cant' o C, Oudart H. et al. 2011. PARP-1 inhibition increases mitochondrial metabolism through SIRT1 activation. *Cell Metabolism*, Vol. 13, No. 4, Pages 461–468, 2011.
- Barja G, Cadenas S, Rojas C, López-Torres M, Pérez-Campo R. A decrease of free radical production near critical targets as a cause of maximum longevity. *Comp Biochem Physiol* 1994;108B:501–512.
- Barja G. Aging in vertebrates and the effect of caloric restriction: a mitochondrial free radical production-DNA damage mechanism? *Biol Rev* 2004;79:235–251.
- Bekhite MM, Finkensieper A, Rebhan J, Huse S, Schultze-Mosgau S, Figulla HR, Sauer H, Wartenberg M. Hypoxia, leptin, and vascular endothelial growth factor stimulate vascular endothelial cell differentiation of human adipose tissue-derived stem cells. *Stem Cells Dev*. 2014 Feb 15;23(4):333-51.
- Bernard D, Mont D, Vandebunder B, Abbadie C. 2001. Involvement of REL/NF-B Transcription Factors in Cellular Senescence. *The Scientific World JOURNAL*, 1:67-67.
- Beyersdorf F, Fuchs J, Eberhardt B, Stauder M, Satter P, Zimmer G. 1989. Myocardial protection by 2-mercaptopyrionylglycine during global ischemia in dogs. *Arzneimittelforschung* 1989 Jan;39(1):46-9.
- Bianco P, Robey PG. 2001. Stem cells in tissue engineering. *Nature* 414 :118-121
- Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. 2012. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *WAO Journal* □ January 2012.
- Bodle JC, Teeter SD, Hluck BH, Hardin JW, Bernacki SH, Lobo EG. Age-related effects on the potency of human adipose-derived stem cells: creation and evaluation of superlots and implications for musculoskeletal tissue engineering applications. *Tissue Eng Part C Methods*. 2014 Dec;20(12):972-83.
- Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL, Redl H, Rubin JP, Yoshimura K, Gimble JM. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy*. 2013 Jun;15(6):641-8.
- Brandl A, Meyer M, Bechmann V, Nerlich M, Angele P. 2011. Oxidative stress induces senescence in human mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res*, 317 (11):1541-1547.

- Brunet A, Sweeney L. B, Sturgill J. F. et al. 2004. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science*, Vol. 303, No. 5666, Pages 2011–2015, 2004.
- Bunnell BA, Flaat M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C. 2008. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods*, 45 (2):115-120.
- Burova E, Borodkina A, Shatrova A, Nikolsky N. 2013. Sublethal oxidative stress induces the premature senescence of human mesenchymal stem cells derived from endometrium. *Oxid Med Cell Longev*, 2013:474931. doi: 10.1155/2013/474931. Epub 2013 Aug 25. PMID: 24062878; PMCID: PMC3767075.
- Caito S, Rajendrasozhan S, Cook S. et al. 2010 SIRT1 is a redoxsensitive deacetylase that is post-translationally modified by oxidants and carbonyl stress. *The FASEB Journal*, Vol. 24, No.9, Pages 3145–3159, 2010.
- Chandrasekaran A, Idelchik MD, Melendez JA. Redox control of senescence and age-related disease. *Redox Biol*. 2016 Nov 16;11:91-102. doi: 10.1016/j.redox.2016.11.005.
- Cant'ó C, Houtkooper R. H, Pirinen E. et al. 2012. The NAD⁺ precursor nicotinamide riboside enhances oxidative metabolism and protects against high-fat diet-induced obesity. *Cell Metabolism*, Vol. 15, No. 6, Pages 838–847, 2012.
- Canton M, Neverova I, Menabò R, Van Eyk J, Di Lisa F. Evidence of myofibrillar protein oxidation induced by postischemic reperfusion in isolated rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004 Mar;286(3):H870-7. doi: 10.1152/ajpheart.00714.2003. PMID: 14766672.
- Campisi J. Cancer, aging and cellular senescence. *In Vivo*. 2000 Jan-Feb; 14(1):183-8. PMID: 10757076.
- Campisi J, d'Adda di Fagagna F. 2007. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Sep;8(9):729-40. doi: 10.1038/nrm2233. PMID: 17667954.
- Carrière A, Fernandez Y, Rigoulet M, Pénicaud L, L. aC. 2003. Inhibition of preadipocyte proliferation by mitochondrial reactive oxygen species. *FEBS Lett* 2003; 550(1-3):163-167.
- Castello G, Costantini S, Scala S. Targeting the inflammation in HCV-associated hepatocellular carcinoma: a role in the prevention and treatment. *J Transl Med*. 2010 Nov 3;8:109. doi: 10.1186/1479-5876-8-109. PMID: 21047421; PMCID: PMC2991329.
- Charles V. Mobbs, Kelvin Yen, Patrick R. Hof. Mechanisms of Dietary Restriction in Aging and Disease. *Aging—physiology*. W1 IN679 v.35 2007 / WT.116 M486 2007
- Chen HT, Lee MJ, Chen CH, Chuang SC, Chang LF, Ho ML, Hung SH, Fu YC, Wang YH, Wang HI, Wang GJ, Kang L, Chang JK. 2012. Proliferation and differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells isolated from elderly patients with osteoporotic fractures. *J Cell Mol Med*, 16 (3):582-593.
- Chen J, Ozanne SE, Hales CN. Methods of cellular senescence induction using oxidative stress. 2007. *Methods Mol Biol* 371: 179–189.
- Choi YJ, Lee JY, Chung CP, Park YJ. Cell-penetrating superoxide dismutase attenuates oxidative stress-induced senescence by regulating the p53-p21(Cip1) pathway and restores osteoblastic differentiation in human dental pulp stem cells. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:5091-106. doi: 10.2147/IJN.S31723. Epub 2012 Sep 21. PMID: 23049256; PMCID: PMC3459692.
- Choudhery MS, Badowsk M, Muise A, Pierce J, Harris DT. 2014. Donor age negatively impacts adipose tissue-derived mesenchymal stem cell expansion and differentiation. *Journal of Translational Medicine* 2014, 12:8.
- Cohnheim JF. 1967. Über Entzündung und Eiterung. *Pathol Anat Physiol Klin Med* 40:1-79

- Cuevas-Diaz Duran R, Gonzalez-Garza MT, Cardenas-Lopez A, Chavez-Castilla L, Cruz-Vega DE, Moreno-Cuevas JE. 2013. Age-related yield of adipose-derived stem cells bearing the low-affinity nerve growth factor receptor. *Stem Cells Int*, 2013:372164.
- Cui Z, Shen L, Lin Y, Wang S, Zheng D, Tan Q. 2014. Inhibition of oxygen-glucose deprivation-induced apoptosis of human adipose-derived stem cells by genetic modification with antiapoptotic protein bcl-2. *Aesthetic Plast Surg*, 38 (4):779-787.
- Daher SR, Johnstone BH, Phinney DG, March KL. 2008. Adipose stromal/stem cells: basic and translational advances: the IFATS collection. *Stem Cells*, 26 (10):2664-2665.
- Dao-Fu Dai YAC, David J Marcinek, Hazel H Szeto and Peter S Rabinovitch. 2014. Mitochondrial oxidative stress in aging and healthspan. *Dai et al Longevity & Healthspan* 2014, 3:6.
- Dawane J. S. und Pandit V. A. Understanding Redox Homeostasis and Its Role in Cancer. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2012 December, Vol-6(10): 1796-1802. DOI: 10.7860/JCDR/2012/4947.2654
- De Barros S, Dehez S, Arnaud E, Barreau C, Cazavet A, Perez G, Galinier A, Casteilla L, Planat-Benard V. 2013. Aging-related decrease of human ASC angiogenic potential is reversed by hypoxia preconditioning through ROS production. *Mol Ther*, 21 (2):399-408.
- Delorme B, Chateauvieux S, Charbord P. The concept of mesenchymal stem cells. *Regen Med*. 2006 Jul; 1(4):497-509. doi: 10.2217/17460751.1.4.497. PMID: 17465844.
- Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, Peacocket M, Campisi J. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 Sep 26;92(20):9363-7.
- Ding DC, Chou HL, Hung WT, Liu HW, Chu TY. 2013. Human adipose-derived stem cells cultured in keratinocyte serum free medium: Donor's age does not affect the proliferation and differentiation capacities. *Journal of Biomedical Science* 2013, 20:59.
- 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.
- Dong CM, Wang XL, Wang GM, Zhang WJ, Zhu L, Gao S, Yang DJ, Qin Y, Liang QJ, Chen YL, Deng HT, Ning K, Liang AB, Gao ZL, Xu J. 2014. A stress-induced cellular aging model with postnatal neural stem cells. *Cell Death Dis*, 5:e1116.
- Draetta G. 1990. Cell cycle control in eukaryotes: molecular mechanisms of cdc2 activation. *Trends Biochem Sci* 1990 Oct;15(10):378-83.
- Dumont P, Burton M, Chen QM, Gonos ES, Frippiat C, Mazarati J-B, Eliaers F, Remacle J, and Toussaint O. 1999. Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblast. *Free Radical Biology & Medicine*, Vol 28, No 3, pp 361–373, 2000.
- Dupont J, Karas M, LeRoith D. 2003. The cyclin-dependent kinase inhibitor p21CIP/WAF is a positive regulator of insulin-like growth factor I-induced cell proliferation in MCF-7 human breast cancer cells. *J Biol Chem*, 278 (39):37256-37264.
- El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, and Vogelstein B. 1993. WAR, a Potential Mediator of p53 Tumor Suppression Cell, Vol 75, 817-825, November 19, 1993, .
- Fantinelli JC, Gonzalez Arbelaez LF, Perez Nunez IA, Mosca SM. 2013. Protective effects of N-(2-mercaptopropionyl)-glycine against ischemia-reperfusion injury in hypertrophied hearts. *Exp Mol Pathol*, 94 (1):277-284.
- Finkel T. 2011. Signal transduction by reactive oxygen species. *J Cell Biol*, 194 (1):7-15.

- Flachsbart F, Caliebe A, Kleindorp R, Blanché H, von Eller-Eberstein H, Nikolaus S, Schreiber S, Nebel A. Association of FOXO3A variation with human longevity confirmed in German centenarians. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009, 24;106(8):2700-5.
- Fleenor BS, Jason S. Eng, Amy L. Sindler, Bryant T. Pham, Kloor JD, Seals aDR. 2013. Superoxide signaling in perivascular adipose tissue promotes age-related artery stiffness. *Aging Cell* (2014) 13, pp576–578.
- Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, et al. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol* 2006;24:150-4.
- Frescas D, Valenti L, Accili D. 2005. Nuclear trapping of the forkhead transcription factor FoxO1 via Sirt-dependent deacetylation promotes expression of glucogenetic genes. *J Biol Chem*, 280 (21):20589-20595.
- Frölich L, Riederer P. Free radical mechanisms in dementia of Alzheimer type and the potential for antioxidative treatment. *Arzneimittelforschung*. 1995 Mar;45(3A):443-6.
- Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*. 1983 Jan 15;31(1):13-20. doi:10.1002/ijc.2910310104. PMID: 6339421.
- Gimble JM, Guilak F, Nuttall ME, Sathishkumar S, Vidal M, Bunnell BA. 2008. In vitro Differentiation Potential of Mesenchymal Stem Cells. *Transfus Med Hemother*, 35 (3):228-238.
- Grabowiecki Y, Licon C, Palamiuc L, Abreu P, Vidimar V, Coovar D, Mellitzer G, Gaiddon C. 2014. Regulation of a Notch3-Hes1 pathway and protective effect by a tocopherol-omega alkanol chain derivative in muscle atrophy. *J Pharmacol Exp Ther*.
- Gredilla R and Barja G. 2015. The role of oxidative stress in relation to caloric restriction and longevity. *Endocrinology* 2005;146:3713–3717.
- Greer EL, Brunet A. 2005. FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene*, 24 (50):7410-7425.
- Groebner M, *David R, Franz WM*. 2006. Embryonale Stammzellen. *Internist* 2006 47:502-508.
- Hadjigargyrou M, O'Keefe RJ. 2014. The convergence of fracture repair and stem cells: interplay of genes, aging, environmental factors and disease. *J Bone Miner Res*, 29 (11):2307-2322.
- Hampton MB, Orrenius S. 1997. Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. *FEBS Letters*, 414 (3):552-556.
- Harman D. 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956 Jul;11(3):298-300.
- Hasegawa K, Wakino S, Yoshioka K. et al. Sirt1 protects against oxidative stress-induced renal tubular cell apoptosis by the bidirectional regulation of catalase expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 372, No. 1, Pages 51–56, 2008.
- Haug H, Tildall D. J. Dynamic FoxO transcription factors. *Journal of Cell Science* 120, Pages 2479-2487, 2007.
- Hayflick L. 1977. *Handbook of the biology of Aging*. Van Nostrand Reinhold, New York, pp 159-186.
- Heng BC, Saxena P, Fussenegger M. 2014. Heterogeneity of baseline neural marker expression by undifferentiated mesenchymal stem cells may be correlated to donor age. *J Biotechnol*, 174:29-33.
- Higuchi M, Dusting GJ, Peshavariya H, Jiang F, Hsiao ST, Chan EC, Liu GS. 2013. Differentiation of human adipose-derived stem cells into fat involves reactive oxygen species and Forkhead box O1 mediated upregulation of antioxidant enzymes. *Stem Cells Dev*, 22 (6):878-888.

- Holland JA, Ziegler LM, Meyer JW. Atherogenic levels of low-density lipoprotein increase hydrogen peroxide generation in cultured human endothelial cells: Possible mechanism of heightened endocytosis. *J Cell Physiol* 1996; 166:144–151.
- Honegger J, Prettin C, Feuerhake F. Expression of Ki-67 antigen in nonfunctioning pituitary adenomas: correlation with growth velocity and invasiveness. *J Neurosurg* 2003; 99: 674–9.
- Huang H, Tindall DJ. 2007. Dynamic FoxO transcription factors. *Journal of Cell Science* 120, 2479-2487 Published by The Company of Biologists 2007.
- Ido Y, Duranton A, Lan F, Cacicedo JM, Chen TC, Breton L, Ruderman NB. 2012. Acute activation of AMP-activated protein kinase prevents H₂O₂-induced premature senescence in primary human keratinocytes. *PLoS One*, 7 (4):e35092.
- Jee MK, Kim JH, Han YM, Jung SJ, Kang KS, Kim DW, Kang SK. 2010. DHP-derivative and low oxygen tension effectively induces human adipose stromal cell reprogramming. *PLoS One*, 5 (2):e9026.
- Jung S.-B, Kim C.-S, Kim Y.-R. et al. Redox factor-1 activates endothelial SIRTUIN1 through reduction of conserved cysteine sulfhydryls in its deacetylase domain. *PLoS ONE*, Vol. 8, No. 6, Article ID e65415, 2013.
- Kang H. Jung J.-W, Kim M. K. and Chung J. H. CK2 is the regulator of SIRT1 substrate-binding affinity, deacetylase activity and cellular response to DNA-damage. *PLoS ONE*, Vol.4, No. 8, Article ID e6611, 2009.
- Kassem M, Ankersen L, Eriksen EF, Clark BF, Rattan SI. 1997. Demonstration of cellular ageing and senescence in serially passaged long-term cultures of human trabecular osteoblasts. *Osteoporos Int* 7: 514–524
- Kim HK, Kim YK, Song I-H, Baek S-H, Lee S-R, Kim JH, and Kim J-R. 2005. Down-Regulation of a Forkhead Transcription Factor, FOXO3a, Accelerates Cellular Senescence in Human Dermal Fibroblasts. *Journal of Gerontology: BIOLOGICAL SCIENCES* 2005, Vol 60A, No 1,4-9.
- Kim JH, Park S-H, Park SG, Choi J-S, Xia Y, and Sung J-H. 2011. The Pivotal Role of Reactive Oxygen Species Generation in the Hypoxia-Induced Stimulation of Adipose-Derived Stem Cells. *Stem Cells and Development* October 2011, Vol 20, No 10: 1753-1761
- Kim JH, Kim HP, Jung CH, Hong MH, Hong MC, Bae HS, Lee SD, Park SY, Park JH, Ko SG. 2006. Inhibition of cell cycle progression via p27Kip1 upregulation and apoptosis induction by an ethanol extract of *Rhus verniciflua* Stokes in AGS gastric cancer cells. *Int J Mol Med* 2006 Jul;18(1):201-8.
- Kim K. M, Song J. D, Chung H. T. and Park Y. C. 2012. Protein kinase CK2 mediates peroxynitrite-induced heme oxygenase-1 expression in articular chondrocytes. *International Journal of Molecular Medicine*, Vol. 29, No. 6, Pages 1039–1044, 2012.
- Kimura W, Sadek HA. 2012. The cardiac hypoxic niche: emerging role of hypoxic microenvironment in cardiac progenitors. *Cardiovasc Diagn Ther*, 2 (4):278-289.
- Ko E, Lee KY, and Hwang DS. 2012. Human Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells Undergo Cellular Senescence in Response to Oxidative Stress. *Stem Cells and Development* July 20, 2012, 21(11): 1877-1886.
- Kobayashi CI, Suda T. 2012. Regulation of reactive oxygen species in stem cells and cancer stem cells. *J Cell Physiol*, 227 (2):421-430.
- Koerner JE, Anderson BA, Dage RC. 1991. Protection against postischemic myocardial dysfunction in anesthetized rabbits with scavengers of oxygen-derived free radicals: superoxide dismutase plus catalase, N-2-mercaptopyrionyl glycine and captopril. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991 Feb;17(2):185-91.
- De Kreutzenberg S. V, Ceolotto G, Papparella I. et al. Downregulation of the longevity-associated protein sirtuin 1 in insulin resistance and metabolic syndrome: potential biochemical mechanisms. *Diabetes*, Vol. 59, No. 4, Pages 1006–1015, 2010.

- Lee TH, Kim SU, Yu SL, et al. Peroxiredoxin II is essential for sustaining life span of erythrocytes in mice. *Blood* 2003;101(12):5033–8.
- Li CY, Wu XY, Tong JB, et. al. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue under xeno-free conditions for cell therapy. *Stem Cell Res Ther* 2015;6:55
- Liochev SI. 2013. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. *Free Radic Biol Med*, 60:1-4.
- Liu Y, Chen T, Du F, Gu M, Zhang P, Zhang X, Liu J, Lv L, Xiong C, Zhou Y. Single-Layer Graphene Enhances the Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells In Vitro and In Vivo. *J Biomed Nanotechnol*. 2016. Jun;12(6):1270-84.
- Lu T, Finkel T. 2008. Free radicals and senescence. *Exp Cell Res*, 314 (9):1918-1922.
- Luo J, Nikolaev AY, Imai S, Chen D, Su F, Shiloh A, Guarente L, Gu W. Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell*. 2001 Oct 19;107(2):137-48. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00524-4. PMID: 11672522.
- Madonna R, De Caterina R. Adipose tissue: a new source for cardiovascular repair. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*. 2010 Feb;11(2):71-80.
- Mantovani C, Terenghi G, Magnaghi V. 2014. Senescence in adipose-derived stem cells and its implications in nerve regeneration. *Neural Regen Res*, 9 (1):10-15.
- Massaad CA, Klann E. Reactive oxygen species in the regulation of synaptic plasticity and memory. *Antioxid Redox Signal*. 2011 May 15;14(10):2013-54. doi: 10.1089/ars.2010.3208. Epub 2010 Oct 28. PMID: 20649473; PMCID: PMC3078504.
- Matsui K, Ezoe S, Oritani K, Shibata M, Tokunaga M, Fujita N, Tanimura A, Sudo T, Tanaka H, McBurney MW, Matsumura I, Kanakura Y. 2012. NAD-dependent histone deacetylase, SIRT1, plays essential roles in the maintenance of hematopoietic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 418 (4):811-817.
- Medema RH, Kops GJ, Bos JL, and Burgering BM. 2000. AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27^{kip1}. *Nature* 404, 782-787 (2000).
- Momtaz S, Abdollahi M. 2012. A comprehensive review of biochemical and molecular evidences from animal and human studies on the role of oxidative stress in aging: an epiphenomenon or the cause. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, vol 7, no 1.
- Moto-o Date TM, Nobushige Yamashita, Kazuhiko Nishida, Osamu Yamaguchi, Yoshiharu Higuchi, Shinichi Hirotani, Yasushi Matsumura, Masatsugu Hori, Michihiko Tada and Kinya Otsu. 2002. The Antioxidant N-2-Mercaptopropionyl Glycine Attenuates Left Ventricular Hypertrophy in In Vivo Murine Pressure-Overload Model. *Journal of the American College of Cardiology* Vol 39, No 5, 2002.
- Murphy MP, Holmgren A, Larsson NG, Halliwell B, Chang CJ, Kalyanaraman B, Rhee SG, Thornalley PJ, Partridge L, Gems D, Nystrom T, Belousov V, Schumacker PT, Winterbourn CC. 2011. Unraveling the biological roles of reactive oxygen species. *Cell Metab*, 13 (4):361-366.
- Muteliefu G, Shimizu H, Enomoto A, Nishijima F, Takahashi M, Niwa T. 2012. Indoxyl sulfate promotes vascular smooth muscle cell senescence with upregulation of p53, p21, and prelamin A through oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol* 2012 Jul 15;303(2):C126-34.
- Nakamura T, Sakamoto K. 2008. Forkhead transcription factor FOXO subfamily is essential for reactive oxygen species-induced apoptosis. *Mol Cell Endocrinol*, 281 (1-2):47-55.
- Narala SR, Allsopp RC, Wells TB, Zhang G, Prasad P, Coussens MJ, Rossi DJ, Weissman IL, Vaziri H. 2008. SIRT1 acts as a nutrient-sensitive growth suppressor and its loss is

- associated with increased AMPK and telomerase activity. *Mol Biol Cell*, 19 (3):1210-1219.
- Neumann CA, Krause DS, Carman CV, et al. 2003. Essential role for the peroxiredoxin Prdx1 in erythrocyte antioxidant defence and tumour suppression. *Nature* 2003;424(6948):561–5.
- Nissanka N, Moraes CT. Mitochondrial DNA damage and reactive oxygen species in neurodegenerative disease. *FEBS Lett.* 2018 Mar;592(5):728-742. doi: 10.1002/1873-3468.12956. Epub 2018 Jan 9. PMID: 29281123; PMCID: PMC6942696.
- Noble M, Proschel C, Mayer-Proschel M. 2011. Oxidative-reductionist approaches to stem and progenitor cell function. *Cell Stem Cell*, 8 (1):1-2.
- Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest* 1993; 91:2546–2551.
- Packer L and Fuehr K. Low oxygen concentration extends the lifespan of cultured human diploid cells. *Nature* 1977, 267, 423–5.
- Pan J-S. 2009. Reactive oxygen species: A double-edged sword in oncogenesis. *World Journal of Gastroenterology*, 15 (14):1702.
- Pardo P. S, Mohamed J. S, Lopez M. A. and Boriek A. M. Induction of Sirt1 by mechanical stretch of skeletal muscle through the early response factor EGR1 triggers an antioxidative response. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 286, No.4, Pages 2559–2566, 2011.
- Park S, Zhao D, Hatanpaa KJ, Mickey BE, Saha D, Boothman DA, Story MD, Wong ET, Burma S, Georgescu MM, Rangnekar VM, Chauncey SS, Habib AA. 2009. RIP1 activates PI3K-Akt via a dual mechanism involving NF-kappaB-mediated inhibition of the mTOR-S6K-IRS1 negative feedback loop and down-regulation of PTEN. *Cancer Res*, 69 (10):4107-4111.
- Park I. K, Qian D, Kiel M, Becker M. W, Pihalja M, Weissman I. L, Morrison S. J, Clarke M. F. Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature*. 2003 May 15;423(6937):231-3.
- Qie S, Diehl JA. Cyclin D1, cancer progression, and opportunities in cancer treatment. *J Mol Med (Berl)*. 2016;94(12):1313–1326. doi:10.1007/s00109-016-1475-3
- Ramsey KM, Yoshino J, Brace CS, Abrassart D, Kobayashi Y, Marcheva B, Hong HK, Chong JL, Buhr ED, Lee C, Takahashi JS, Imai S, Bass J. 2009. Circadian clock feedback cycle through NAMPT-mediated NAD⁺ biosynthesis. *Science*, 324 (5927):651-654.
- Reid V, Mitchinson MJ, Skepper J. Cytotoxicity of oxidised low density lipoprotein to mouse peritoneal macrophages: an ultrastructural study. *J Pathol* 1993; 171:321–328.
- RNeasy Mini Handbook, 10/2019 HB-0435-006 © 2019 QIAGEN
- Roberts CJSaJM. 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 1999 13: 1501-1512.
- Rodbell M. Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J. Biol Chem.* 1964 Feb; 239:375-80. PMID: 14169133.
- Rodier F, Campisi J. 2011. Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol*, 192 (4):547-556.
- Royer HD, Grinstein E, Janz M. 1999. Regulation des Zellzyklus und therapeutische Implikationen. *Onkologie* 1999 · 5:884–890 © Springer-Verlag.
- Sablina A. A, Budanov A. V, Ilyinskaya G. V, Agapova L. S, Kravchenko J. E. and Chumakov P. M. 2005. The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nature Medicine*, Vol. 11, No. 12, Pages 1306–1313, 2005.
- Salehi H, Amirpour N, Niapour A, Razavi S. An Overview of Neural Differentiation Potential of Human Adipose Derived Stem Cells. *Stem Cell Rev.* 2016 Feb;12(1):26-41.

- Sasaki T, Maier B, Koclega K. D. et al. 2008. Phosphorylation regulates SIRT1 function. *PLoS ONE*, Vol. 3, No. 12, Article ID e4020, 2008.
- Satyanarayana, A. Wiemann, S.U. Buer, J. Lauber, J. Dittmar, K.E. Wüstefeld, T. Blasco, M.A. Manns, M.P. Rudolph, K.L. Telomere shortening impairs organ regeneration by inhibiting cell cycle re-entry of a subpopulation of cells. *EMBO J.*, 22 (15) (2003), pp. 4003–4013
- Schipper BM, Marra KG, Zhang W, Donnenberg ADA, Rubin JP. 2008. Regional anatomic and age effects on cell function of human adipose-derived stem cells. *Ann Plast Surg*, 60 (5):538-544.
- Schneider EL, Mitsui Y. 1976. The relationship between in vitro cellular aging and in vivo human age. *Proc Natl Acad Sci USA* Vol 73, No 10, pp 3584-3588, 1976 *Cell Biology*.
- Schöler HR. 2003. Das Potential von Stammzellen. *Naturwissenschaftliche Rundschau* | 56 Jahrgang, Heft 10, 2003.
- Seiberg M. 2013. Age-induced hair greying - the multiple effects of oxidative stress. *Int J Cosmet Sci*, 35 (6):532-538.
- Sethe S, Scutt A, Stolzing A. 2006. Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing Res Rev*, 5 (1):91-116.
- Sherr CJ. 1994. G1 phase progression: Cycling on cue. *Cell* Volume 79, Issue 4, 1994, Pages 551–555.
- Simons JW. 2000. Coming of age: „dysgenetics“ – a theory connecting induction of persistent delayed genomic instability with disturbed cellular ageing. *Int J Radiat Biol* 76: 1533–1543
- Sohal, R. S. Weindruch, R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 273:59–63; 1996.
- Sohal R. S. Orr W.C. The redox stress hypothesis of aging. *Free Radic Biol Med*. 2012 Feb 1;52(3):539-55.
- Song Y, Wang XF, Wang YG, Sun YC, Lv PJ. Osteogenesis of human adipose-derived mesenchymal stem cells-biomaterial mixture in vivo after 3D bio-printing. *Beijing Da Xue Xue Bao*. 2016 Feb 18;48(1):45-50.
- Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989; 321:1196–1197.
- Stenderup K, Justesen J, Clausen C, Kassem M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone*. 2003 Dec;33(6):919-26.
- 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.
- Stromps JP, Paul NE, Rath B, Nourbakhsh M, Bernhagen J, Pallua N. 2014. Chondrogenic differentiation of human adipose-derived stem cells: a new path in articular cartilage defect management? *Biomed Res Int*, 2014:740926.
- Sun LY, Pang CY, Li DK, Liao CH, Huang WC, Wu CC, Chou YY, Li WW, Chen SY, Liu HW, Chang YJ, Cheng CF. 2013. Antioxidants cause rapid expansion of human adipose-derived mesenchymal stem cells via CDK and CDK inhibitor regulation. *Journal of Biomedical Science* 2013, 20:53.
- Sung HM, Suh IS, Lee HB, Tak KS, Moon KM, Jung MS. 2012. Case Reports of Adipose-derived Stem Cell Therapy for Nasal Skin Necrosis after Filler Injection. *Arch Plast Surg*, 39 (1):51-54.

- Taskiran D, Vedat Evren V. 2012. Estradiol Protects Adipose Tissue-Derived Stem Cells Against H₂O₂-Induced Toxicity. *J Biochem Molecular Toxicology* Volume 26, Number 8, 2012.
- Thornton TM, Rincon M. 2009. Non-classical p38 map kinase functions: cell cycle checkpoints and survival. *Int J Biol Sci* 2009;5(1):44-51.
- Torella D, Rota M, Nurzynska D, Musso E, Monsen A, Shiraishi I, Zias E, Walsh K, Rosenzweig A, Sussman MA, Urbanek K, Nadal-Ginard B, Kajstura J, Anversa P, Leri A. 2004. Cardiac stem cell and myocyte aging, heart failure, and insulin-like growth factor-1 overexpression. *Circ Res*, 94 (4):514-524.
- Tothova Z, Gilliland DG. 2007. FoxO transcription factors and stem cell homeostasis: insights from the hematopoietic system. *Cell Stem Cell*, 1 (2):140-152.
- Toussaint O, Medrano EE, Zglinicki aTv. 2000. Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Experimental Gerontology* 35 (2000) 927-945.
- Toyoshima H, Hunter T. 1994. p27, a Novel Inhibitor of G1 Cyclin-Cdk Protein Kinase Activity, is Related to p21. *Cell*, Vol 78, 67-74, July 15, 1994, Copyright © 1994 by Cell Press.
- Van Harmelen VR, Karin and Hauner, Hans. 2004. Comparison of proliferation and differentiation capacity of human adipocyte precursor cells from the omental and subcutaneous adipose tissue depot of obese subjects. *Metabolism*, 53 (5):632-637.
- Wang F, Nguyen M, Qin F. X.-F and Tong Q. 2007. SIRT2 deacetylates FOXO3a in response to oxidative stress and caloric restriction. *Aging Cell*, Vol. 6, No. 4, Pages 505-514.
- Wartenberg M, Wirtz N, Grob A, Niedermeier W, Hescheler J, Peters SC, Sauer H. Direct current electrical fields induce apoptosis in oral mucosa cancer cells by NADPH oxidase-derived reactive oxygen species. *Bioelectromagnetics*. 2008 Jan;29(1):47-54.
- Watanabe S, Yamaguchi S, Fujii N, Eguchi N, Katsuta H, Sugishima S, Iwasaka T, Kaku T. Nuclear co-expression of p21 and p27 induced effective cell-cycle arrest in T24 cells treated with BCG. *Cytotechnology*. 2019 Feb;71(1):219-229. doi: 10.1007/s10616-018-0278-5. Epub 2019 Jan 2. PMID: 30603918; PMCID: PMC6368513.
- Watt FM, and Hogan BLM. 2000. Out of Eden: Stem Cells and Their Niches. *Science*, 287 (5457):1427-1430.
- Wei W, Ying X, Zhang W, Chen Y, Leng A, Jiang C, Liu J. 2014. Effects of vitexin-2"-O-rhamnoside and vitexin-4"-O-glucoside on growth and oxidative stress-induced cell apoptosis of human adipose-derived stem cells. *J Pharm Pharmacol*, 66 (7):988-997.
- Weindruch R, Walford RL. 1988. The retardation of aging and disease by dietary restriction. Charles C Thomas Pub Ltd.
- Westin ER, Aykin-Burns N, Buckingham EM, Spitz DR, Goldman FD, Klingelhutz AJ. The p53/p21(WAF/CIP) pathway mediates oxidative stress and senescence in dyskeratosis congenita cells with telomerase insufficiency. *Antioxid Redox Signal*. 2011 Mar 15;14(6):985-97. doi: 10.1089/ars.2010.3444. Epub 2011 Jan 17. PMID: 21087144; PMCID: PMC3043957.
- WikiMiMa Expression von verschiedenen Cyclin-Proteinen während des Zellzyklus. 2007-01-22 auf Wikipedia.de
- Willcox BJ, Donlon TA, He Q, Chen R, Grove JS, Yano K, Masaki KH, Willcox DC, Rodriguez B, Curb JD. 2008. FOXO3A genotype is strongly associated with human longevity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105 (37):13987-13992.
- Wirtz RM, Sihto H, Isola J, Heikkilä P, Kellokumpu-Lehtinen PL, Auvinen P, Turpeenniemi-Hujanen T, Jyrkkio S, Lakis S, Schlombs K, Laible M, Weber S, Eidt S, Sahin U, Joensuu H. Biological subtyping of early breast cancer: a study comparing RT-qPCR with immunohistochemistry. *Breast Cancer Res Treat*. 2016 Jun;157(3):437-46. doi:

- 10.1007/s10549-016-3835-7. Epub 2016 May 24. PMID: 27220750; PMCID: PMC4903103.
- Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest* 1991; 88:1785–1792.
- Wolff SP, Jiang ZY, Hunt JV. Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and ageing. *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 10, Pages 339-352, 1991
- Wolfsberger S, Kitz K, Wunderer J. Multiregional sampling reveals a homogenous distribution of Ki-67 proliferation rate in pituitary adenomas. *Acta Neurochir* 2004; 146: 1323–7.
- Wu LW, Wang YL, Christensen JM, Khalifian S, Schneeberger S, Raimondi G, Cooney DS, Lee WP, Brandacher G. 2014. Donor age negatively affects the immunoregulatory properties of both adipose and bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Transpl Immunol*, 30 (4):122-127.
- Wu W, Niklason L, Steinbacher DM. 2013. The effect of age on human adipose-derived stem cells. *Plast Reconstr Surg*, 131 (1):27-37.
- Wystrychowski W, Patlolla B, Zhuge Y, Neofytou E, Robbins RC, Beygui RE. 2016 Multipotency and cardiomyogenic potential of human adipose-derived stem cells from epicardium, pericardium, and omentum. *Stem Cell Res Ther*. 2016 Jun 13;7(1):84.
- Yang X, Li CJ, Wan Y, Smith P, Shang G, Cui Q. 2014. Antioxidative fullerol promotes osteogenesis of human adipose-derived stem cells. *Int J Nanomedicine*, 9:4023-4031.
- Yang Y, Fu W, Chen J. et al. 2007. SIRT1 sumoylation regulates its deacetylase activity and cellular response to genotoxic stress, *Nature Cell Biology*, Vol. 9, No. 11, Pages 1253–1262
- Yoshino Y, Mills K. F, Yoon M. J and Imai S.-I. 2011. Nicotinamide mononucleotide, a key NAD⁺ intermediate, treats the pathophysiology of diet- and age-induced diabetes in mice. *Cell Metabolism*, Vol. 14, No. 4, Pages 528–536, 2011.
- Yu J, Tu YK, Tang YB, Cheng NC. 2014. Stemness and transdifferentiation of adipose-derived stem cells using L-ascorbic acid 2-phosphate-induced cell sheet formation. *Biomaterials*, 35 (11):3516-3526.
- Yun Chau Long TMCT, Inoue Takao and Bor Luen Tang. 2014. The biochemistry and cell biology of aging: metabolic regulation through mitochondrial signaling. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 306: E581–E591, 2014.
- Zhao Y, Waldman SD, Flynn LE. 2012. The effect of serial passaging on the proliferation and differentiation of bovine adipose-derived stem cells. *Cells Tissues Organs*, 195 (5):414-427.
- Zheng T, Lu aY. 2011. Changes in SIRT1 Expression and Its Downstream Pathways in Age-Related Cataract in Humans. *Current Eye Research*, Informa Healthcare, May 2011, Vol 36, No 5 , Pages 449-455.
- Zhu Y, Liu T, Song K, Fan X, Ma X, Cui Z. Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. *Cell Biochem funct* 2008; 26: 664-675
- Zuk P. 2013. Adipose-Derived Stem Cells in Tissue Regeneration: A Review. *ISRN Stem Cells*, 2013:1-35.
- Zuk PA, M. Zhu, H. Mizuno, J. Huang, J. William Futrell, Adam J. Katz, Prosper Benhaim, H. Peter Lorenz, Hedrick. aMH. 2001. Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. *Tissue Engineering* April 2001, 7(2): 211-228.

11. Anhang

11.1 Materialien

11.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Analysenwaage BP 221S	Sartorius AG, Deutschland
Durchflusszytometer FACS Calibur	Becton Dickinson GmbH, Deutschland
Elektrophoresekammer Agagel Midi-Wide	Biometra GmbH, Deutschland
Geldokumentationsanlage G:BOX EF	Syngene, United Kingdom
Heizplatte Hot Plate 062	Labotect Labor-Technik-Göttingen GmbH, Deutschland
Inkubator Hera Cell	Heraeus Instruments GmbH, Deutschland
Inkubator NUAIRE DH Autoflow	INTEGRA Bioscience GmbH, Deutschland
Laser Scanning Mikroskop cLSM 510 Meta	Carl Zeiss AG, Deutschland
Lichtmikroskop Telaval 31	Carl Zeiss AG, Deutschland
Mastercycler Gradient	Eppendorf AG, Deutschland
pH-Meter	WTW GmbH, Deutschland
Pipetboy acu	INTEGRA Bioscience GmbH, Deutschland
Standard Power Pack P25	Biometra GmbH, Deutschland
Sterilbank HERAsafe	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Steuergerät HT 200 W für Heizsystem	Minitüb GmbH, Deutschland
Tischzentrifuge Galaxy Mini	VWR International GmbH, Deutschland
UV/VIS-Spektralphotometer (Nanodrop)	Peqlab Biotechnologie GmbH, Deutschland
Vortexer Vortex-Genie 2	VWR International GmbH, Deutschland
Wasserbad GFL 1092	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Deutschland
Zentrifuge 5417C	Eppendorf AG, Deutschland
Zentrifuge EBA 12	Andreas Hettich GmbH & Co. Deutschland
Zentrifuge Universal 30 RF	Andreas Hettich GmbH & Co. Deutschland

11.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
6-Well Zellkulturplatten	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland
24-Well Zellkulturplatten	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland
Cryoröhrchen (2 ml)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Descosept	AF Dr. Schumacher GmbH, Deutschland
FACS-Röhrchen Falcon™ (5 ml)	VWR International GmbH, Deutschland
Filtertips (10, 100, 200, 1000 µl)	Nerbe Plus GmbH, Deutschland
Filtrationseinheit Stericup	Millipore Corporation, USA
Glasplättchen (1,2 cm)	Menzel GmbH & Co. KG, Deutschland
Latex Handschuhe Sensiclean Micro-Touch	Ansell GmbH, Deutschland
PCR-Reaktionsgefäße (200, 500 µl)	BRAND GmbH & Co. KG, Deutschland
Pipettenspitzen (10, 100, 200, 1000 µl)	BRAND GmbH & Co. KG, Deutschland
QIAshredder Mini Spin Column	Qiagen GmbH, Deutschland
Reaktionsgefäße (1,5 ml; 0,5 ml)	Sarstedt AG & Co., Deutschland
Serologische Pipetten (5, 10, 25 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland
Zellkulturflaschen (25 cm ²)	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland
Zellsieb BD Falcon Cell Strainer	Omnilab GmbH & Co. KG, Deutschland
Zentrifugationsröhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland

11.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Material	Hersteller
0,25% Trypsin/EDTA	Invitrogen GmbH, Deutschlan
2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H ₂ DCFDA-AM)	Invitrogen GmbH, Deutschlan
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Invitrogen GmbH, Deutschlan
Aceton	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Agarose	Amresco Inc., USA
Gelatine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland

- Materialien -

Colagenase NB 4G Proved Grade	SERVA Electrophoresis GmbH, Deutschland
DNase I Reaction Buffer (10x)	Invitrogen GmbH, Deutschland
DNase I, Amplification Grade (100 U)	Invitrogen GmbH, Deutschland
DMEM-Medium 4,5 g/L D-Glucose	Invitrogen GmbH, Deutschland
dNTP Mix (10 mM)	Invitrogen GmbH, Deutschland
DTT (0,1 M)	Invitrogen GmbH, Deutschland
EDTA (25 mM)	Invitrogen GmbH, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
Ethidiumhomodimer-2 (1 mM)	Invitrogen GmbH, Deutschland
Hitze-inaktiviertes fetales Kälberserum (FBS)	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
First-strand Puffer (5x)	Invitrogen GmbH, Deutschland
HyperLadder IV	Bioline, USA
L-Glutamin (200 mM)	Biochrom AG, Deutschland
LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Deutschland
MEM NEAA	Life Technologies, USA
Methanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Penicillin/ Streptomycin (10mg/ml)	Biochrom AG, Deutschland
PFA (Paraformaldehyd)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Quantitative cellular Senescence Assay Kit (SA- β -gal, Fluorometric)	Cell Biolabs, INC. USA
Randomprimer (250 ng)	Invitrogen GmbH, Deutschland
Red Load Taq Master	Jena Bioscience, Deutschlandland
RNase freies Wasser	Invitrogen GmbH, Deutschland
RNeasy Mini Kit (250)	Qiagen GmbH, Deutschland
Triton X-100	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland

11.1.4 Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
500 ml DMEM-Komplettmedium	75 ml FBS 5 ml L-Glutamin 5 ml MEM NEAA 2,5 ml Pen/Strep
Einfriermedium	36 ml DMEM-Komplettmedium 10 ml FBS 4 ml DMSO
1% PBS-T	1% Triton X-100 in PBS
0,01% PBS-T	1 ml 1% PBS-T auf 100 ml PBS
10% Milchlösung	10% Milchpulver in 0,01% PBS-T
4% PFA-Lösung	4% PFA-Lösung (37%) in PBS
EthD-2-Lösung	2 µl EthD-2 auf 1 ml DMEM-Komplettmedium
FACS-Puffer	200 µl FBS auf 10 ml PBS
Gelatine-Lösung	0,1% Gelatine in PBS
Methanol/Aceton-Lösung	Methanol:Aceton-Gemisch 7:3
PBS	0,8 g Natriumchlorid 0,02 g Kaliumchlorid 0,144 g Natriumhydrogenphosphat 0,24 g Kaliumhydrogenphosphat ad 100 ml Aqua dest. pH 7,4

11.1.5 Primer

Primer	Sequenz 5` - 3`	Hersteller
p21	for.: AGTCAGTTCCTTGTGGAGCC rev.: CGCAGAAACACCTGTGAACG	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
p27	for.: ATCGCTGACTTCATGGAATGG rew.: CATCCAACGCTTTTAGAGGCA	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
FoxO3a	for.: ATGAGGGAACTGGCAAGAGC rev.: CTGACTGTGCTGGCAAGAGC	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
Sirt1	for.: TGATTGGCACAGATCCTCGAAC rev.: ACTCTTGCAGTAATTCACAGCATC	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
GUSP	for.: CTTCAGGCGCATCACGACA rev.: CTGCGGCGCTAAGAAAAGC	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland

11.1.6 Antikörper

Antikörper	Hersteller
Anti-CD34 Class I, cln B1-3C5	Millipore Corporation, USA
Anti-Human CD73	eBioscience, Inc. USA
Anti-Maus Cy3	Millipore Corporation, USA
CD133/1(AC133) pure Human	Miltenyi Biotec GmbH, Deutschland
Ki67 (8D5) Mouse mAb	Cell Signaling Technology, USA
Mouse Anti-Human CD105-PE	Southern Biotech, USA
Mouse Anti-Human CD166-PE	Becton Dickinson, BD Pharmingen™, USA
Mouse Anti-Human CD31/PECAM-1-PE	Southern Biotech, USA
Mouse Anti-Human IgG-RPE	Southern Biotech, USA
Ms X Hu CD29	Chemicon International Inc., USA
Ms X Hu Thy-1 CD90	Millipore Corporation, USA
Purified NA/LE Mouse Anti-Human CD44	Becton Dickinson, BD Pharmingen™, USA

11.1.7 Software

Software	Hersteller
Cell Quest Pro	Becton Dickenson, USA
EndNote	Thomson Reuters, USA
GeneSnap	Synoptics, UK
GeneTools	Synoptics, UK
LSM510 Software	Carl Zeiss AG, Deutschland
Microsoft Office	Microsoft Corporation
Nanodrop	Peqlab Biotechnologie GmbH, Deutschland
SigmaPlot 12.0	Systat Software Inc. USA

11.2 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1 Typische Konzentrationsschwankungen der Cycline im Zellzyklus. Cyclin D ist während des gesamten Zellzyklus vorhanden. Cyclin E bestimmt den Übergang von der G₁- zur S-Phase mit. Eine steigende Konzentration von Cyclin A leitet die Zelle in die G₂-Phase. Cyclin B ist für das Einsetzen der Mitose verantwortlich (WikiMiMa 2007). 14
- Abb. 2 Schematische Darstellung der Aktivierungsmöglichkeiten von p53 mit anschließenden Ausgangsmöglichkeiten: Seneszenz, Apoptose oder DNA-Reparatur. 16
- Abb. 3 ROS. Während des aeroben Stoffwechsels wird *O₂ durch SOD in H₂O₂ umgewandelt, das durch glutathionperoxidase (GTP) oder Katalase in Wasser umgewandelt wird. Myeloperoxidase (MPD) konvertiert H₂O₂ zur Hypochlorsäure (HOCL), einem starken Oxidationsmittel. Während Fe²⁺ in Fe³⁺ oxidiert, wird H₂O₂ in das hochreaktive Hydroxylradikal (*OH) umgewandelt. Modifiziert nach Castello et al. 2010. 20
- Abb. 4 Schematische Darstellung des Antioxidativen Systems. Sirt1 deacetyliert FoxO und fördert Stressresistenz um Apoptose zu verhindern. Modifiziert nach Greer und Brunet 2005. 23
- Abb. 5 Beispielhafte Auswertung der Durchflusszytometriergebnisse am FACS Calibur. Untersucher Marker CD73 bei ASCj in P16. 30
- Abb. 6 RNA-Isolation mittels RNeasy® Mini Kit. Schritte der RNA-Isolation. (*RNeasy Mini Handbook* 2019). 36
- Abb. 7 Repräsentative Aufnahme der mRNA-Expressionanalyse anhand der G:BOX EF®. GUSP 38
- Abb. 8 Charakterisierung der ASCs. Alle isolierten Zellen, wurden mittels Durchflusszytometrie auf 6 stammzellassozierte und 3 negative Marker untersucht. Die Auswertung erfolgte durch das Überlagern der Negativkontrolle mit der sekundären Antikörper-Kontrolle, n=12. 40
- Abb. 9 Charakterisierung der ASCs anhand von Oberflächenmarkern. Repräsentative Aufnahme am cLSM. Blau: Zellkern, gefärbt mit Dapi. Rot: Oberflächenmarker, Maßstabsbalken 50 µm. 41
- Abb. 10 Vergleich der Oberflächenmarkerexpression in P6 und P16. A: ASCj. B: ASCa. Dargestellt sind MW ± SEM, n=3, *p ≤ 0,05 (t-test). 42
- Abb. 11 Beispielaufnahmen von unterschiedlichen Zelldichten. A: 2 x 10³ Zellen/cm². B: 4 x 10³ Zellen/cm². C: 1 x 10⁴ Zellen/cm². D: 2 x 10⁴ Zellen/cm². Blau: Zellkern, gefärbt mit Dapi. Rot: Ki67. Maßstabsbalken 100 µm. 43
- Abb. 12 Dichteabhängige Proliferation gemessen anhand einer Ki67-Färbung. A: ASCj. B: ASCa. Dargestellt sind MW ± SEM, n=3, *p ≤ 0,05 (One Way ANOVA, Dunnett, t-test). 44
- Abb. 13 Dichteabhängige Proliferation gemessen anhand einer Ki67-Färbung. A: P6. B: P16. Dargestellt sind MW ± SEM, n=3, *p ≤ 0,05 (t-test). 44
- Abb. 14 Relative mRNA-Expression. A: p27/GUSP. B: p21/GUSP. Dargestellt sind MW ± SEM, n=3, *p ≤ 0,05 (t-test). 46

- Abb. 15 SA- β -Galactosidase-Aktivität. A: Dargestellt sind MW \pm SEM, n=3, *p \leq 0,05 (t-test). B: Beispielaufnahme von ASCa, links P6, rechts P16. Grün – SA- β -Galactosidase-positive Zellen. Maßstabsbalken 200 μ m. 47
- Abb. 16 Relative mRNA-Expression. A: Sirt1/GUSP. B: FoxO3a/GUSP. Dargestellt sind MW \pm SEM, n=3, *p \leq 0,05 (t-test). 48
- Abb. 17 ROS-Level Untersuchung mittels DCF-Messung. A: Fluoreszenzintensität bei ASCj und ASCa. Dargestellt sind MW \pm SEM, n=3, *p \leq 0,05 (One Way ANOVA, Dunnett). B: Repräsentative Aufnahmen der DCF-Messung, Maßstabsbalken 100 μ m. 49
- Abb. 18 Ermittlung der letalen Dosis von H₂O₂. A: ASCj. B: ASCa. Inkubation mit unterschiedlichen H₂O₂-Konzentrationen. Dargestellt sind MW \pm SEM, n=3, *p \leq 0,05 (One Way ANOVA, Dunnett). C: Repräsentative Aufnahmen von ASCj, P6. Maßstabsbalken 200 μ m. 50
- Abb. 19 Untersuchung der Proliferationsmarker nach der Inkubation mit 250 nM H₂O₂. A: Ki67-Aktivität mittels ICC. B: Relative mRNA-Expression p27/GUSP. C: Relative mRNA-Expression p21/GUSP. Dargestellt sind MW \pm SEM, n=3, *p \leq 0,05 (t-test). 52
- Abb. 20 Untersuchung der Seneszenzmarker nach der Inkubation mit 250 nM H₂O₂. A: der SA- β -Galactosidase-Aktivität. B: Relative mRNA-Expression Sirt1/GUSP. C: Relative mRNA-Expression FoxO3a/GUSP. Dargestellt sind MW \pm SEM, n=3, *p \leq 0,05 (t-test). 53
- Abb. 21 Untersuchung der Proliferationsmarker nach der Inkubation mit Radikalfängern. A: Ki67 nach NMPG-Inkubation. B: Ki67 nach Trolox-Inkubation. C: mRNA-Expression von p27/GUSP nach NMGP-Inkubation. D: mRNA-Expression von p27/GUSP nach Trolox-Inkubation. E: mRNA-Expression von p21/GUSP nach NMGP-Inkubation. F: mRNA-Expression von p21/GUSP nach Trolox-Inkubation. Dargestellt sind MW \pm SEM, n=3, *p \leq 0,05 (t-test). 56
- Abb. 22 Untersuchung der Seneszenzmarker nach der Inkubation mit Radikalfängern. A: SA- β -Galactosidase-Aktivität nach NMPG-Inkubation. B: SA- β -Galactosidase-Aktivität nach Trolox-Inkubation. C: mRNA-Expression von Sirt1/GUSP nach NMPG-Inkubation. D: mRNA-Expression von Sirt1/GUSP nach Trolox-Inkubation. E: mRNA-Expression von FoxO3a/GUSP nach NMPG-Inkubation. F: mRNA-Expression von FoxO3a/GUSP nach Trolox-Inkubation. Dargestellt sind MW \pm SEM, n=3, *p \leq 0,05 (t-test). 58

11.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Aufteilung der Antioxidantien	24
Tab. 2 Sekundäre Antikörper entsprechend der primären Antikörper	30
Tab. 3 Verwendete ASCs	31
Tab. 4 cLSM510meta® Einstellungen für die Messungen	32
Tab. 5 ICC-Protokoll für Ki67	33
Tab. 6 Schritte der cDNA-Synthese	37
Tab. 7 Hybridisierungstemperatur und Zyklenzahl der Primer-Paare	38

11.4 Vota der Ethikkommission

11.5 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistung von mir für die Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den

Madona Knuth

11.6 Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Durchführung meiner Promotionsarbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. M. Wartenberg für die Bereitstellung des interessanten und klinisch relevanten Themas.

Weiterhin danke ich Frau Voigt, Maria Knyrim, Steffan Latz, Constanze Danzer, Anne Bernhardt und allen weiteren Mitarbeitern der AG Molekulare Kardiologie und Stammzellforschung der Klinik für Innere Medizin I des Universitätsklinikums Jena für ihre Unterstützung und Mitarbeit bei den Durchführungen der Versuche und für die hilfreiche Anregung bei der Korrektur dieses Skriptes.

Herrn Prof. Dr. med. Dahmen danke ich ganz besonders für seine wertvolle und konstruktive Diskussionsbereitschaft.

Ein herzlicher Dank gilt meinem Mann, Martin Knuth, der mich unermüdlich unterstützt und mir den Rücken gestärkt hat, meine Doktorarbeit erfolgreich zu beenden.

11.7 Lebenslauf