

**Aus der Medizinischen Klinik I  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. H. Lehnert**

---

**Isolation und Charakterisierung  
humaner Stamm-/ Progenitorzellen aus  
glutealem und abdominalem Fettgewebe**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von  
Anna - Christin Bohl  
aus Eutin

Lübeck 2010

- 1. Berichterstatter: Priv.- Doz. Dr. med. Jan Kramer**
- 2. Berichterstatter: Priv.- Doz. Dr. rer. nat. Olaf Jöhren**

**Tag der mündlichen Prüfung: 02.09.2010**

**Zum Druck genehmigt.**

**Lübeck, den 02.09.2010**



Gewidmet meinem Bruder Henry

## **A Inhaltsverzeichnis**

### **A Inhaltsverzeichnis**

### **B Abkürzungen**

|                                                                                                      |                      |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| <b><u>1. Einleitung und Zielsetzung</u></b>                                                          | <b><u>1</u></b>      |
| <b>1.1 Einleitung</b>                                                                                | <b>1</b>             |
| <b>1.1.1 Fettgewebe</b>                                                                              | <b>1</b>             |
| 1.1.1.1 Unterteilungen des Fettgewebes                                                               | 1                    |
| 1.1.1.2 Endokrine Bedeutung des Fettgewebes und Assoziation<br>zum kardiovaskulären Risiko           | 2                    |
| <b>1.1.2 Multipotente mesenchymale Stamm- / Progenitorzellen</b>                                     | <b>4</b>             |
| <b>1.1.3 Einsatz von Stamm- / Progenitorzellen aus Fettgewebe in<br/>                der Medizin</b> | <b>7</b>             |
| <b>1.2 Zielsetzung</b>                                                                               | <b>8</b>             |
| <br><b><u>2. Material und Methoden</u></b>                                                           | <br><b><u>10</u></b> |
| <b>2.1 Klinischer Teil</b>                                                                           | <b>11</b>            |
| 2.1.1 Genehmigung der Studie                                                                         | 11                   |
| 2.1.2 Rekrutierung und Screening der Probandinnen                                                    | 11                   |
| 2.1.3 Auswahl der Probandinnen                                                                       | 13                   |
| 2.1.4 Erstellen des Versuchsplans und Ablauf der Biopsie                                             | 13                   |
| 2.1.5 Nachsorge der Probandinnen                                                                     | 16                   |
| <b>2.2 Experimenteller Teil</b>                                                                      | <b>17</b>            |
| 2.2.1 Geräte                                                                                         | 17                   |
| 2.2.2 Materialien, Medien und Lösungen                                                               | 17                   |
| 2.2.2.1 Materialien                                                                                  | 17                   |
| 2.2.2.2 Medien und Lösungen                                                                          | 18                   |
| 2.2.2.2.1 PBS                                                                                        | 18                   |
| 2.2.2.2.2 Medien und Additiva                                                                        | 18                   |
| 2.2.2.2.3 Trypsin / EDTA-Lösung                                                                      | 20                   |

|                                                                                                        |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>2.2.3 Allgemeine Techniken der Zellkultur</b>                                                       | <b>20</b> |
| 2.2.3.1 Isolation der Stamm- / Progenitorzellen                                                        | 20        |
| 2.2.3.2 Passagieren und Kryokonservierung der Zellen                                                   | 22        |
| 2.2.3.3 Bestimmung der Zellzahl                                                                        | 23        |
| <b>2.2.4 Proliferationsassay</b>                                                                       | <b>23</b> |
| 2.2.4.1 Lösungen                                                                                       | 23        |
| 2.2.4.2 Durchführung                                                                                   | 24        |
| <b>2.2.5 Durchflusscytometrie</b>                                                                      | <b>24</b> |
| 2.2.5.1 Lösungen                                                                                       | 25        |
| 2.2.5.2 Durchführung                                                                                   | 25        |
| <b>2.2.6 Differenzierungsversuche</b>                                                                  | <b>25</b> |
| 2.2.6.1 Adipogene Differenzierung (4-malige Induktion)                                                 | 26        |
| 2.2.6.2 Adipogene Differenzierung (1-malige Induktion)                                                 | 26        |
| 2.2.6.3 Osteogene Differenzierung                                                                      | 27        |
| 2.2.6.4 Chondrogene Differenzierung <i>via</i> „Micro Mass Bodies“                                     | 27        |
| 2.2.6.5 MMB Kryopräparate chondrogen differenzierter<br>Stamm- / Progenitorzellen                      | 27        |
| <b>2.2.7 Histochemische Färbungen</b>                                                                  | <b>28</b> |
| 2.2.7.1 Sudan III-Färbung zum Nachweis adipogener<br>Differenzierung                                   | 28        |
| 2.2.7.1.1 Lösungen                                                                                     | 28        |
| 2.2.7.1.2 Durchführung                                                                                 | 28        |
| <b>2.2.7.2 Oil-Red-O-Färbung zum Nachweis adipogener<br/>        Differenzierung</b>                   | <b>28</b> |
| 2.2.7.2.1 Lösungen                                                                                     | 28        |
| 2.2.7.2.2 Durchführung                                                                                 | 28        |
| <b>2.2.7.3 Alkalische Phosphatase (AP)-Färbung zum Nachweis<br/>        osteogener Differenzierung</b> | <b>29</b> |
| 2.2.7.3.1 Lösungen                                                                                     | 29        |
| 2.2.7.3.2 Durchführung                                                                                 | 29        |
| <b>2.2.7.4 Silbermethode nach „von Kossa“ zum Nachweis von<br/>        Kalzium</b>                     | <b>30</b> |
| 2.2.7.4.1 Lösungen                                                                                     | 30        |
| 2.2.7.4.2 Durchführung                                                                                 | 30        |

---

|                                                                  |               |
|------------------------------------------------------------------|---------------|
| <b>2.2.7.5 Alizarinrot S-Färbung zum Nachweis von Kalzium</b>    | <b>30</b>     |
| 2.2.7.5.1 Lösungen                                               | 30            |
| 2.2.7.5.2 Durchführung                                           | 31            |
| <b>2.2.7.6 Alcianblau-Färbung zum Nachweis chondrogener</b>      |               |
| Differenzierung                                                  | 31            |
| 2.2.7.6.1 Lösungen                                               | 31            |
| 2.2.7.6.2 Durchführung                                           | 31            |
| <b>2.2.7.7 DAPI – Färbung zur Darstellung der Zellkerne</b>      | 31            |
| 2.2.7.7.1 Lösungen                                               | 31            |
| 2.2.7.7.2 Durchführung                                           | 32            |
| <b>2.2.8 Auszählung der Osteoblasten bzw. Adipozyten</b>         | <b>32</b>     |
| <b>2.2.9 Nachweis gewebespezifischer Genexpression mittels</b>   |               |
| <b>Reverser Transkription (RT) und Polymerase-Ketten-</b>        |               |
| <b>Reaktion (PCR)</b>                                            | <b>32</b>     |
| <b>2.2.9.1 RNA Isolierung</b>                                    | <b>32</b>     |
| 2.2.9.1.1 Lösungen und besonderes Material                       | 32            |
| 2.2.9.1.2 Durchführung                                           | 33            |
| <b>2.2.9.2 Reverse Transkription (RT)</b>                        | <b>34</b>     |
| 2.2.8.2.1 Lösungen, Pufferansätze, Primer, Enzyme                | 34            |
| 2.2.8.2.2 Durchführung                                           | 34            |
| <b>2.2.9.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)</b>                  | <b>34</b>     |
| 2.2.9.3.1 Lösungen, Pufferansätze, Primer, Enzyme                | 34            |
| 2.2.9.3.2 Durchführung                                           | 36            |
| <b>2.2.9.4 Agarosegelelektrophorese</b>                          | <b>36</b>     |
| 2.2.9.4.1 Chemikalien und Lösungen                               | 36            |
| 2.2.9.4.2 Durchführung                                           | 37            |
| <b>2.2.10 Statistische Auswertung</b>                            | <b>37</b>     |
| <br><b>3. Ergebnisse</b>                                         | <br><b>38</b> |
| <b>3.1 Klinischer Teil</b>                                       | <b>38</b>     |
| <b>3.1.1 Auswahl einer homogenen Biopsiegruppe</b>               | <b>38</b>     |
| <b>3.2 Experimenteller Teil</b>                                  | <b>40</b>     |
| <b>3.2.1 Kein Nachweis morphologischer Unterschiede zwischen</b> |               |
| <b>glutealen und abdominalen Fettgewebeproben</b>                | <b>40</b>     |

---

|           |                                                                                                                                        |           |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.2.2     | Kein Unterschied in der Proliferation abdominalen und glutealen Zellisolate                                                            | 40        |
| 3.2.3     | Kein Unterschied in der Expression von Oberflächenmarkernmolekülen zwischen glutealen und abdominalen Zellisolaten                     | 42        |
| 3.2.4     | Charakterisierung der <i>in vitro</i> Differenzierung                                                                                  | 44        |
| 3.2.4.1   | Optimierung des adipogenen Differenzierungs - Protokolls                                                                               | 44        |
| 3.2.4.2   | Die glutealen adulten Stamm-/ Progenitorzellen differenzierten besser in Adipozyten als die abdominalen Zellen                         | 46        |
| 3.2.4.3   | Die glutealen adulten Stamm- / Progenitorzellen differenzierten besser in Osteoblasten als die abdominalen Zellen                      | 50        |
| 3.2.4.4   | Kein Unterschied in der chondrogenen Differenzierung zwischen glutealen und abdominalen Zellen                                         | 56        |
| 3.2.4.5   | Fibroblasten und uninduzierte Stamm-/ Progenitorzellen zeigten keine Differenzierung                                                   | 58        |
| <b>4.</b> | <b>Diskussion</b>                                                                                                                      | <b>60</b> |
| 4.1       | Das subkutane Fettgewebe als Stamm-/ Progenitorzellreservoir                                                                           | 60        |
| 4.2       | Die Analyse der Proliferation und die Immunphänotypisierung sind nicht zur alleinigen Stamm-/ Progenitorzellcharakterisierung geeignet | 62        |
| 4.3       | Die <i>in vitro</i> Differenzierung als unverzichtbarer Standard der Charakterisierung von Stamm-/ Progenitorzellen                    | 65        |
| 4.4       | Ausblick: Klinischer Einsatz von Stamm-/ Progenitorzellen aus Fettgewebe                                                               | 70        |
| <b>5.</b> | <b>Zusammenfassung</b>                                                                                                                 | <b>72</b> |
| <b>6.</b> | <b>Literaturverzeichnis</b>                                                                                                            | <b>74</b> |
| <b>7.</b> | <b>Anhang</b>                                                                                                                          | <b>88</b> |

---

---

|                                      |           |
|--------------------------------------|-----------|
| <b>7.1 Danksagung</b>                | <b>88</b> |
| <b>7.2 Lebenslauf</b>                | <b>89</b> |
| <b>7.3 Eigene Veröffentlichungen</b> | <b>90</b> |
| <b>7.4 Tabellen des Anhangs</b>      | <b>91</b> |
| <b>7.5 Probandinnenaufklärung</b>    | <b>93</b> |

**B Abkürzungen**

|                   |                                                                          |
|-------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| Abb.              | Abbildung                                                                |
| abs.              | absolut                                                                  |
| ACTH              | Adrenocorticotropin, auch Adrenocorticotropes Hormon                     |
| ADSCs             | <i>adipose derived stem cells</i> (aus Fettgewebe gewonnene Stammzellen) |
| AGE               | Angiotensinogen                                                          |
| <i>Aqua dest.</i> | <i>Aqua destillatum</i> (destilliertes Wasser)                           |
| AP                | Alkalische Phosphatase                                                   |
| aP2               | <i>Adipocyte protein 2</i>                                               |
| β-ME              | β-Mercaptoethanol                                                        |
| BJ                | <i>blue juice</i>                                                        |
| BMI               | Body Mass Index                                                          |
| BMP               | <i>bone morphogenic protein</i>                                          |
| BrdU              | 5-Bromo-2'-Desoxyuridin                                                  |
| BSA               | <i>bovine serum albumine</i>                                             |
| BSR               | Blutsenkungsgeschwindigkeit                                              |
| °C                | Grad Celsius                                                             |
| Ca                | Kalzium                                                                  |
| Ca <sup>2+</sup>  | Kalzium-Ion                                                              |
| cDNA              | komplementäre DANN                                                       |
| C/EBP             | <i>CCAAT-enhancer-binding proteins</i>                                   |
| CK                | Creatinkinase                                                            |
| Cl                | Chlorid                                                                  |
| CO <sub>2</sub>   | Kohlenstoffdioxid                                                        |
| CRP               | C-reaktives Protein                                                      |
| CT                | Computertomografie                                                       |
| d                 | <i>day</i> (Tag)                                                         |
| DAPI              | 4', 6 Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid                              |
| dATP              | 2'-Desoxyadenosin-5'-Triphosphate                                        |
| dCTP              | 2'-Desoxycytosin-5'-Triphosphate                                         |
| dGTP              | 2'-Desoxyguanin-5'-Triphosphate                                          |
| DHEAS             | Dehydroepiandrosteron                                                    |
| DMEM              | <i>Dulbeccos modified Eagles`-Medium</i>                                 |

---

|                                 |                                                                     |
|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| DNA                             | Desoxyribonukleinsäure                                              |
| dTNPs                           | 2`-Desoxynucleosid-5`-Triphosphate                                  |
| dTTP                            | 2`-Desoxythymidin-5`-Triphosphate                                   |
| DTT                             | Dithiotreiol                                                        |
| EDTA                            | Ethylendinitrilotetraessigsäure                                     |
| EM                              | Erhaltungsmedium                                                    |
| FACS                            | <i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> (= Durchflusszytometrie) |
| FKS                             | fetales Kälberserum                                                 |
| FSH                             | Follikel-stimulierendes Hormon                                      |
| ft3                             | freies Trijodthyronin                                               |
| ft4                             | freies Thyroxin                                                     |
| g                               | Gramm                                                               |
| GAPDH                           | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase                            |
| GPDH                            | Glycerol-3-Phosphat Dehydrogenase                                   |
| GGT                             | Gamma-Glutamyl-Transferase                                          |
| GOT                             | Glutamat-Oxalacetat-Transaminase                                    |
| GPT                             | Glutamat-Pyruvat-Transaminase                                       |
| H <sub>2</sub> O                | Wasser                                                              |
| HCL                             | Salzsäure                                                           |
| HGF                             | <i>Hepatocyte Growth Factor</i>                                     |
| IGF-1                           | <i>Insulin Growth Factor-1</i>                                      |
| IL 6                            | Interleukin 6                                                       |
| IM                              | Induktionsmedium                                                    |
| K                               | Kalium                                                              |
| kb                              | kilo-Basen                                                          |
| KCL                             | Kaliumchlorid                                                       |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | Kaliumhydrogenphosphat                                              |
| l                               | Liter                                                               |
| LDH                             | Lactatdehydrogenase                                                 |
| LH                              | luteinisierende Hormon                                              |
| M                               | molar                                                               |
| Max.                            | maximal (e)                                                         |
| MDP                             | <i>Membrane Desalting Puffer</i>                                    |
| Mg <sup>2+</sup>                | Magnesium-Ion                                                       |



---

|                                  |                                                                 |
|----------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| min                              | Minute (n)                                                      |
| MMB                              | <i>micro mass bodies</i>                                        |
| mRNA                             | <i>messenger-RNA</i>                                            |
| MSCs                             | <i>Mesenchymal Stem Cells</i>                                   |
| n                                | Anzahl der durchgeführten Versuche                              |
| Na                               | Natrium                                                         |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | Natriumhydrogenphosphat                                         |
| NaCl                             | Natriumchlorid                                                  |
| NHDF                             | normale humane dermale Fibroblasten                             |
| P                                | Phosphat                                                        |
| PAI                              | <i>Plasminogen-Aktivator Inhibitor</i>                          |
| PBS                              | <i>phosphat buffered saline</i>                                 |
| PCR                              | <i>Polymerase Chain Reaction</i> (= Polymerase-Ketten-Reaktion) |
| pH                               | <i>Pondus Hydrogenii</i>                                        |
| PPAR $\gamma$                    | <i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>         |
| RNA                              | Ribonukleinsäure                                                |
| RNase                            | Ribonukleinase                                                  |
| rpm                              | <i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)               |
| RT                               | Reverse Transkription                                           |
| sec                              | Sekunden                                                        |
| SHBG                             | Sexualhormon-bindendes Globulin                                 |
| TBE                              | TRIS-Borat-EDTA                                                 |
| TGF- $\beta$                     | <i>transforming growth factor-beta</i>                          |
| TNF $\alpha$                     | Tumor Nekrose Faktor alpha                                      |
| Tris                             | Trishydroxymethyl-Aminomethan                                   |
| TSH                              | Thyreoidea-Stimulierendes Hormon = Thyreotropin                 |
| UCP-1                            | <i>Uncoupling Protein-1</i>                                     |
| UV-Licht                         | Ultraviolett-Licht                                              |
| VCAM-1                           | <i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i>                        |
| VEGF                             | <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>                       |
| Verd.                            | Verdünnungsverhältnis                                           |
| VLA-4                            | <i>Very Late Antigen-4</i>                                      |
| W/H-Ratio                        | <i>waist to hip ratio</i>                                       |

## **1 Einleitung und Zielsetzung**

### **1.1 Einleitung**

#### **1.1.1 Fettgewebe**

In den letzten Jahrzehnten veränderte sich die klassische Sicht über das Fettgewebe dramatisch. Noch vor einigen Jahren bestand die Meinung, dass die einzige Aufgabe des Fettgewebes in der Speicherung der Energie in Form von Triacylglyceriden (Lipogenese) und der Abgabe der Energie in Form von freien Fettsäuren (Lipolyse) lag (Löffler, 1997).

Heute ist bekannt, dass das Fettgewebe weitaus mehr Aufgaben erfüllt. Zum einen ist das Fettgewebe auch das größte endokrine Organ des Körpers, welches eine Vielzahl an Hormonen und Enzymen sezerniert (zur Übersicht: Kershaw et al., 2004; Ahima, 2006; Scherer, 2006; Fischer-Posovszky et al., 2007; Waki und Tontonoz, 2007; Kiess et al., 2008; Vázquez-Vela et al., 2008). Zum anderen gibt es deutliche Hinweise, dass im Fettgewebe Stamm-/ Progenitorzellen (Vorläuferzellen) vorkommen (zur Übersicht: Zuk et al., 2002; Strem et al., 2005; Rodriguez et al., 2006; Meliga et al., 2007; Bunnell et al., 2008).

##### **1.1.1.1 Unterteilungen des Fettgewebes**

Das Fettgewebe kann in zwei unterschiedliche Typen unterteilt werden: weißes und braunes Fettgewebe. Das weiße Fettgewebe erscheint gelb oder elfenbeinfarbig. Die weißen adulten Fettzellen (Adipozyten) sind kugelförmig bzw. sphärisch, da sie in dieser Form nur minimalen Raum für eine maximale Volumenausdehnung benötigen, und besitzen univakuoläre Fetttropfen, die bis zu 50 µm groß werden können (Napolitano, 1963). Diese univakuolären Fetttröpfchen nehmen den größten Teil des intrazellulären Raumes der Adipozyten ein, so dass sie das Zytoplasma und den Kern an die Seiten verdrängen, die dann wie ein dünner Rand erscheinen (Avram et al., 2005). Befinden sich die weißen Adipozyten noch in der Differenzierung zu adulten Adipozyten, besitzen die Zellen noch multivakuoläre Fetttröpfchen (Frühbeck, 2008).

Das braune Fettgewebe ist durch multivakuoläre Fetttröpfchen (Afzelius, 1970), durch eine große Anzahl an Mitochondrien und durch eine starke Innervation durch das sympathische Nervensystem sowie durch eine sehr gute Vaskularisation (Sell et al., 2004) charakterisiert. Das braune Fettgewebe speichert weniger Fett und wandelt die gespeicherte Energie in Wärme um. Die Umwandlung von Energie in Wärme wird als Thermogenese bezeichnet und ist die Hauptaufgabe des braunen Fettgewebes (Cannon und Nedergaard, 2004). Verantwortlich dafür ist das in der inneren Mitochondrienmembran gebildete *Uncoupling Protein-1* (UCP-1) (Klein et al., 2002). Das UCP-1 ist spezifisch für braune Adipozyten und ermöglicht die Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung in der Atmungskette. Dadurch kann die gespeicherte Energie in Form von Wärme abgegeben werden. Besonders bei Neugeborenen lässt sich braunes Fettgewebe im Bereich des Nackens und zwischen den Schulterblättern finden, sinkt aber während des Älterwerdens. Dennoch findet man vereinzelt bei Erwachsenen innerhalb des weißen Fettgewebes braune Adipozyten, die UCP-1 exprimieren (Frühbeck, 2008).

Das weiße Fettgewebe stellt dagegen den größten Energiespeicher des Körpers dar und gibt die gespeicherte Energie in Form von freien Fettsäuren in den Blutkreislauf, falls Energie benötigt wird. Weißes Fettgewebe wird anhand der Lokalisation in viszerales (ca. 20 %) und in subkutanes (ca. 80 %) Fett unterteilt (Frühbeck, 2008). Das subkutane Fettgewebe besteht aus einem oberflächlichen und einem tiefen Anteil, während sich das viszerale Fettgewebe aus einem intraperitonealen und einem retroperitonealen Part zusammensetzt. Das intraperitoneale Fettgewebe, welches aus einem omentalen und einem mesenterischen Teil besteht, macht den Großteil des viszeralen Fettgewebes aus (Abate et al., 1994; Smith et al., 2001; Frühbeck, 2008). Darüber hinaus findet man auch weißes Fettgewebe als Schutzpolster um Organe herum z.B. bei Herz, Niere, Genitalien oder in der Retroorbitalregion und innerhalb des Knochenmarks.

#### **1.1.1.2 Endokrine Bedeutung des Fettgewebes und Assoziation zum kardiovaskulären Risiko**

Neben der Energiespeicherung produziert und sezerniert das weiße Fettgewebe auch eine Vielzahl an Hormonen, Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Enzymen und Komplementärfaktoren. Diese werden als Adipokine bezeichnet. Durch Adipokine

steht das Fettgewebe mit anderen endokrinen Organen und dem Zentralen Nervensystem (ZNS) in enger Verbindung und beeinflusst den Energiehaushalt (Lipid- und Kohlenhydratstoffwechsel, Appetit), das Immunsystem, die Blutgerinnung, reproduktive Funktionen und die Insulinsensitivität (Zur Übersicht: Guerre-Millo, 2004; Ronti et al., 2006).

Im Gegensatz zum subkutanen Fettgewebe sezerniert das viszerale (intra-abdominale) Fettgewebe eher proinflammatorische Adipokine. Hierdurch ist es mit einem höheren Risiko für das Auftreten des metabolischen Syndroms sowie kardiovaskuläre Erkrankungen assoziiert (Fantuzzi und Mazzone, 2007). So werden im viszeralen Fett der Tumor Nekrose Faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), Interleukin 6 (IL 6) und Resistin gebildet, die alle eine Insulinresistenz verstärken. Das viszerale Fett produziert eine zwei bis dreifach höhere Menge an IL 6 als das subkutane Fettgewebe (Fain et al., 2004) und der Plasmaspiegel des IL 6 korreliert positiv mit dem BMI (Body Mass Index). Darüber hinaus korrelieren die Plasmaspiegel von Angiotensinogen (AGE) und *Plasminogen Aktivator Inhibitor* (PAI-1) mit vaskulären Komplikation der Adipositas, wie zum Beispiel der arteriellen Hypertonie und Auftreten von Thrombosen (Ailhaud, 2000). Visfatin wird ebenfalls v.a. im viszeralen Fettgewebe gebildet und der Plasmaspiegel dieses Zytokins steigt ebenfalls mit dem Gewicht an.

Das subkutane Fettgewebe sezerniert Leptin und Adiponektin, die eine positive Wirkung auf die Insulinsensitivität, die Energiebalance und auf das Kreislaufsystem ausüben (Farooqi, 2002). Das kardiovaskuläre Risiko steigt nicht nur bei Übergewicht. Ebenso spielt die Verteilung des Fettgewebes eine besondere Rolle. Selbst bei Menschen, die zwar einen normalen Body Mass Index, aber einen zu großen Taillenumfang aufweisen, steigt das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen und das Mortalitätsrisiko (Zylka-Menhorn, 2008). Androide Adipositas, also die Zunahme des tiefen abdominalen subkutanen und viszeralen Fettgewebes, korreliert stärker mit einem ansteigenden Risiko für Dyslipidämie, Hypertension, Artherosklerose und Diabetes Typ II als die gynoide Adipositas (Björntorp, 1998). Bei der gynoiden Adipositas ist das subkutane gluteo-femorale Fettgewebe erhöht. Subkutanes gluteales Fettgewebe und Hüftfett scheinen vor Stoffwechselerkrankungen und kardiovaskulärer Morbidität eher zu schützen (Kahn et al., 1996). Diese depotspezifischen Unterschiede ergeben sich durch einen unterschiedlichen Metabolismus der Adipozyten.

Darüber hinaus könnte zusätzlich auch eine unterschiedliche Kapazität der mesenchymalen Stamm-/ Progenitorzellen in den verschiedenen Fettgewebepots die unterschiedlichen Risikoprofile begründen. Jedoch sind depot-spezifische Funktionsunterschiede humaner Fettzellen und der korrespondierenden Stamm-/ Progenitorzellen aus dem subkutanen Fettgewebe bisher nur unzureichend untersucht.

### **1.1.2 Multipotente mesenchymale Stamm-/ Progenitorzellen**

Stammzellen sind undifferenzierte Zellen, die sich selbst erneuern können (*self-renewal*). Stammzellen müssen daher die Fähigkeit zur symmetrischen Teilung besitzen, um den Pool der undifferenzierten Zellen durch Proliferation aufrecht zu erhalten (Caplan, 1991). Aus den Stammzellen entstehen aber auch die funktionellen, differenzierten Zellen des Körpers. Bei Schaden eines Gewebes und Zelluntergang bedingen Stammzellen also die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase eines Organismus. Hierbei teilen sich die undifferenzierten Stammzellen asymmetrisch, d.h. die zwei entstandenen Zellen sind nicht identisch (Caplan, 1991). Dadurch entstehen eine neue Stammzelle und eine Progenitorzelle eines bestimmten Zelltyps. Während der weiteren Differenzierung entstehen aus den Progenitorzellen die spezialisierten Zellen des jeweiligen Organs.

Im Knochenmark gibt es beispielsweise hämatopoetische Stammzellen die lebenslang für die Blutbildung zuständig sind (Kiel und Morrison, 2008). Weiterhin kommen im Knochenmark sog. mesenchymale Stammzellen (*Mesenchymal Stem Cells*, MSCs) vor (Pittenger et al., 1999). Den Grundstein für die Forschung an MSCs legten Friedenstein und seine Mitarbeiter 1968, in dem sie fibroblastoiden Zellen aus dem Knochenmark isolierten, die adhärent zu Plastikkulturmateriale waren (Friedenstein et al., 1968). Anfang der Neunziger Jahre prägte Caplan erstmals für diese Zellen den Begriff der mesenchymalen Stammzelle (Caplan, 1991). Da die Isolation *via* Plastikadhärenz allerdings zu einer relativ heterogenen Zellpopulation führt, wurde kürzlich in einem internationalen Konsens der Begriff der mesenchymalen Stromazelle (ebenfalls mit der Abkürzung MSC; Dominici et al., 2006) eingeführt.

MSCs sind Plastik adhärent und können unter definierten Kulturbedingungen *in vitro* expandiert werden. Dabei entstehen unter fortlaufender Passagierung

spindelförmige Zellen (Haynesworth et al., 1992; Pittenger et al., 1999; Colter et al., 2001; Jiang et al., 2002). Durch diese Eigenschaft lassen sich die MSCs aber nicht von Monozyten unterscheiden. Daher müssen über 95% der MSCs die Oberflächenmarker CD105 (Endoglin), CD73 (Ecto-5'-Nucleotidase) und CD90 (Thy-1) exprimieren und mindestens negativ für hämatopoetische Marker wie CD45 (Leukozyten) und CD34 (hämatopoetische Progenitorzellen) sein. Außerdem müssen die MSCs nach Applikation definierter Medien *in vitro* zu Osteoblasten, Chondroblasten und Adipozyten differenzieren können (Dominici et al., 2006).

Während eine Identifikation hämatopoetischer Stammzellen durch FACS-Analyse relativ sicher gelingt, wurde ein spezifischer Marker für MSCs bis heute nicht entdeckt (Wulf et al., 2006). MSCs exprimieren ein breites Antigenmuster (Minguell et al., 2001). Dieses relativ unspezifische Expressionsprofil (Bianco und Robey, 2001) macht eine gezielte Identifikation anhand der Oberflächenmarkermolekülen bisher unmöglich.

Kürzlich wurde sogar anhand von 22 Oberflächenmarkermolekülen gezeigt, dass die humanen Fibroblasten Zell-Linien HS68 und NHDF einen identischen morphologischen Phänotyp besitzen und nicht von den mesenchymalen Stammzellen unterschieden werden können (Wagner und Ho, 2007). Der zentrale Punkt in der Identifikation und Charakterisierung mesenchymaler Stamm-/Progenitorzellen ist daher die Analyse der Differenzierung in die osteogene, adipogene oder chondrogene Zellrichtung (Dominici et al., 2006). Gemäß den Kriterien zur Charakterisierung von MSCs (Dominici et al., 2006) sollte die Differenzierung in Osteoblasten anhand der histochemischen Färbungen Alizarin-Rot und/ oder von Kossa demonstriert werden. Die adipogene Differenzierung wird durch Sudan III- bzw. Oil-Red-O-Färbung der Fettvakuolen nachgewiesen. Die chondrogene Differenzierung kann durch den Nachweis von Proteoglykanen durch Alcianblau-Färbung bzw. durch immunhistochemischen Nachweis von Kollagen Typ 2 gezeigt werden (Pittenger et al., 1999; Niemeyer et al., 2004).

Mittlerweile konnten MSCs neben dem Knochenmark auch aus anderen Geweben erfolgreich isoliert werden. Hierzu gehört der Skelettmuskel (Williams et al., 1999), das Nabelschnurblut (Erices et al., 2000) und das fetale Blut (Noort et al., 2002), die Synovia (De Bari et al., 2001), die Zahnpulpa (Gronthos et al., 2000), das Fruchtwasser (In't Anker et al., 2003), die Leber (Campagnoli et al., 2001) und

die Lunge (Fan et al., 2005). Eine weitere Quelle für MSCs stellt auch das subkutane Fettgewebe dar (Gronthos et al., 2001; Zuk et al., 2001). Dieses organübergreifende Vorkommen von MSCs könnte im Zusammenhang mit der kürzlich dargestellten Hypothese stehe, dass diese Stammzellen *in vivo* perivaskulär lokalisiert sind und den Perizyten entsprechen (Lin et al., 2008). Wie das Knochenmark ist auch das subkutane Fettgewebe mesodermalen Ursprungs und besteht aus einer heterogenen stromalen Zellpopulation, die aus Makrophagen, Fibroblasten, Perizyten, Endothelzellen, Leukozyten sowie glatten Muskelzellen, Preadipozyten und auch aus MSCs - den in dieser Lokalisation sog. *adipose derived stem cells* (ADSCs) - besteht (Oedayrajsingh-Varma et al., 2006; Prunet-Marcassus et al., 2006). Vergleiche mit MSCs aus Knochenmark und Nabelschnurblut zeigten, dass kein eindeutiger Unterschied zu den aus dem subkutanen Fettgewebe stammenden Stamm-/ Progenitorzellen bezüglich der Morphologie, der Expression von Oberflächenmarkermolekülen und der Differenzierungskapazität besteht (Izadpanah et al., 2006; Kern et al., 2006).

Die Rate der erfolgreichen Isolation der Stammzellen aus dem Knochenmark und aus dem subkutanen Fettgewebe war mit 100% derjenigen aus dem Nabelschnurblut (63%) allerdings überlegen (Kern et al., 2006). Im direkten Vergleich zum Knochenmark kann auf das subkutane Fettgewebe aber viel leichter und wiederholt zugegriffen werden. Darüber hinaus kann die Entnahme von Knochenmark mit größeren Schmerzen und Komplikationen seitens der Spender verbunden sein und das Volumen des unter Lokalanästhesie entnommenen Knochenmarks ist auf 40 ml und ca.  $1,2 \times 10^9$  Zellen limitiert. Bei größeren Volumina kommt es zu einer stärkeren Verdünnung der Stammzellfraktion durch einen höheren Anteil an stammzellfreiem Blut (Bacigalupo et al., 1992). Dagegen kann man aus dem subkutanen Fettgewebe leicht Mengen bis zu 200 ml und mehr gewinnen. Diese enthalten pro 100 ml Lipoaspirat ca.  $2 \times 10^8$  Zellen (Aust et al., 2004), woraus sich ca.  $1 \times 10^6$  Stammzellen ergeben. Somit kann aus dem subkutanen Fettgewebe eine fast 40mal größere Menge an MSCs als aus dem Knochenmark gewonnen werden (Strem et al., 2005).

Neben der klassischen Differenzierung in Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten (zur Übersicht: Zuk et al., 2001) konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die ADSCs *in vitro* auch in Skelettmuskel (Mizuno et al., 2002; Zuk et al.,

2002; Strem et al., 2005), glatte Muskelzellen (Rodriguez et al., 2006), Endothelzellen (Miranville et al., 2004; Planat-Bernard et al., 2004; Cao et al., 2005), Kardiomyozyten (Planat-Bernard et al., 2004) und in Zellen der neuronalen Zellrichtung (Safford et al., 2002; Zuk et al., 2002.; Ashjian et al., 2003) transdifferenzieren können. Diese Transdifferenzierungsfähigkeit wird allerdings weiterhin kontrovers diskutiert und ist noch nicht eindeutig bewiesen.

### **1.1.3 Einsatz von Stamm-/ Progenitorzellen aus Fettgewebe in der Medizin**

Durch ihre Fähigkeit zur Proliferation können theoretisch größere Mengen von Stamm-/ Progenitorzellen *in vitro* generiert werden. Da eine Differenzierung in verschiedene spezialisierte Zelltypen beschrieben wurde, besteht die Hoffnung, dass mesenchymale Stamm-/ Progenitorzellen in der Zukunft zur Reparatur von unterschiedlichen Gewebedefekten eingesetzt werden können (Mizuno, 2009).

ADSCs wurden bereits erfolgreich bei der Reparatur von Knochendefekten eingesetzt. Bei einem sieben Jahre alten Mädchen wurde ein großer, bilateraler Calvariumdefekt mit autologen ADSCs zusammen mit Knochen aus dem Beckenkamm, Fibrin Klebstoff und einem resorbierbaren Netz versorgt. Nach drei Monaten wurde anhand von CT-Aufnahmen eine Ossifikation über dem Defekt beobachtet (Lendeckel et al., 2004). Neben dem Einsatz in der Orthopädie (zur Übersicht: Tapp et al., 2009) wurden ADSCs auch in der plastischen Chirurgie für Rekonstruktionen von Weichteilgewebedefekten angewandt (Moseley et al., 2006). Darüber hinaus wurden autologe ADSCs in einer Pilotstudie zur Behandlung von offenen Fisteln bei 5 Patienten mit der chronisch entzündlichen Darmerkrankung Morbus Crohn eingesetzt. Dabei konnten 6 von 8 Läsionen mit autologen ADSCs geschlossen werden (Garcia-Olmo et al., 2005). Im Tiermodell wurden Knorpeldefekte mit autologen ADSCs, die chondrogen induziert und in ein Fibrinklebstoff Gitter platziert wurden, erfolgreich behoben (Dragoo et al., 2007).

Große Hoffnungen werden in die ADSCs auch bei der Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen gelegt, da kardiovaskuläre Erkrankungen die führenden Todesursachen in Deutschland darstellen (Statistisches Bundesamt, 2007). Anhand von murinen Myokardinfarktmodellen konnte gezeigt werden, dass die auf dem vernarbten Myokard transplantierten ADSCs in Kardiomyozyten differenzierten und zu Verbesserung der Herzfunktion führten (Strem et al., 2005; Moon et al., 2006).



Weiterhin wurde gezeigt, dass ADSCs einen angiogenetischen (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) und einen antiapoptotischen (*hepatocyte growth factor*, HGF) Wachstumsfaktor sezernieren. Es wurde postuliert, dass sich hierdurch ebenfalls die Perfusion nach Hinterwandinfarkten bei Mäusen verbesserte (Miranville et al., 2004; Rehman et al., 2004). Eine Vergleichsstudie zeigte kürzlich, dass ADSCs sogar bessere proangiogenetische Effekte nach Hinterwandinfarkten ausüben als MSCs aus Knochenmark (Kim et al., 2007). Somit erweist sich das subkutane Fettgewebe als eine geeignete Quelle für Stamm-/ Progenitorzellen zum möglichen Einsatz in der regenerativen Medizin.

## **1.2 Zielsetzung**

Ziel der Studie war es, das subkutane abdominale und gluteale Fettgewebe genauer zu charakterisieren und eventuelle Unterschiede hinsichtlich der Morphologie, des Genexpressionsmusters und des Vorkommens mesenchymaler Stamm-/ Progenitorzellen genauer herauszuarbeiten. Neben der Antragsstellung bei der Ethikkommission der Universität zu Lübeck (März 2007; Nr. 06-220), der Studienplanung, der Probandinnenrekrutierung und der Organisation des gesamten Ablaufs der Studie des klinischen Teils, richtete sich der experimentelle Fokus dieser Dissertationsarbeit auf die Isolation und Charakterisierung der mesenchymalen Stamm-/ Progenitorzellen aus den beiden Fettgewebsquellen (siehe Abbildung 1, Seite 10). Hierbei sollte herausgefunden werden, ob die Plastik adhärennten Zellen, isoliert aus dem glutealen und abdominalen subkutanen Fettgewebe, sich bezüglich der Expression von Oberflächenmarkermolekülen, der Proliferations- und / oder der Differenzierungskapazität unterscheiden. Dadurch sollte auch eine Aussage getroffen werden, ob sich eines der Depots als Zellquelle für die regenerative Medizin besser eignet. Für die experimentellen Untersuchungen zur Charakterisierung der Stamm-/ Progenitorzellen wurden folgende Methoden verwendet:

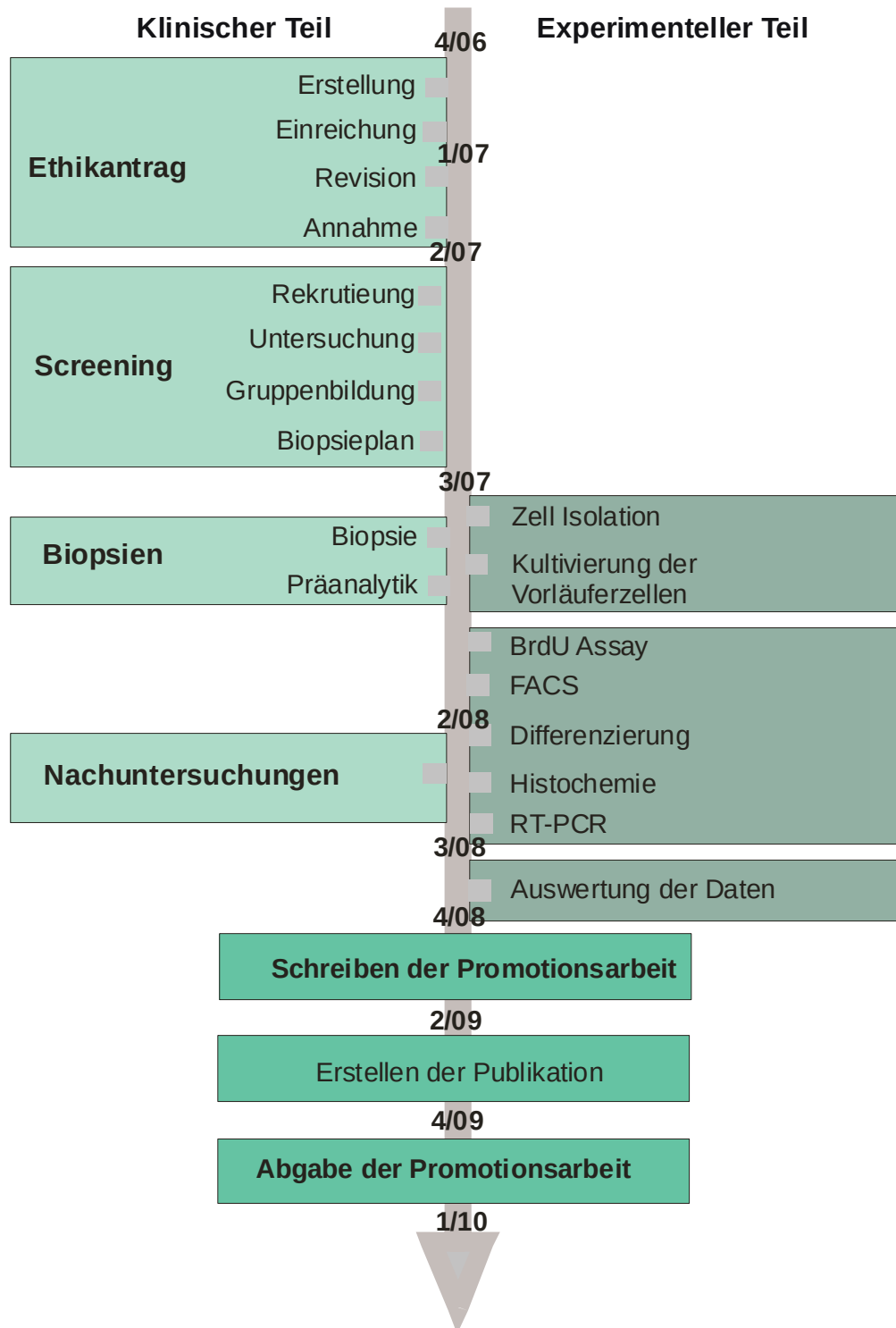
- 1) Isolation der Zellen *via* Plastikadhärenz
- 2) Durchflusszytometrische Charakterisierung der Expression von Oberflächenmarkermolekülen mittels FACS-Analyse
- 3) Untersuchung der Zellproliferation mit Hilfe eines BrdU-Assays

- 4) Differenzierung der isolierten Zellen in die adipogene, chondrogene und osteogene Richtung. Als Kontrolle wurden humane juvenile und adulte Fibroblasten mitgeführt.

Darüber hinaus wurde ein Teil der Gewebeproben direkt nach Entnahme durch einen Plastischen Chirurgen, Herrn Dr. W. Eisenbeiss (Klinik für Plastische Chirurgie, Universität zu Lübeck) zur morphologischen Charakterisierung an einen Dermatohistopathologen, Herrn Dr. C. Rose (Klinik für Dermatologie, Universität zu Lübeck), weitergereicht. Ein weiterer Teil der Proben wurde zur Gen-Array-Analyse durch einen kommerziellen Anbieter (Milenyi Biotech, Gladbach) weiterprozessiert. Proben für Protein- und RNA-Analysen wurden kryokonserviert. Die logistische Durchführung der Probenentnahme und Verteilung war ebenfalls Teil dieser Promotionsarbeit.

## 2 Material und Methoden

Methodisch und inhaltlich ist die Promotionsarbeit in einen klinischen (siehe 2.1) und einen experimentellen Teil (siehe 2.2) gegliedert. Eine Übersicht des zeitlichen und inhaltlichen Ablaufs der gesamten Arbeit gibt Abbildung 1.



**Abbildung 1:** Zeitliche und inhaltliche Gliederung der Studie: Dargestellt sind die Quartalsabschnitte der Jahreszahlen und wesentliche Meilensteine der Promotionsarbeit.

## **2.1 Klinischer Teil**

Die Untersuchung der mesenchymalen Stamm-/ Progenitorzellen aus dem abdominalen und glutealen subkutanen Fettgewebe war ein Teilaspekt einer größeren angelegten Studie, die in Kooperation mit verschiedenen Instituten der Universität zu Lübeck (Medizinische Klinik I: Prof. Dr. J. Klein und PD Dr. J. Kramer; Klinik für Dermatologie: Dr. C. Rose; Klinik für Plastische Chirurgie: Dr. W. Eisenbeiss und dem Institut für Virologie und Zellbiologie: Prof. Dr. J. Rohwedel) sowie mit der Beiersdorf AG Hamburg durchgeführt wurde. Der Fokus der übergeordneten Studie unter der Leitung von Prof. Dr. J. Klein lag dabei weitgehend unabhängig von der vorliegenden Promotionsarbeit auf der Charakterisierung der Unterschiede des Fettgewebes von Frauen mit bzw. ohne Zellulite.

### **2.1.1 Genehmigung der Studie**

Der Ethikantrag zu dieser Studie wurde gemäß den geltenden Richtlinien („nicht interventionelle Prüfung“ nach AMG §4 Abs.23) der Universität zu Lübeck im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit bearbeitet und eingereicht. Die Ethikkommission Lübeck genehmigte diese Studie (Nr.06-220) im März 2007.

### **2.1.2 Rekrutierung und Screening der Probandinnen**

Probandinnen im Alter zwischen 25 und 35 Jahren wurden mittels Emailverteiler der Universität zu Lübeck, Aushängen und eines Zeitungsartikel in einer lokalen Tageszeitung gesucht. Die Ein- und Ausschlusskriterien (siehe Tabelle 1) wurden mit den möglichen Probandinnen am Telefon durchgesprochen, bevor sie zu einem genaueren Untersuchungstermin eingeladen wurden. Die Probandinnenaufklärung erfolgte mindestens 24 Stunden vor den geplanten Untersuchungen und wurde durch eine Einwilligungserklärung dokumentiert (siehe Anhang: Probandinnenaufklärung, Seite 93).

Für die Studie wurden primär während eines ersten Untersuchungstermins in der endokrinologischen Poliklinik der Medizinischen Klinik I (Direktor: Prof. Dr. H. Lehnert) an der Universität zu Lübeck insgesamt 44 möglichen Probandinnen

ausführlich befragt und körperlich untersucht (siehe Tabelle 2). Darüber hinaus wurden die Biopsieareale mittels Foto dokumentiert (siehe Abbildung 2).

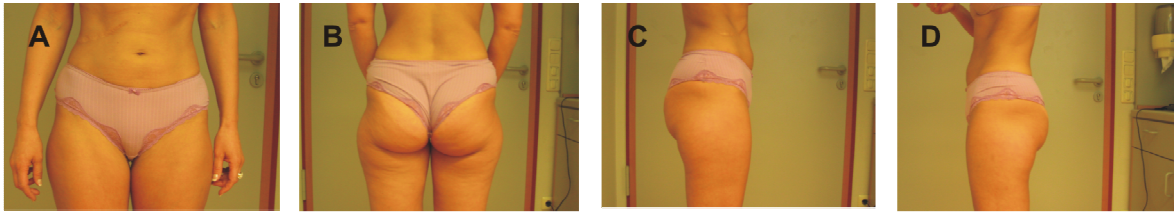
Da eine Kooperation mit der Beiersdorf AG Hamburg bestand, besuchten 44 der möglichen Probandinnen die Beiersdorf AG für einen zweiten Untersuchungstermin. Dort erfolgten eine zweite Fotodokumentation, eine Begutachtung des Zellulitegrades, eine Laserdoppler-Untersuchung, eine Lipometrie und eine Impedanz-Messung durch die Mitarbeiter der Beiersdorf AG. Die Ergebnisse wurden im Rahmen der übergeordneten Studie zum Vergleich von Patientinnen mit bzw. ohne Zellulite ausgewertet. Zur Auswahl der Biopsiegruppe wurde auch der für die Probenentnahme verantwortliche Facharzt für Plastische Chirurgie Herr Dr. W. Eisenbeiss (Klinik für Plastische Chirurgie, Universität zu Lübeck) zur Beurteilung des Biopsiegebietes hinzugezogen. Für die spätere Gruppeneinteilung wurden Frauen ausgesucht, die bei der körperlichen Untersuchung und der Anamnese keine signifikanten Unterschiede zeigten.

**Tabelle 1:** Ein- und Ausschlusskriterien

| <b>Einschlusskriterien</b>  | <b>Ausschlusskriterien</b>                                                                                                                                                                                                                                                |
|-----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Weiblich<br>25 bis 35 Jahre | Zyklusstörungen / Menopause<br>Lipidstörungen / Lipodystrophie<br>Diabetes<br>Raucher<br>Keloidbildungstendenz<br>übermäßiger Alkoholkonsum<br>Depressionen<br>Schwangerschaft<br>Bekannte Allergie auf Lokalanästhetika<br>Medikamente außer zur Kontrazeption („Pille“) |

**Tabelle 2:** Anamnese und körperliche Untersuchung

| <b>Anamnese</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | <b>Körperliche Untersuchung</b>                                                                                                                                                                                                                                                         |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>- Alter</li> <li>- Allg. Anamnese inklusive Vorerkrankungen</li> <li>- Zyklusanamnese</li> <li>- Medikamentenanamnese</li> <li>- Körperliche Aktivität/Sport</li> <li>- Sozialanamnese</li> <li>- Alkoholkonsum</li> <li>- Familienanamnese</li> <li>- Phlebologie (Krampfadern, -entfernung, Besenreiser)</li> <li>- Kosmetische OPs</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Allgemeiner Status</li> <li>- Gewicht</li> <li>- Größe</li> <li>- BMI</li> <li>- Bauchumfang</li> <li>- Taillenumfang</li> <li>- W/H Ratio</li> <li>- Blutdruck</li> <li>- Puls</li> <li>- Fotodokumentation (vor und nach Biopsie)</li> </ul> |



**Abbildung 2:** Beispiel der Fotodokumentation beim Screening zur Beurteilung des Biopsiegebietes. Fotografiert wurden der Bauch (A), Gesäß (B) und die lateralen Körperansichten (C; D). Anschließend wurde mit einem Facharzt für Plastische Chirurgie besprochen, ob eine Biopsie vertretbar ist.

### **2.1.3 Auswahl der Probandinnen**

Das ausgesuchte Kollektiv bestand aus 14 Probandinnen. Das Alter variierte zwischen 25 und 35 Jahren und lag im Mittel bei 29,35 Jahren (siehe auch 3.1.1).

### **2.1.4 Erstellen des Versuchsplans und Ablauf der Biopsie**

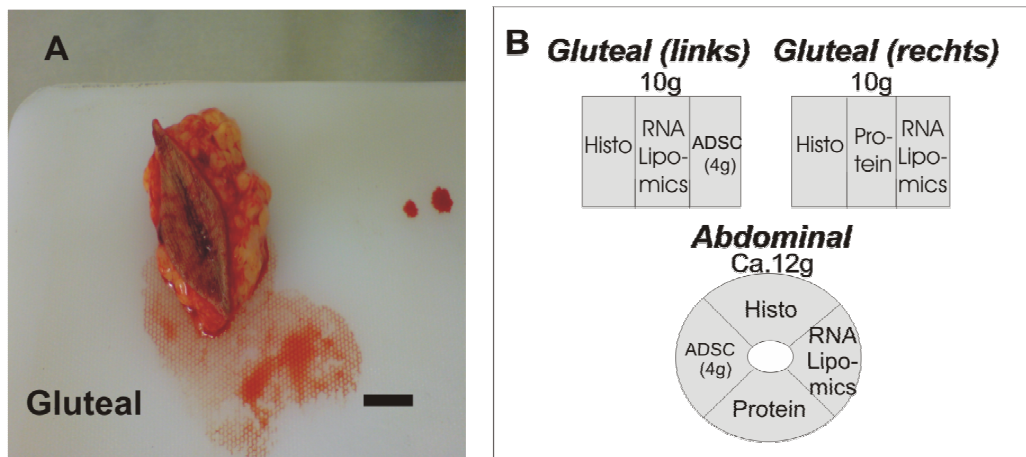
Zum Erstellen des Biopsieplans wurde gemeinsam mit den Probandinnen der 7. Tag nach dem letzten Tag der Menstruation bestimmt und dieser Tag ( $\pm 1$  Tag) als Biopsietag gewählt. Dadurch war gewährleistet, dass sich die Probandinnen annähernd in demselben Zyklusstadium befanden und somit Hormonschwankungen innerhalb des Kollektivs weitgehend ausgeschlossen wurden. Dieses kleine Zeitfenster hatte aber auch zur Folge, dass kurzfristig die Biopsietermine um ein paar Tage oder um eine gesamte Zykluslänge verschoben werden mussten. Dieses setzte eine enge Koordination mit den Probandinnen und dem Biopsieteam voraus. Am Tag der Biopsie erschienen die Probandinnen nüchtern um 8:00 Uhr in der Klinik. Nach 10-minütigem Liegen wurde den Probandinnen Blut zur laborchemischen Bestimmung auch der wesentlichen kardiometabolischen Risikoparameter abgenommen (siehe Tabelle 3).

**Tabelle 3:** Aufgelistet sind die untersuchten Blutparameter.

|                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Klinische Chemie</b>          | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Alkalische Phosphatase</li> <li>- Bilirubin</li> <li>- BSG</li> <li>- Cholesterin, LDL-/HDL-Cholesterin</li> <li>- Creatinkinase (CK)</li> <li>- CRP</li> <li>- Elektrolyte (Na, K, Ca, Cl, P)</li> <li>- Ferritin</li> <li>- Folsäure</li> <li>- GGT, GOT, GPT</li> <li>- Harnsäure</li> <li>- Kreatinin</li> <li>- Lactat</li> <li>- LDH</li> <li>- Lipase</li> <li>- Triglyzeride</li> <li>- Vit. B12</li> </ul> |
| <b>Hämatologie und Gerinnung</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Kleines Blutbild</li> <li>- Fibrinogen</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| <b>Endokrine Parameter</b>       | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Adiponectin, Leptin, IL-6</li> <li>- Cortisol, ACTH,</li> <li>- Insulin, HbA1c, C-Peptid, IGF-1</li> <li>- LH, FSH, Östradiol, Testosteron, Progesteron, SHBG, DHEAS, Prolaktin</li> <li>- Renin, Aldosteron</li> <li>- TSH, fT3, fT4</li> </ul>                                                                                                                                                                    |

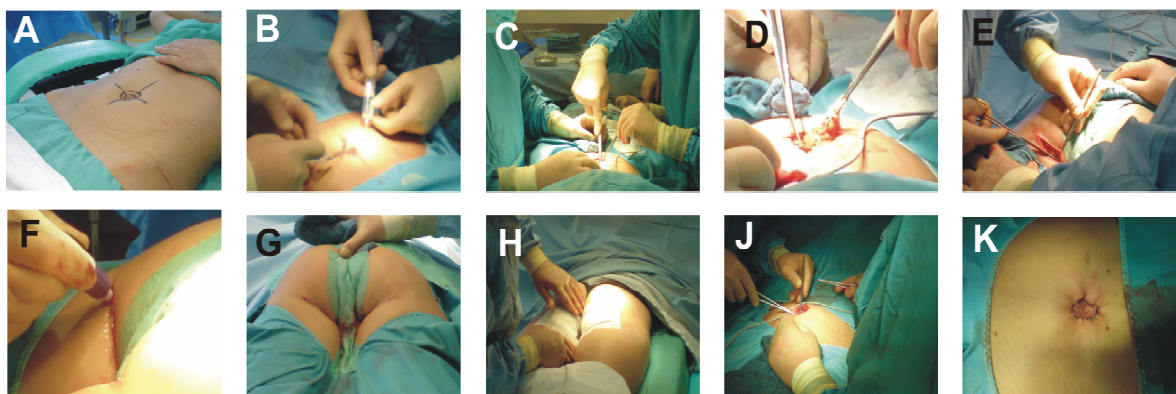
Darüber hinaus mussten die Probandinnen eine Urinprobe abgeben, um eine Mikroalbuminurie und eine Schwangerschaft auszuschließen. Die Analyse der Laborparameter erfolgte im Routinebetrieb des Zentrallabors der Universität zur Lübeck (Leiter: Prof. Dr. M. Seyfarth).

Bis zum Biopsiebeginn wurden die Probandinnen persönlich betreut. Um 15:00 Uhr wurde die Biopsie unter sterilen OP-Bedingungen durchgeführt. Dabei wurde in Lokalanästhesie durch einen Facharzt für Plastische Chirurgie (Herrn Dr. W. Eisenbeiss, Klinik für Plastische Chirurgie, Universität zu Lübeck) aus dem subkutanen abdominalen Fettgewebe nach einem periumbilikalen Schnitt und aus dem subkutanen glutealen Fettgewebe nach einem Schnitt in der glutealen Umschlagsfalte beidseits Gewebeproben entnommen (je ca. 10-12 g Fettgewebe mit Hautanhang, siehe Abbildung 3 A). Die Proben wurden vor Ort für die einzelnen kooperierenden Institute ohne zeitliche Verzögerung sofort weiter verarbeitet (siehe Abbildung 3 B).



**Abbildung 3:** Schematische Übersicht zur Verwendung der Gewebestücke: Für die glutealen Gewebeprobe(n) (A) wurde ein Längsschnitt entlang der Gesäßfalte gemacht. Dadurch erhielt man längliche Probe von ca. 10 g, die links für die ADSCs (*adipose tissue derived stem cells*; ca. 4 g), die Histologie (ca. 3 g) und die RNA Untersuchung (ca. 3 g) aufgeteilt wurde. Die rechte gluteale Fettgewebeprobe wurde jeweils zu 1/3 für die Histologie, Protein- und RNA-Untersuchungen aufgeteilt. Für die abdominale Probe wurde periumbilikal geschnitten, so dass man annähernd kreisrunde Proben von ca. 12 g Gewicht erhielt. Diese Probe wurde zu je 1/4 für die Isolation der Zellen aus Fettgewebe (ADSCs) Protein- und RNA- Untersuchung sowie histologischen Analysen unterteilt. Bar = 1 cm.

Eine exemplarische Darstellung über den Ablauf der Gewebeentnahme ist in Abbildung 4 gezeigt.



**Abbildung 4:** Exemplarische Darstellung der Gewebeentnahme. Zunächst wurde das Entnahmearéal angezeichnet (A). Nach einer lokalen Betäubung (B) wurde das Fettgewebe bis auf die Faszie mobilisiert (C) und die Proben entnommen (D). Gluteal wurde als Verschluss zunächst subkutan genäht (E) und zum Schluss wurden die Wundränder mit Dermabond (Ethicon, Johnson & Johnson MEDICAL GmbH) verklebt (F). Somit wurde ein sicherer und narbenarmer Verschluss (G) gewährleistet. Zuletzt kam ein festes Druckpflaster auf die Wunden (H). Abdominal wurde periumbilikal mit subkutanen und intrakutanen Nähten verschlossen (J, K).

Für die histologischen Untersuchungen wurden jeweils eine abdominale und zwei gluteale Fettgewebeproben aller Probandinnen in 4 %-igen Formalin fixiert und an dem darauf folgenden Tag zum UKE gesendet, um dort weiterverarbeitet zu



werden. Im Fall, dass die Biopsie an einem Freitag oder Samstag stattfand, wurde das Formalin jeden Tag bis zur Versendung gewechselt.

In Kooperation mit Herrn Dr. C. Rose (Klinik für Dermatologie, Universität zu Lübeck) wurden Hämatoxylin-Eosin-, Elastika- und Muzin-Färbungen durchgeführt, um die Struktur des Fettgewebes einschließlich der Bindegewebssepten zu beurteilen. Mittels Naphtol AS-D Choracetatesterase-Färbung (Mastzellen) und drei immunhistologischen Reaktionen (B-Zellen (CD20), T-Zellen (CD3) und Makrophagen (CD 68)) wurde nach entzündlichen Infiltraten gesucht.

Die Proben für RNA-Expressionsanalysen und Lipomics wurden zunächst in flüssigen Stickstoff bei - 80 °C gelagert und nach Abschluss aller Biopsien zu den jeweiligen kooperierenden Zentren verschickt.

Die Gewebeproben von jeweils 10 Probandinnen wurden für die depotspezifischen Stamm-/ Progenitorzell-Untersuchungen zunächst in PBS gelegt und nach der Biopsie und dem Entlassen der Probandin am gleichen Tag weiter verarbeitet (siehe 2.2.3.1 Isolation der Stamm-/ Progenitorzellen).

Nach der Biopsie wurden die Probandinnen für mindestens eine Stunde betreut, bevor diese von einer Begleitperson abgeholt werden durften.

### **2.1.5 Nachsorge der Probandinnen**

Die Nachuntersuchungen fanden zusammen mit Herrn Dr. W. Eisenbeiss am 1., 3., und 6. postoperativen Tag und im weiteren Verlauf nach Bedarf statt. Nach 10 bis 14 Tagen wurden die Fäden gezogen und ca. 1 bis 2 Wochen später fand ein erneuter Termin statt, um sicher zu gehen, dass die Wunden gut verheilt waren. Bei guter Heilung wurde vereinbart, dass zwischen 6 bis 12 Monaten erneut ein Nachuntersuchungstermin stattfinden sollte.

## **2.2 Experimenteller Teil**

### **2.2.1 Geräte**

- Mikroskope: Wild MPS51 (Heerburg, Schweiz); Axionplan II (Zeiss, Göttingen) mit AxioCam MRo5 (Zeiss, Göttingen)
- Zentrifugen: 5415R (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf); 54151D (Eppendorf); Biofuge pico (Heraeus Instruments, Hanau)
- Spektralphotometer: Biomate 3 (Thermo Spectronic, New York, USA)
- PCR-„Thermocycler“ MJ Research, PTC 2000 Peltiert, ThermoCycler (Bio Rad, München); My Cycler TM, Mastercycler graduert (Eppendorf)
- Vortexer (Yellowline, Staufen) und Mikrowelle (lifestec®)
- Inkubatoren: Nuaire US Autoflow CO2 Water jacketed Inkubator (Nuaire, Plymouth, USA)
- Sterile Werkbank: Nuair Biological Safety Cabinets, Class II (Nuaire, Plymouth, USA)
- Thermomixer comfort (Eppendorf)
- Spannungsgeber für Elektrophorese: Power-Pac-300 (Biorad, München)
- Gelkammern für die Elektrophorese (Biorad, München)
- UV-Transilluminator: Fluo.Link Bioblock (Scientific, Aachen) und Foto-/ Druckeinrichtung „Fire Com Control“ zum Darstellen der Ethidiumbromid-gefärbte Agarosegele
- Hybridisierungsöfen (37 °C)
- Wasserbad (Bachofen, Reutlingen)
- Kühlschränke -20 °C (Bosch) und -4 °C (Bosch), Waagen (Sartorius, Göttingen)

### **2.2.2 Materialien, Medien und Lösungen**

#### **2.2.2.1 Materialien**

- 6 cm-Gewebekulturschalen (TPP, Schweiz)
- 12- Loch-Platten (Corning Instruments, Corning, USA)
- *Chamber Slides* (Objektträger mit Inkubationskammer; BPTalcom, USA)
- 15 und 50 Zentrifugenröhrchen (TPP, Schweiz)
- Präparationsinstrumente (sterile Pinzette, Sterile Schere)
- bakteriologische Schalen (Biochrom, Berlin)

- sterile Glasschale und steriles Sieb (Omnilab, Bremen)
- Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, Canada)
- Becherglas 500 ml (Duran, Schott)
- Gewebekulturschalen 75 cm<sup>2</sup> und 150 cm<sup>2</sup> (TPP, Schweiz)
- 2, 5, 10 und 20 ml Glaspipetten (Eppendorf)
- Pastuerpipetten (Sarstedt, Nümbrecht) 10 und 20 ml Einmalspritzen (BD Discarder II, Spanien) und 50 ml Original Perfuso-Spritzen (OPS 50 ml luer lock, Braun, Melsungen)
- Sterilfilter „Minisart“ (Sartorius)
- Neubauer-Zählkammer
- 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl und 1000 µl Pipetten (Eppendorf, Köln); sterile Pipettenspitzen mit und ohne Filter (Sarstedt, Nümbrecht)
- Nucleo Spin®RNA II (Machery Nagel GmbH, Düren)
- Handschuhe Reha Soft (Hartmann, Heidenheim)

### 2.2.2.2 Medien und Lösungen

#### 2.2.2.2.1 PBS ( *phosphate buffered saline*, Ca<sup>2+</sup> und MG<sup>2+</sup> frei)

|                                                                          | g/l Aqua tridest. |
|--------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| NaCl (Merck, Darmstadt)                                                  | 10                |
| KCl (Merck)                                                              | 0,25              |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O (Fluka, Deisenhofen) | 1,44              |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Merck)                                  | 0,25              |

#### 2.2.2.2.2 Medien und Additiva

Als Medium wurde DMEM (*Dulbeccos modified Eagles`-Medium* mit 4500 mg/l D-Glucose, GIBCO®Invitrogen) verwendet, welches als etabliertes Medium für mesenchymale Stammzellen gilt (Otto und Rao, 2004). Diesem wurde je nach Verwendung unterschiedliche Additiva zugefügt.

#### Medium 1: Grundmedium für die Kultivierung der Stamm-/ Progenitorzellen

Zu 430 ml DMEM wurden gegeben

- 50 ml FKS (PAA, Pasching)
- 5 ml Penicillin-Streptomycin (PAA, Pasching)

- 5 ml L-Glutamat (PAA, Pasching)
- 5 ml Sodium Pyruvat (PAA; Pasching)
- 5 ml MEM NEAA (GIBCO®Invitrogen)
- 30 mg Ascorbic Acid (Vit.C; Sigma; frisch abgewogen, in 10 ml Medium gelöst und steril in das Grundmedium filtriert)

#### Medium 2: Einfriermedium:

9,2 ml Grundmedium und 800 µl Dimethylsulfoxid (DMSO; 8 %) wurden steril filtriert und bei 4 °C gelagert.

#### Medien 3: Medien zur adipogenen Differenzierung

##### Medium 3A Adipogenes Induktionsmedium

Das Grundmedium wurde mit

- 2 µM Insulin (Stock: 10 mM) (Sigma)
  - 500 µM IBMX (Stock: 500 mM in DMSO) (Sigma)
  - 1 µM Dexamethason (Stock: 8,46 mM, Fortecortin Inject 8 mg, Merck, Darmstadt)
  - 200 µM Indomethacin (Stock: 200 mM in DMSO) (Sigma)
- ergänzt und steril filtriert.

##### Medium 3B Adipogenes Erhaltungsmedium

Zum Grundmedium wurde 2 µM Insulin (Stock: 10 mM) (Sigma) hinzugefügt und ebenfalls steril filtriert.

##### Medium 4: Osteogenes Differenzierungsmedium

Zum Grundmedium wurden

- 0,1 µM Dexamethason (Stock: 8,46 mM)
  - 10 mM beta-Glycerophosphat (Sigma, Steinheim)
  - 300 µM Ascorbic Acid (Vit. C; bereits im Grundmedium enthalten)
- gegeben und steril filtriert.

Beta-Glycerophosphat wurde frisch abgewogen und in 20 ml Medium gelöst und das Medium wurde steril filtriert.

#### Medium 5: Chondrogenes Differenzierungsmedium

Das Grundmedium wurde mit

- 0,1  $\mu$ M Dexamethason (Stock: 8,46 mM)
- 1 mM L-Prolin (Sigma)
- 1% ITS (fertiger B&D-Stock)
- 10 ng/ml TGF  $\beta$ 3 (Stock: 10 ng/ $\mu$ l; R&D System, Norderstadt)
- 300  $\mu$ M Ascorbic Acid (Vit. C) (bereits im Grundmedium enthalten)
- 1% Sodium Pyruvat (bereits im Grundmedium enthalten)

ergänzt und steril filtriert.

#### 2.2.2.2.3 Trypsin / EDTA- Lösung

10 x Trypsin / EDTA (PAA) wurden mit PBS gemischt, sterilfiltriert und in Aliquots a 11 ml eingefroren. Die Endkonzentration von Trypsin betrug 0,05 %. Die EDTA-Endkonzentration betrug 0,02 %.

### **2.2.3 Allgemeine Techniken der Zellkultur**

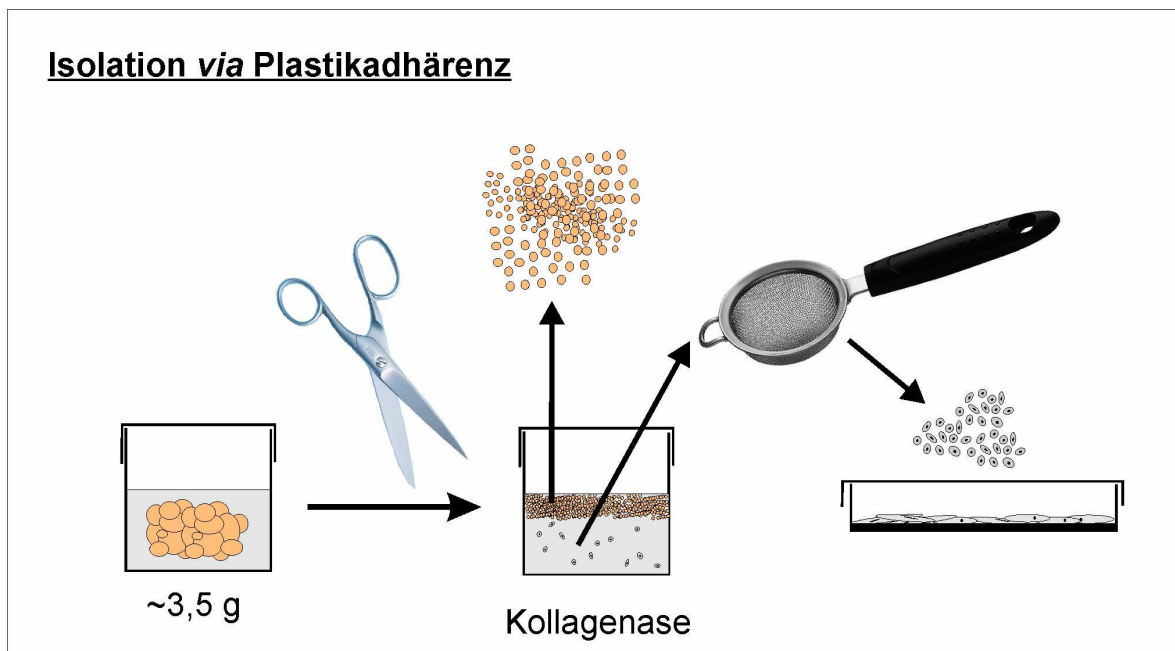
Die Zellkulturarbeit wurde generell unter sterilen Bedingungen an der Werkbank durchgeführt. Die Zellen wurden in einen Zellkulturinkubator mit einer Temperatur von 37 °C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % kultiviert.

#### **2.2.3.1 Isolation der Stamm- / Progenitorzellen**

Die adulten Stamm-/ Progenitorzellen wurden *via* Plastikadhärenz sowohl aus abdominalen und glutealen Fettgewebsproben von jeweils 10 Probandinnen im Alter von 25 bis 35 Jahren isoliert

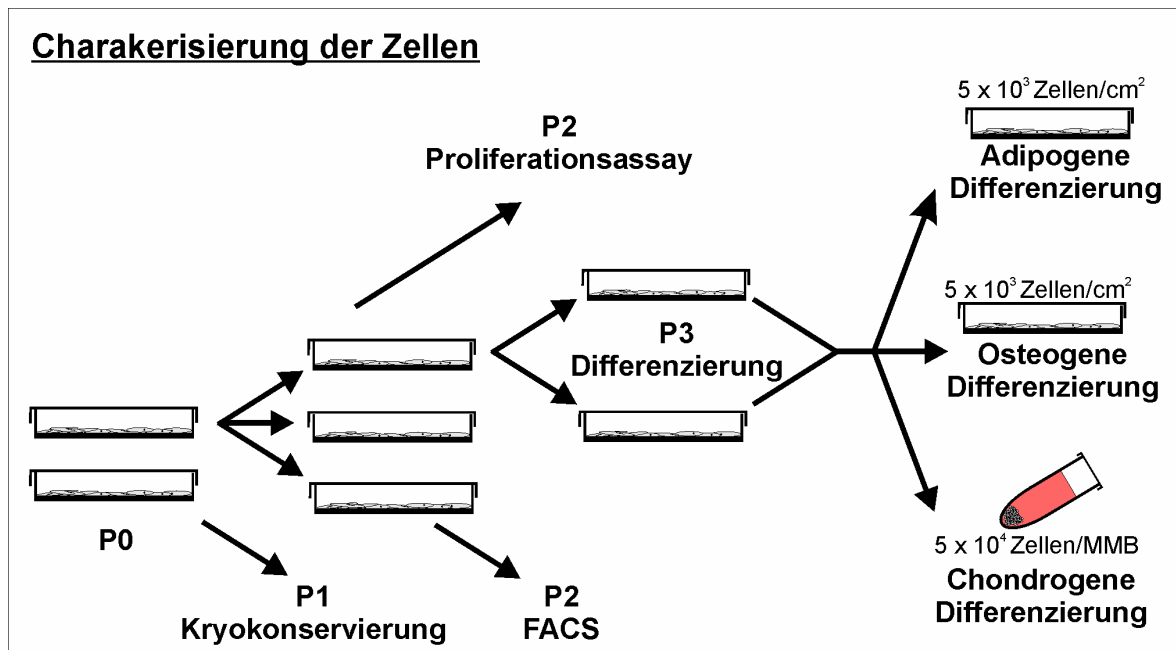
Um das aus dem Operationssaal in 50 ml PBS in einem 100 ml Röhrchen überführten Gewebe unter sterilen Bedingungen zu waschen, wurde eine bakterielle Petrischale mit ca. 30 ml PBS befüllt. Hierein wurde das abdominale bzw. gluteale Fettgewebe unter Verwendung einer sterilen Pinzette geschwenkt. Anschließend wurde das Fettgewebe in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und gewogen. Jeweils 5 ml Grundmedium pro g Fettgewebe wurden mit 1 mg Kollagenase A pro 1 ml Grundmedium versetzt, steril filtriert und in ein steriles Becherglas gegeben. Im Becherglas wurde das Fettgewebe unter Anwendung einer sterilen Pinzette und einer sterilen Schere so klein wie möglich geschnitten.

Danach wurde das klein geschnittene Fett im geschlossenen Gefäß in einen 37 °C warmen Hybridisierungssofen gestellt, geschüttelt und ca. 30 bis 45 min in der Kollagenaselösung inkubiert, bis eine homogene Einzelzellsuspension entstanden war. Diese Einzelzellsuspension wurde über ein steriles Sieb in ein weiteres steriles Becherglas pipettiert und mit Grundmedium wurde das Sieb mehrmals nachgespült (Abbildung 5).



**Abbildung 5:** Dargestellt ist die Isolation der Zellen.

Die Zellen wurden 5 min bei 1000 rpm abzentrifugiert und der Überstand weitgehend abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen in 10 bis 20 ml Grundmedium resuspendiert und auf Zellkulturflaschen ausplattiert. Das Grundmedium wurde am 1. oder 2. Tag gewechselt, sobald Plastik adhärenz Kolonien lichtmikroskopisch zu erkennen waren. Darauf folgend wurde zweimal pro Woche das Grundmedium gewechselt. Hierzu wurde das alte Medium abgesaugt und verworfen und frisches Grundmedium vorsichtig auf die Zellen gegeben. Zur Charakterisierung der adulten Stamm-/ Progenitorzellen wurde die Proliferation (siehe 2.2.4), die Expression von Oberflächenmarkermolekülen mittels FACS (siehe 2.2.5) und die Differenzierungskapazität (siehe 2.2.6) untersucht (Abbildung 6). Bei der weiteren Kultivierung wurden zwei Proben mit Pilzsporen kontaminiert, daher sind die nachfolgenden Versuche mit Fettgewebeproben von nur acht Probandinnen durchgeführt.



**Abbildung 6:** Schematische Darstellung der Charakterisierung der adulten Progenitorzellen

### 2.2.3.2 Passagieren und Kryokonservierung der Zellen

Bei einer Zellkonfluenz von 80 % erfolgte das Passagieren der Zellen. Zuerst wurde das überschüssige Medium abgesaugt und verworfen. Danach wurde zum Abfangen der freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen mit ca. 10 ml PBS gespült. Anschließend wurde ca. 3-4 ml Trypsin Lösung (siehe 2.2.2.2.3) auf die Zellen gegeben, so dass die Zellen gerade bedeckt waren und die Zellkulturflasche 5 min bei 37 °C in den Inkubator gestellt. Die Zellkulturflasche wurde danach leicht beklopft, um alle Zellen abzulösen. Unter dem Mikroskop wurde die vollständige Ablösung der Zellen kontrolliert. Der Schalenboden wurde wiederholt mit 10 ml Grundmedium gespült und anschließend wurde die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert und bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen wurden in 3 ml Grundmedium unter Verwendung einer 5 ml Pipette resuspendiert und im Verhältnis 1:2 (oder 1:3) passagiert. Sollten die Zellen eingefroren werden, wurde das Zellpellet in 2 ml Einfriermedium (siehe 2.2.2.2.2) resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Die Temperatur wurde zunächst in der Einfrierbox um 1 °C pro min gesenkt. Anschließend wurde die Einfrierbox bei - 80 °C eingefroren und dann das Kryokonservierungsröhrchen in flüssigen Stickstoff (- 196 °C) zur Langzeitlagerung überführt.

Für das Auftauen wurden zunächst 50 ml Grundmedium (siehe 2.2.2.2.2) steril filtriert und hiervon 10 ml in ein entsprechendes Zentrifugenröhrchen vorgelegt.

Die eingefrorenen Zellen wurden rasch in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut und die gesamte Zellmasse in das mit 10 ml Grundmedium gefüllte Zentrifugenröhrchen pipettiert und resuspendiert. Anschließend wurde das Röhrchen 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet mit ca. 5 ml Medium resuspendiert und in eine bereits mit ca. 15 ml Grundmedium befüllte Zellkulturflasche mit der Größe 150 cm<sup>2</sup> überführt.

### **2.2.3.3 Bestimmung der Zellzahl**

Die abzentrifugierten Zellen wurden in 2 ml Grundmedium resuspendiert und davon jeweils 7 µl in eine THOMA-Zählkammer pipettiert. Die Zellen, die sich auf den 16 Quadraten der Zählkammer befanden, wurden ausgezählt. Die genaue Zellzahl errechnete sich aus der Formel:

$$\text{Zellen}_{\text{gezählt}} / 64 \times 10^6 = \text{Zellzahl pro ml Medium.}$$

### **2.2.4 Proliferationsassay**

BrdU (5-Bromo-2'-Desoxyuridin) ist ein Pyrimidinanalogon, das sich anstelle von Thymidin in die DNA während der Zellteilung einbaut. Nach dem Fixieren und Denaturieren kann ein monoklonaler Antikörper gegen BrdU hinzugefügt werden. Zellen, die diesen monoklonalen Antikörper gebunden haben, können mit einem zweiten Fluoreszenzfarbstoff-konjugierenden-Antikörper detektiert werden. Mittels eines Fluoreszenzmikroskops können die proliferierenden Zellen von den nicht proliferierenden Zellen unterschieden werden.

#### **2.2.4.1 Lösungen**

- PBS (siehe: 2.2.2.2.1)
- steriles Kulturmedium
- Ethanol Fixierungslösung (pH 2): für 100 ml Fixierungslösung 50 mM Glycerin in 70 ml abs. Ethanol
- 5-Bromo-2'-desoxy-uridine Labeling and Detection Kit I (Roche): BrdU, Anti-BrdU und Anti-Maus-Ig-Floureszenz Stock, Inkubationspuffer
- BrdU Lösung: BrdU 1:1000 in sterilem Grundmedium
- Anti-BrdU-Arbeitslösung: Anti-BrdU-Lösung 1:20 in Inkubationspuffer



- Anti-Maus-Ig-Fluoreszenz Arbeitslösung: Anti-Maus-Ig-Floureszenz Stock 1:20 in PBS plus DAPI-Kernfärbung

#### 2.2.4.2 Durchführung

10.000 Zellen / cm<sup>2</sup> wurden auf *Chamber Slide* ausplattiert und 24 h kultiviert. Das alte Kulturmedium wurde abgesaugt und verworfen und jeweils 1 ml BrdU-Lösung pro well auf die Zellen gegeben.

Nach 60 min Inkubation wurde die BrdU-Lösung abgesaugt, die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und die Zellen 20 min bei - 20 °C in Ethanol-Fixierungslösung fixiert. Anschließend wurde erneut dreimal mit PBS gewaschen. Jeweils 0,35 ml Anti-BrdU Lösung pro well wurde auf die Zellen gegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach dreimaligen Waschen mit PBS wurde 0,35 ml der Anti-Maus-Ig-Fluoreszenz-Lösung auf die Zellen gegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde wieder dreimal mit PBS gewaschen und die Zellen mit Vectashield Medium (Vector Laboratories) eingedeckt. Die Auswertung erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop Axionplan II (Zeiss). Hierbei wurden pro Probe 10 Gesichtsfelder in der 20er Vergrößerung analysiert und alle Zellkerne, die BrdU-positiv waren in Verhältnis zur Gesamtheit aller Zellkerne, die DAPI-positiv waren, gesetzt.

#### 2.2.5 Durchflusszytometrie

Die FACS (*fluorescence activated cell sorting*) Analyse ist ein Verfahren zur Bestimmung der Expression von Oberflächenmarkermolekülen oder intrazellulären Proteinen. Die Grundlage bildet hierbei eine Antigen-Antikörper-Reaktion, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörper sichtbar gemacht wird.

Zur Analyse werden die zu untersuchenden Zellen durch eine Kapillare aspiriert, so dass die Zellen perlschnurartig aufgereiht werden. Trifft der Laser auf die aufgereihten Zellen, verursachen die Zellen Streulicht, welches mit Hilfe von Detektoren gemessen werden kann. Dabei korreliert die Größe des gestreuten Lichts mit der Größe der Zellen und der Anzahl der Strukturen im Inneren der Zelle. Binden die Zellen einen Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörper, wird dieser durch die Laserstrahlen zur Fluoreszenz angeregt. Diese kann von Photodetektoren gemessen werden. Dadurch können unter der Verwendung spezifischer Antikörper Informationen über die Expression von Oberflächen-

markerproteinen jeder Zelle gewonnen werden. Zur Charakterisierung der Oberflächenmarkermoleküle der MSC wurden die Zellen mit verschiedenen spezifischen Antikörpern untersucht. Die FACS-Analysen wurden mit Unterstützung von Herrn Dr. U. Lindner (Interdisziplinäre AG Stammzellbiologie, Medizinische Klinik I und Institut für Virologie und Zellbiologie, Universität zu Lübeck) durchgeführt.

#### 2.2.5.1 Lösungen

FACS (*fluorescence activated cell sorting*) Puffer: 2 % Bovine Serum Albumine (BSA; Biomol) und 0,1 % Natriumacit (Merck) in PBS (siehe 2.2.2.2.1) lösen.

#### 2.2.5.2 Durchführung

Die Zellen wurden vom Boden der Zellkulturflasche abtrypsiniert. Die Reaktion wurde mit 20 % FKS in PBS gestoppt. Nach dem Abzentrifugieren wurde das Zellpellet in einer adäquaten Menge 20 % FKS in PBS aufgenommen (max. Zellmenge 100.000 pro ml), so dass jeweils 100 µl dieser Zellsuspension mit je 10 µl des zu untersuchenden Antikörpers für 30 min bei 4 °C inkubiert werden konnten. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde je 1 ml FACS-Puffer zu den Reaktionen pipettiert und die Zellen abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 500 µl FACS-Puffer aufgenommen. Es wurden folgende Oberflächenmarkermoleküle untersucht: CD34, CD45, CD13, CD29, CD49d, CD44, CD54, CD73, CD90, CD105, CD106, CD133, CD140b, CD166 und CD271. Die Analyse erfolgte mittels eines Cytomics FC500 Durchflusszytometers und Cytomics CXP Software (Beckman Coulter, Krefeld). Außer CD133 und CD271 (Mitenyi Biotec) wurden die Antikörper von BD Pharmingen<sup>TM</sup> verwendet.

#### 2.2.6 Differenzierungsversuche

Um sicher zu gehen, dass es sich bei den isolierten Zellen tatsächlich um Stamm-/Progenitorzellen handelt, wurden die Zellen in adipogene, chondrogene und osteogene Zellen differenziert. Hierbei wurden die im Folgenden aufgeführten standardisierten Protokolle verwendet. Die Differenzierung wurde anhand spezieller histochemischer Färbungen und mittels RT-PCR-Analysen der Expression gewebespezifischer Gene überprüft. Als Negativkontrollen wurden

etablierte juvenile Fibroblasten, primär aus der Vorhaut von Knaben gewonnen und adulte Fibroblasten, primär isoliert aus humanen Hautproben, verwendet.

#### **2.2.6.1 Adipogene Differenzierung (Viermalige Induktion)**

**Tag -1:** Zur Beurteilung der adipogenen Differenzierung wurden die Zellen am Tag -1 in einer Zelldichte von 10.000 / cm<sup>2</sup> auf 6 cm-Gewebekulturschalen für die RNA-Analyse und auf *Chamber Slides* für die histochemische Färbung ausplattiert. Nach einer 24-stündigen Kultivierung im Grundmedium wurde die adipogene Differenzierung der Zellen durch Applikation eines spezifischen Mediums induziert.

**Tag 0:** Tag 0 stellt den Beginn der Differenzierung dar. Für die Induktion wurde zuerst das Grundmedium abgesaugt und verworfen. Jeweils 3 ml des adipogenen Induktionsmedium (IM; siehe 2.2.2.2.2) wurde pro 6 cm-Gewebekulturschale und 1,5 ml IM pro *Well* auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden drei Tage in dem Induktionsmedium kultiviert.

**Tag 3, 9 und 16:** Das IM wurde abgesaugt und verworfen. Die Zellen wurden mit Erhaltungsmedium (EM; siehe 2.2.2.2.2) versorgt. Das EM verblieb für jeweils vier Tage auf den Zellen.

**Tag 6, 13 und 20:** Das EM wurde entfernt und für eine erneute Induktion wurde adipogenes IM für jeweils drei Tage auf die Zellen gegeben.

**Tag 28:** Endpunkt der Differenzierung. An den Tagen 0, 7, 14 und 28 d wurden Proben für die Testung der Differenzierung durch histochemische Färbungen und an den Tagen 0 und 28 d für RT-PCR-Analysen genommen.

#### **2.2.6.2 Adipogenen Differenzierung (einmalige Induktion)**

Klassischerweise wird die adipogene Differenzierung nach einer einmaligen initialen Behandlung mit Induktionsmedium untersucht. Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit wurde analysiert, ob mit einer wiederholten viermaligen Induktionsbehandlung eine effektivere Differenzierung erzielt werden kann. Hierzu wurde die adipogene Differenzierung nach einmaliger (n = 3) im Vergleich zur viermaligen Induktion, die wie oben beschrieben durchgeführt wurde, untersucht. Die Zellen wurden nur einmalig am Tag 0 mit dem adipogenen IM für drei Tage induziert. Am dritten Tag wurde das IM entfernt und EM appliziert. Im weiteren Verlauf der Kultivierung fand alle 3-4 Tage ein Mediumswechsel mit EM statt. An den Tagen 0, 7, 14 und 28 d wurden Proben zur Untersuchung der

Differenzierung durch histochemische Färbungen und an den Tagen 0 und 28 d für RT-PCR-Analysen genommen.

### **2.2.6.3 Osteogene Differenzierung**

**Tag -1:** Die Zellen wurden ebenfalls in 6 cm-Gewebekulturschalen für die RNA-Analyse und in *Chamber Slides* für die Färbungen in einer initialen Zelldichte von 10.000 / cm<sup>2</sup> für 24 h im Grundmedium kultiviert.

**Tag 0:** Tag 0 bezeichnet den Beginn der Differenzierung. Die Zellen wurden mit dem osteogenen Induktionsmedium (IM; siehe 2.2.2.2.2) induziert. Alle 3 bis 4 Tage wurde das alte Medium abgesaugt und frisches IM appliziert.

**Tag 28:** Endpunkt der Differenzierung. An den Tagen 0, 7, 14 und 28 d wurden Proben zur Testung der Differenzierung durch histochemische Färbungen und an den Tagen 0 und 28 d für RT-PCR-Analysen genommen.

### **2.2.6.4 Chondrogene Differenzierung via *Micro Mass Bodies***

Zur Herstellung eines *Micro Mass Bodies* (MMB) wurden 200.000 Zellen in 0,5 ml chondrogenem Induktionsmedium (IM; siehe 2.2.2.2.2) aufgenommen und in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Darauf erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei 500 rpm. Am Boden des Röhrchen aggregierten die Zellen zu einem Pellet. Der Deckel des Röhrchens wurde gelöst, um eine O<sub>2</sub>-Zirkulation zu ermöglichen und das Falcon-Röhrchen wurde in einem entsprechenden Ständer bei 37 °C in den Zellinkubator gestellt.

### **2.2.6.5 MB-Kryopräparate chondrogen differenzierter Stamm-/ Progenitorzellen**

Die im MMB (siehe 2.2.6.4) kultivierten Stamm-/ Progenitorzellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und in Tissue-Tek<sup>®</sup> Cryomold<sup>®</sup> Gefrierschalen (Sakura, Japan) gegeben. Anschließend wurden die Proben mit Tissue-Tek<sup>®</sup> O.C.T<sup>™</sup> Compound (Sakura, Tokyo, Japan) eingedeckt und für mind. 24 h bei - 80 °C gelagert. Danach wurden die gefrorenen Proben mittels eines Kryotoms (Cryostat, Reichert & Jung Friocut 2800) in einer Dicke von 10 µm und 20 µm geschnitten und auf einen Objekträger gelegt. Die Kryoschnitte wurden bei - 80 °C gelagert, bis sie für weitere Analysen aufgetaut, dreimal mit PBS und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet wurden.

## **2.2.7 Histochemische Färbungen**

### **2.2.7.1 Sudan III-Färbung zum Nachweis adipogener Differenzierung**

Zur Charakterisierung und zur Verlaufsbeobachtung der adipogenen Differenzierung wurden die Zellen jeweils an den Tagen 0, 7, 14 und 28 d mit Sudan III gefärbt. Die Sudan III-Färbung ist speziell für die Darstellung von Fettgewebe geeignet. Der Sudan III-Farbstoff ist wie das Fettgewebe hydrophob und mischt sich dadurch gut mit den Fettzellen. Fettvakuolen stellen sich rot dar.

#### **2.2.7.1.1 Lösungen**

- Sudan III-Färbelösung: 0,03 g Sudan III (Sigma) gelöst in 10 ml 70 % Ethanol (Roth), 15 min bei 60 °C im Wasserbad inkubiert und steril filtriert.

#### **2.2.7.1.2 Durchführung**

Von den *Chamber Slides* wurde zunächst das Medium abgesaugt und die *Wells* ein- bis zweimal mit PBS gewaschen. 500 µl von der Sudan III-Färbelösung pro Well wurden hinzugefügt. Nach ca. 30 min wurde die Lösung abgesaugt und es wurde einmal mit PBS gespült. Anschließend wurde mit der DAPI-Kernfärbung (siehe 2.2.7.7) gefärbt. Zuletzt wurden die Zellen gegen das Austrocknen mit Vectashield-Medium eingedeckt und zum Schutz wurde ein Deckglas auf die Probe aufgebracht.

### **2.2.7.2 Oil-Red-O-Färbung zum Nachweis adipogener Differenzierung**

Die Oil-Red-O-Färbung ist ebenfalls eine Färbemethode, die zum Nachweis lipidhaltiger Zellen dient.

#### **2.2.7.2.1 Lösungen**

- Oil-Red-O Stammlösung: 0,5 g Oil Red O (Sigma) in 100 ml Isopropanol (Roth)
- Fixierungslösung: 10 % Formaldehyd (Merck oder Sigma) in PBS
- Oil-Red-O Arbeitslösung (frisch anzusetzen): 6 ml Stammlösung und 4 ml *Aqua dest.* mischen und filtrieren

#### **2.2.7.2.2 Durchführung**

Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen. 500 µl 10 %-iges Formalin pro Well wurden anschließend auf die Zellen gegeben und die Probe wurde für 15 min bei Raumtemperatur fixiert. Daraufhin wurde zweimal mit *Aqua dest.* gewaschen. Jedes Well wurde mit 500 µl der Oil-Red-O-Arbeitslösung beschichtet und die

Zellen wurden für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde dreimal mit *Aqua dest.* gespült und anschließend mit der DAPI-Kernfärbung (siehe 2.2.7.7) gefärbt. Die Zellen wurden zuletzt mit Vectashield-Medium eingedeckt und zum Schutz wurde ein Deckglas auf die Probe aufgebracht

### **2.2.7.3 Alkalische Phosphatase (AP)-Färbung zum Nachweis osteogener Differenzierung**

Zum Nachweis und zur Darstellung einer osteogenen Differenzierung wurden die Zellen ebenfalls an den Tagen 0, 7, 14 und 28 d mit der AP-Färbung dargestellt. Humane AP besteht aus einer Gruppe von Enzymen (mindestens 5), die Phosphatase bei einem alkalischen pH-Wert (6-8) hydrolisiert. AP kann in praktisch allen Körpergeweben gefunden werden, tritt *in vivo* jedoch in hohen Konzentrationen in den Osteoblasten von Knochen, in der Leber, in der Plazenta, in den Nieren, in der Darmwand und in den laktierenden Brustdrüsen auf. *In vitro* dient die AP-Färbung meist dem Nachweis von Osteoblasten.

#### 2.2.7.3.1 Lösungen

Die Lösungen sind, soweit nicht anders angegeben, Bestandteil eines AP-Färbekits (Sigma).

- Fixierungslösung: 2,5 ml Citratlösung, 6,5 ml Aceton (Merck) 0,8 ml 37 %-iges Formaldehyd (Roth)
- Naphtol-Färbelösung: 125 µl Sodium Nitrit Solution und 125 µl FRV Alkalische Phosphatase Lösung wurden gemischt und 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. 5,63 ml *Aqua dest.* und 125 µl Naphtol AS-BI Alkalische Phosphatase Lösung wurden hinzugefügt.
- Hämatoxylin-Lösung

Die Lösungen wurden vor jedem Gebrauch frisch angesetzt.

#### 2.2.7.3.2 Durchführung

Zuerst wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 30 sec mit der Fixierungslösung fixiert. Daraufhin wurden die Zellen 45 sec mit *Aqua dest.* gewaschen und 500 µl pro Well Naphtol-Färbelösung hinzugegeben. Nach einer Inkubation im Dunkeln und bei Raumtemperatur (20 bis 21 °C) für 15 min wurden die Proben 2 min mit *Aqua dest.* gewaschen und 10 sec mit Hämatoxylin (Sigma) gefärbt. Zum „Bläuen“ wurden die Zellen mit Leitungswasser gewaschen, bis die Reste der Hämatoxylin-

Lösung weggespült waren. Abschließend wurden die Zellen erneut mit *Aqua dest.* gespült, mit der DAPI-Kernfärbung gefärbt (siehe 2.2.7.7) und mit Vectashield-Medium eingedeckt und zum Schutz wurde ein Deckglas auf die Probe gebracht.

#### **2.2.7.4 Silbermethode nach „von Kossa“ zum Nachweis von Kalzium**

Die Silbermethode nach „von Kossa“ (1901) ist ebenfalls eine Färbemethode zum Nachweis der osteogenen Differenzierung von Zellen. Kalziumsalze werden versilbert, in dem die Kalziumverbindungen wie zum Beispiel in Karbonaten und Phosphaten gegen Silberionen ausgetauscht werden. Anschließend werden die Silberionen unter den Einfluss von Licht zu metallischen Silber reduziert. In der von Kossa - Färbung stellen sich Kalziumsalze schwarz-braun, Zellkerne rot und Zytoplasma hell rosa dar.

##### 2.2.7.4.1 Lösungen

- Färbelösung: 500 mg Silbernitrat (Fluka) wird in 10 ml *Aqua dest.* gelöst.
- Fixierung der Färbung: 1 g Natriumthiosulfat (Merck) wird in 20 ml *Aqua dest.* gelöst.

##### 2.2.7.4.2 Durchführung

Die Zellen wurden für 10 bis 20 min mit 5 %-iger Silbernitratlösung inkubiert. Unter den Einfluss von hellem Tageslicht erfolgte anschließend der Ionenaustausch. Die Zellen wurden mit destilliertem Wasser gespült und für 2 min mit der 5 %-igen Natriumthiosulfatlösung fixiert.

#### **2.2.7.5 Alizarinrot S-Färbung zum Nachweis von Kalzium**

Eine dritte Methode zum Nachweis eines Mineralisationsprozesses und damit einer osteogenen Differenzierung von Zellen ist die Alizarinrot S-Färbung. Alizarinrot S (Romeis, 1989) bildet mit zweiwertigen Kationen ( $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  und  $\text{Fe}^{++}$ ) Chelatverbindungen.

##### 2.2.7.5.1 Lösungen

- 100 mM Trishydroxymethyl-Amniomethan (Tris-Puffer; pH 9; Boehringer Mannheim)
- pH 9-Färbelösung: wässrige, 5 %-ige Alizarinrot (Sigma)-Farbstofflösung wurde durch Zusatz von Natronlauge auf pH 9 eingestellt.
- pH 7-Färbelösung: wässrige, 0,5 %-ige Alizarinrot-Lösung in Phosphatpuffer

#### 2.2.7.5.2 Durchführung

Die Zellen wurden für 30 sec mit Tris-Puffer gespült. Nach einer Behandlung mit der pH 9-Färbelösung für 1 h wurden die Zellen zweimal mit PBS gespült. Die Zellen wurden für 5 min in der pH 7-Färbelösung inkubiert, anschließend zweimal PBS gewaschen und mit Vectashield-Medium (Vector, Burlingame) eingedeckt. Zum Schutz wurde ein Deckglas auf die Probe aufgebracht.

#### **2.2.7.6 Alcianblau-Färbung zum Nachweis chondrogener Differenzierung**

Alcianblau (Sigma) ist ein wasserlöslicher Phthalocyaninfarbstoff, der zur selektiven Färbung von Mukosubstanzen, insbesondere für knorpelspezifische Proteoglykane von Steedman (1950) eingeführt wurde.

##### 2.2.7.6.1 Lösungen

- Alcianblau-Färbelösung (0,05 %, pH: 1,5): 4,5 g Natriumchlorid (Roth), 6,4 g Magnesiumchlorid (Merck) und 0,25 g Alcianblau 8GX (Sigma) wurden in 500 ml Essigsäure (Roth) gelöst und filtriert.

##### 2.2.7.6.2 Durchführung

Die MMBs wurden mittels Kryotum geschnitten (siehe 2.2.6.5). Die Proben wurden zweimal mit PBS gewaschen, 30 min mit 3,7 % Formalaldehyd (Merck) fixiert und anschließend nochmals dreimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden über Nacht bei Raumtemperatur mit Alcianblau-Färbelösung inkubiert. Am nächsten Tag wurde dreimal mit PBS gewaschen, mit DAPI-Kernfärbung (siehe 2.2.7.7) gefärbt und mit Vectashield-Medium eingedeckt und zum Schutz wurde ein Deckglas auf die Probe gebracht.

#### **2.2.7.7 DAPI-Färbung zur Darstellung der Zellkerne**

4',6 Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI), ein Fluoreszenzfarbstoff, kann zur DNA Färbung und damit zur Kernfärbung verwendet werden. Hier diente DAPI zur Gegenfärbung, um undifferenzierten Zellen darstellen zu können und damit gegen die differenzierten Zellen, die spezifisch histochemisch angefärbt wurden, auswerten zu können (siehe 2.2.8).

##### 2.2.7.5.1. Lösungen

DAPI (4',6-Diamidine-2'-phenylindol-dihydrochlorid; Roche) 1 mg / ml wurde verdünnt in *Aqua. dest.* (1 : 1000) eingesetzt.



#### 2.2.7.5.2. Durchführung

DAPI wurde 1 : 1000 in PBS verdünnt und 500 µl dieses Ansatzes wurde pro *Well* eines *Chamber Slides* auf die Zellen pipettiert. Nach einer Inkubation von 5 min wurde die Lösung abgesaugt und die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen. Abschließend wurde mit Vectashield-Medium eingedeckt und zum Schutz wurde ein Deckglas auf die Probe gebracht.

#### **2.2.8 Auszählung der Osteoblasten bzw. Adipozyten**

Um eine genaue Übersicht über den Differenzierungsgrad an den Probetagen (0, 7, 14 bzw. 28 d) zu bekommen, wurden am jeweiligen Tag alle Zellkerne, die mit DAPI angefärbt waren, und die differenzierten Zellen, die mit der AP-Färbung oder der Sudan III-Färbung gefärbt wurden, ausgezählt und zueinander ins Verhältnis gesetzt. Die Auszählung erfolgte unter dem Mikroskop Axioplan II (Zeiss). Jeweils 10 Gesichtsfelder pro Probe wurden unter der 10er Vergrößerung ausgewertet.

#### **2.2.9 Nachweis gewebespezifischer Genexpression mittels Reverser Transkription (RT) und Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)**

Bei der RT wird aus der Gesamt-RNA die spezifische *messenger*-RNA (mRNA) in cDNA umgeschrieben. Gezielte Sequenzen der cDNA können durch die Methode der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR; Mullis et al, 1986; Saiki et al 1986) um den Faktor  $10^6$  bis  $10^{12}$  vervielfacht werden (Thiele 1991). Die RT-PCR-Analyse wurde pro Probe (n = 8) zweimal unabhängig voneinander durchgeführt.

##### **2.2.9.1 RNA-Isolierung**

Die RNA wurde aus Proben der Versuchstage 0 und 28 d isoliert, um durch den Nachweis gewebespezifischer Genexpressionen die adipogene, osteogene und chondrogene Differenzierung zu untersuchen. Für die RNA Isolierung wurde der *Kit NucleoSpin® RNA II* der Firma Machery-Nagel (Düren) benutzt.

##### **2.2.9.1.1 Lösungen und besonderes Material**

- PBS (siehe 2.2.2.2.1)
- *NucleoSpin® RNA II Kit* (Machery-Nagel): RA 1 (Lysepuffer), *NucleoSpin® columns* (Ionenaustauschersäulen im Mikroformat = Mikrosäulen) und *NucleoSpin® collection tubes* (Sammelgefäße), RNase freies Wasser, MDB

(*Membrane Desalting Buffer*), RA 2-3 (Waschpuffer)

- 1 %-iges  $\beta$ -Mercaptoethanol ( $\beta$ -ME)
- 100 % Ethanol (Roth)
- 70 % Ethanol (angesetzt durch Verdünnung von 100 %-igem Ethanol mit *Aqua dest.*)

#### 2.2.9.1.2 Durchführung

Es wurden sterile RNase freie Pipettenspitzen mit Filter verwendet. Die Zellen wurde zuerst in dem RA 1 Puffer lysiert, wobei Nukleinsäuren freigesetzt und Proteine denaturiert wurden. Die Isolation der Gesamt-RNA erfolgte anschließend durch die Ionenaustauschchromatographie über Mikrosäulen.

#### RNA-Extraktion

Die auf den 6 cm Gewebekultuschalen vorhandenen Zellen wurden zuerst mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 350  $\mu$ l RA1-Puffer hinzugefügt und mit einem Zellschaber wurden die Zellen vom Boden gelöst. Das Gemisch wurde in ein mit 3,5  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol vorbereitetes Eppendorfgefäß pipettiert und anschließend bis zur weiteren Verarbeitung bei - 80 °C gelagert.

#### RNA-Aufreinigung

Die RNA-Aufreinigung erfolgte entsprechend den Empfehlungen des Herstellers (Machery-Nagel, Düren). Zuerst wurde das Zelllysats aufgetaut und 15 sec durchmischt, bevor es auf die Nucleo Spin®Filter Säulen gegeben und 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert wurde. Dieses diente zur Reduktion der Viskosität und zum Säubern des Lysats. Der NucleoSpin®Filter wurde verworfen und zu dem in einem Sammelgefäß (Collection Tube) aufgefangenen homogenisierten Lysat wurde 350  $\mu$ l 70 % Ethanol hinzugefügt und resuspendiert. Dieses wurde auf eine zweite Säule gegeben und mittels Zentrifugation für 1 min bei 11000 rpm durch die Säule in ein weiteres Sammelgefäß überführt. Der Inhalt des Sammelgefäßes wurde verworfen und auf die Säule wurde 350  $\mu$ l MDP (*Membrane Desalting Puffer*) gegeben. Darauf wurde erneut bei 11000 rpm für 1 min zentrifugiert, um die Membran zu trocknen. 95  $\mu$ l DNase Reaktionsmischung wurde auf die Säule pipettiert und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde die *Silica Membran* gewaschen:

1. Waschung 200  $\mu$ l RA 2 Puffer
2. Waschung 600  $\mu$ l RA 3 Puffer

### 3. Waschung 250 µl RA 3 Puffer

Nach der 1. und 2. Waschung wurde das Röhrchen 1 min bei 11000 rpm zentrifugiert und nach der 3. Waschung 3 min bei 11000 rpm zentrifugiert, damit die *Silica Membran* trocknete. Zuletzt wurde die pure RNA mit 60 µl RNase freiem Wasser eluiert und nochmals bei 11000 rpm für 1 min zentrifugiert. Im Anschluss an die Aufreinigung konnte nun die RNA Konzentration bei 260 nm photometrisch bestimmt werden.

## 2.2.9.2 Reverse Transcription (RT)

### 2.2.9.2.1 Lösungen, Pufferansätze, Primer, Enzyme

- PCR-H<sub>2</sub>O *ultra Pure distilled water*, RNase/DNasefrei (GIBCO®Invitrogen)
- Oligo dT Primer (Invitrogen)
- 10 mM dNTPs (2'-Desoxynucleosid-5'-Triphosphate, Gemisch von je 10 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP; Fermentas)
- *First Strand*- Puffer, 0,1 M Dithiotreitol (DTT) und *Superscript II RT* (Invitrogen)
- Mastermix pro Reaktion 4 µl First Strand Puffer, 2 µl 0,1 M DTT und 1 µl dNTP

### 2.2.9.2.2 Durchführung

Bei den folgenden Schritten wurde auf Eis gearbeitet. Für die RT-PCR-Reaktion wurde zunächst 1 µl Oligo dT-Primer in die jeweiligen 0,5 ml Röhrchen vorgelegt. 500 ng der RNA wurden in das 0,5 ml Röhrchen gegeben und das Gemisch wurde mit PCR Wasser auf 11 µl aufgefüllt. Anschließend wurde das Gemisch 10 min bei 70 °C im Thermocycler erwärmt und danach auf Eis abgekühlt. Pro Röhrchen wurden 7 µl Mastermix hinzugefügt. Nach einer Inkubation von 2 min bei 42 °C wurde zuletzt 1 µl *Superscript II RT* hinzugefügt und alle Proben wurden für weitere 50 min bei 42 °C inkubiert. Abschließend wurde noch einmal auf 95 °C für 5 min erhitzt, um die entstandenen cDNA-Stränge wieder zu lösen. Die entstandene cDNA wurde bei - 20 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

## 2.2.9.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

### 2.2.9.3.1 Lösungen, Pufferansätze, Primer und Enzyme

- PCR-H<sub>2</sub>O *ultra Pure distilled water*, RNase/DNasefrei (GIBCO®Invitrogen)
- 10 mM dNTP (Fermentas)
- 10 µM *Antisense*- und *Sense-Primer* (siehe Tabelle 4)

- Taq-Polymerase (Fermentas)
- 25 mM MgCl<sub>2</sub> (Fermentas)

**Tabelle 4:** Reaktionsbedingungen für die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) zum Nachweis der Genexpression. Aufgelistet ist der Name des Gens, dessen Expression untersucht wurde, sowie die verwendeten Primer und die Länge des amplifizierten Produkts in Basenpaaren (bp). Weiterhin sind die primerspezifische Zykluszahl und *Annealing*-Temperatur. Wurden die Primer nicht durch die AG Stammzellbiologie etabliert, ist ein Quellenverzeichnis angegeben.

| Gen                | Antisense-und Sense Primer (5' → 3')                                          | Länge (bp) | Zyklus Anzahl | Annealing-Temperatur (°C) | Literatur             |
|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------|------------|---------------|---------------------------|-----------------------|
| <b>Aggrecan</b>    | - TCA GGA ACT GAA CTC<br>AGT GG -<br>- GCC ACT GAG TTC CAC<br>AGA -           | 411        | 35            | 58                        | Lee et al. 2005       |
| <b>aP2</b>         | - GCT TTG CCA CCA GGA<br>AAG TG -<br>- ATG ACG CAT TCC ACC<br>ACC AG -        | 279        | 35            | 60                        | Rodriguez et al. 2004 |
| <b>C/EBPa</b>      | - AGA AAG GGG TGG AAA<br>CAT AGG -<br>-GAA AGC TGA GGG CAA<br>AGG -           | 685        | 35            | 58                        | Rodriguez et al. 2004 |
| <b>Collagen II</b> | - ACG GCG AGA AGG GAG<br>AAG TTG -<br>-GGG GGT CCA GGG TTG<br>CCA TTG -       | 352        | 35            | 63                        | Lee et al. 2005       |
| <b>GAPDH</b>       | - CCG CAT CTT CTT TTG CGT<br>CGC -<br>- GCA ACT GTG AGG AGG<br>GGA GAT TCA G- | 1100       | 30            | 55                        | —                     |
| <b>Msx 2</b>       | - GCT GAT GGG GAA AGG<br>GAG A -<br>- CCT CGG TCA AGT CGG<br>AAA -            | 377        | 35            | 58                        | —                     |
| <b>Osteocalcin</b> | - CTC ACA CTC CTC GCC<br>CTA TT -<br>- GCC ACT GAG TTC CAC<br>AGA -           | 143        | 35            | 58                        | —                     |
| <b>Osteopontin</b> | - ACT GAT TTT CCC ACG GAC<br>CT -<br>- CAT TCA ACT CCT CGC TTT<br>CC -        | 199        | 35            | 58                        | —                     |
| <b>Osterix</b>     | - GCA AAG CAG GCA CAA<br>AGA AG -<br>- AGG GAA TGA GTG GGA<br>AAA GG -        | 237        | 35            | 58                        | —                     |
| <b>PPARγ</b>       | - AAA CTC TGG GAG ATT<br>CTC CT -<br>-TCT TGT GAA TGG AAT GTC<br>TT -         | 247        | 35            | 56                        | Rodriguez et al. 2004 |
| <b>RunX2</b>       | - GAG GCG GTC AGA GAA<br>CAA AC -<br>- ATG GCG GGT AAC GAT<br>GAA -           | 270        | 38            | 58                        | —                     |

#### 2.2.9.3.2 Durchführung

Es wurde folgender PCR-Ansatz auf Eis pipettiert:

- 16,2 µl PCR- H<sub>2</sub>O
- 2,5 µl Puffer
- 1,8 µl MgCl<sub>2</sub>
- 1,0 µl dNTP
- Je 1,25 µl *Antisense*- und *Sense*-Primer (siehe Tabelle 4)
- 0,25 µl Taq-Polymerase

Der Mastermix wurde gemischt und kurz zentrifugiert. Darauf wurden 24,25 µl Mastermix in ein 0,5 ml Röhrchen gegeben. In jedes dieser Reaktionsgefäße wurde ebenfalls jeweils 1 µl der entsprechenden cDNA pipettiert. Die Proben wurden gemischt und kurz zentrifugiert, bevor diese bei 95 °C 2 min im Thermocycler erhitzt wurden. Die Anzahl der Zyklen, in denen die DNA exponentiell amplifiziert wurde, variierte je nach Primer zwischen 30-35 sec (siehe Tabelle 4).

#### **2.2.9.4 Agarosegelelektrophorese**

Bei der Agarosegelelektrophorese werden DNA-Fragmente nach Größe aufgetrennt. Nach Anlegen einer Spannung wandern negativ geladene DNA-Moleküle abhängig von ihrer Größe schneller (kleine Fragmente) oder langsamer (große Fragmente) in Richtung Kathode. Durch die interkalierende Wirkung des Zusatzes von Ethidiumbromid können die Bandmuster unter dem UV-Licht sichtbar gemacht werden. Mittels einer sog. DNA-Leiter kann die Größe der einzelnen Fragmente bestimmt werden.

##### 2.2.9.4.1 Chemikalien und Lösungen

- Agarose: *ultra Pore* (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg)
- 1 %-iges Ethidiumbromid (Serva) in *Aqua dest.*
- 10x TBE-Stammlösung (pH 8,3): 108 g Tris-Base (Merck), 55 g Borsäure (Merck) und 7,45 g EDTA xNa<sub>2</sub> (Roth) auf 1Liter mit H<sub>2</sub>O (steril) auffüllen
- 1 M Tris (pH: 7,5): 121,14 Tris-Base und 70 ml 37 %-ige HCL (evtl pH einstellen) auf 1 l mit H<sub>2</sub>O (steril) auffüllen
- 1 x TBE-Puffer: TBE-Stammlösung im Verhältnis 1:10 mit *Aqua dest.*

- 10x TE-Puffer (ph: 7,6 ): 10 ml 1 M Tris/ HCl (ph 7,5 Merck) und 0,1 ml 0,5 M EDTA (ph: 8,0; Roth) auf 1 l H<sub>2</sub>O (steril) auffüllen
- 5x Ladepuffer BJ (*blue juice*): 1,5 g Ficoll (Sigma), 250 µl 4 M LiCl (Merck), 100 µl 1 % Bromphenolblau (Merck) und 400 µl 0,5 M EDTA  
Der Puffer wurde filtriert.
- DNA-Längenstandard (1 kb-DNA-Leiter; Invitrogen) im Verhältnis 1:10 mit BJ verdünnt

#### 2.2.9.4.2 Durchführung

Für die Agarose-Gelelektrophorese wurde zunächst ein 2 %-iges Agarosegel angesetzt. Dafür wurde 2 g Agarose in 100 ml 1x TBE in der Mikrowelle zum Kochen gebracht, solange bis die gesamte Agarose gelöst war. Anschließend wurde 2,5 µl Ethidiumbomid zur Lösung pipettiert und in eine Kammer gegossen. Nach dem Auspolymerisieren des Gels wurde dieses in eine Gelelektrophoresenkammer gelegt, die mit TBE-Puffer gefüllt wurde. Zu jeder PCR-Probe wurde 5 µl BJ (*blue juice*) hinzugefügt, anschließend wurde das Gemisch kurz gemischt und per Hand heruntergeschlagen. Darauf wurden jeweils 12 µl in die Geltaschen pipettiert. Eine Geltasche wurde mit 15 µl DNA-Längenstandard (DNA-Leiter) befüllt. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 100 Volt in horizontalem Lauf für mindestens 30 min. Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden in einer Geldokumentationskammer unter UV-Licht fotografiert. Die aufgenommenen Banden wurden später mit Hilfe des Programms *ImageJ* ausgewertet. Dabei wurde die Expression des gewebespezifischen Gens im Verhältnis zu GAPDH als ubiquitär exprimierter Standard bestimmt.

#### 2.2.10 Statistische Auswertung

Die Daten aus mehreren unabhängigen Experimenten wurden mit Hilfe des Programms „Sigma Plot 8.0“ und „Sigma Plot 10.0“ analysiert. Die Anzahl der jeweils durchgeführten unabhängigen Experimente ist in den Bildunterschriften angegeben. Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz wurde der *student t-test* angewendet. Die Grafiken wurden mit Hilfe des Programms *Corel Draw* erstellt.

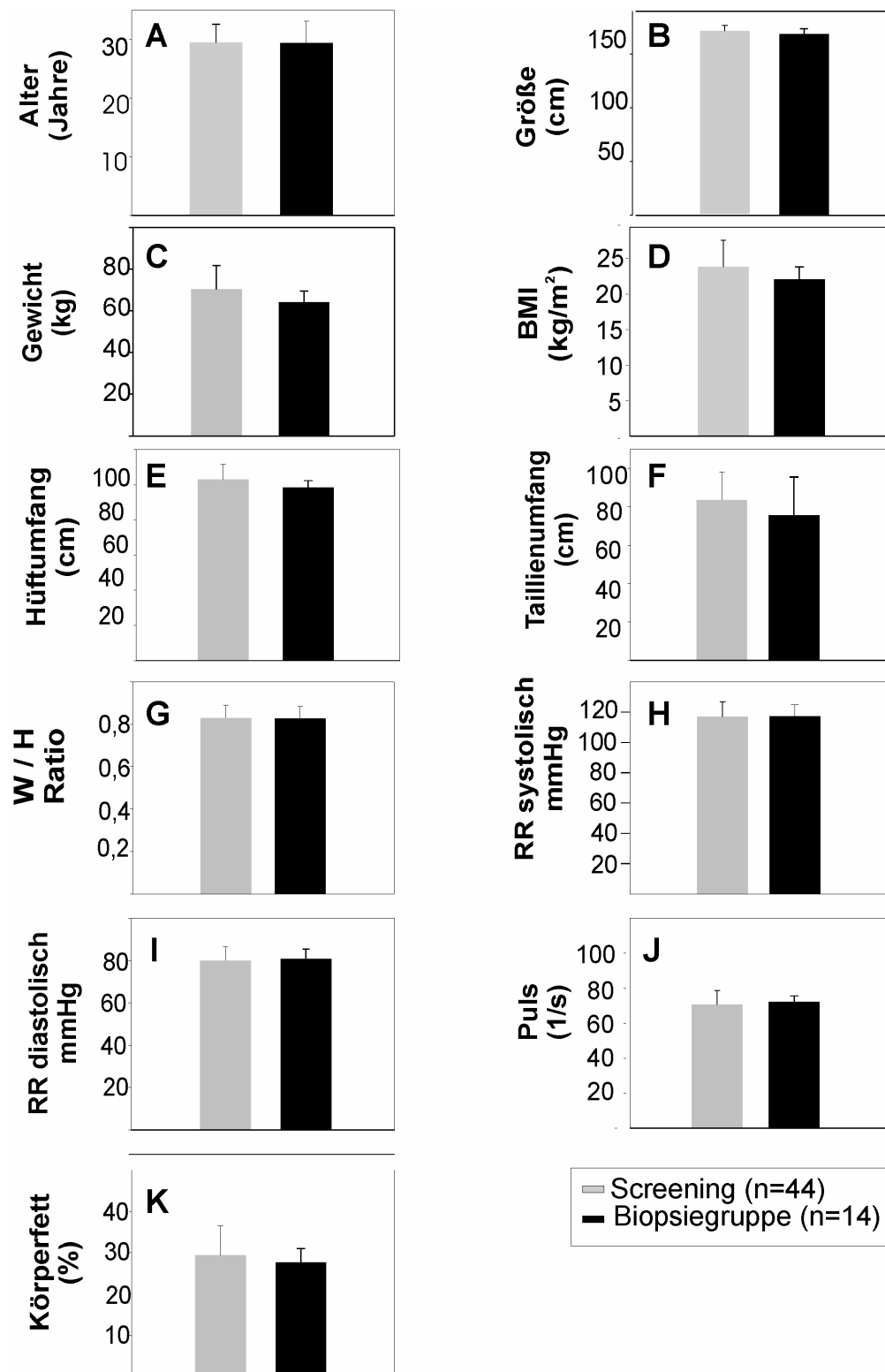
### **3 Ergebnisse**

#### **3.1. Klinischer Teil**

##### **3.1.1 Auswahl einer homogenen Biopsiegruppe**

Ingesamt wurden 44 mögliche Probandinnen zwischen 25 und 35 Jahren ausführlich befragt und untersucht (siehe auch 2.1.2). Aus diesem Kollektiv wurden insgesamt 14 Frauen ausgewählt, die in ihren Untersuchungsergebnissen sehr homogen waren. Das mittlere Alter der Biopsiegruppe lag bei 29 Jahren und 6 Monaten.

Insbesondere wurde bei der Auswahl der Probandinnen auf drei Untersuchungswerte geachtet: BMI, W/H Ratio und Körperfettanteil. Im Durchschnitt betrug der BMI  $22,49 \text{ kg/m}^2$  ( $\pm 1,84$ ), die W/H Ratio  $0,83$  ( $\pm 0,06$ ) und der Körperfettanteil  $27,34 \%$  ( $\pm 3,61$ ). Der Blutdruck war mit einem mittleren Wert von  $117 / 80$  ( $\pm 7 / 4$ ) bei allen Probandinnen im Normbereich (siehe Abbildung 7). Darüber hinaus wurde bei den Probandinnen direkt vor der Biopsie Blut zur Untersuchung der kardiovaskulären Risikofaktoren abgenommen und der Urin untersucht. Insgesamt wurden 47 Blutparameter bestimmt (siehe Tabelle 3, Seite 14). Die Ergebnisse der Blutuntersuchungen wurden aufgrund einer übergeordneten Studie zwischen Frauen mit und ohne Zellulite verglichen. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede mit klinischer Bedeutung zwischen den Gruppen festgestellt werden. Nur bei der Bestimmung des CRP-Wertes gab es eine signifikante Abweichung (siehe Ergebnisse der Blutuntersuchungen im Anhang, Seite 93). Der CRP-Wert war bei der Zellulite-Gruppe leicht erhöht, lag aber dennoch wie der Wert der Vergleichsgruppe (Nicht-Zellulite) im Normalbereich. Die Ergebnisse der klinischen und laborchemischen Untersuchungen zeigten insgesamt, dass eine sehr homogene Biopsiegruppe ausgewählt wurde.



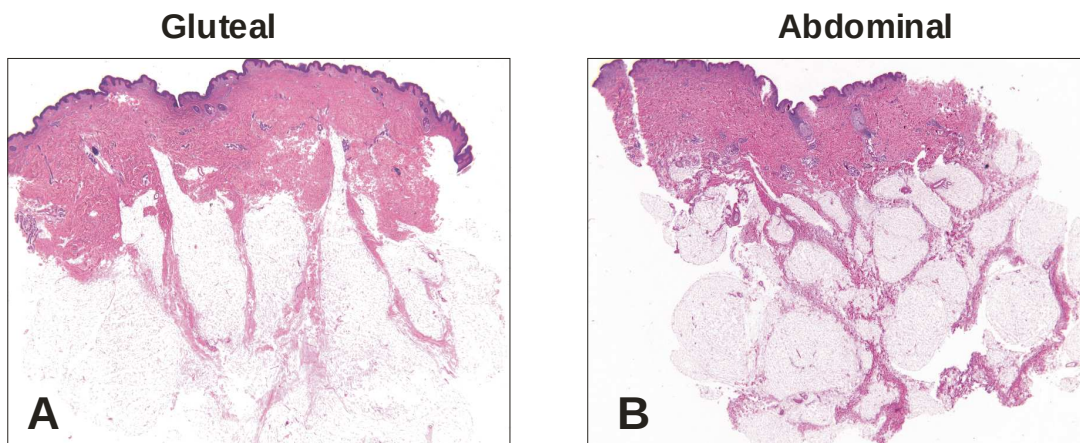
**Abbildung 7:** Untersuchungsergebnisse aller Probandinnen im Vergleich zur Biopsiegruppe. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung des Alters (A), der Größe (B), des Gewichts (C), des BMIs (D), des Hüftumfangs (E), des Taillenumfangs (F), der W/H Ratio (G), des systolischen Blutdrucks (H), des diastolischen Blutdrucks (I), des Pulses (J) und des Körperfettanteils (K). Insgesamt wurden 44 Probandinnen untersucht. Aus ihnen wurde eine Biopsiegruppe von 14 Frauen ausgewählt, die sich v.a. in ihrem BMI (D), in ihrer W/H Ratio (G) und in ihrem Körperfettanteil (K) sehr ähnelten.



### **3.2 Experimenteller Teil**

#### **3.2.1 Kein Nachweis morphologischer Unterschiede zwischen glutealen und abdominalen Fettgewebeproben**

Die Erstellung und Beurteilung der histologischen Präparate erfolgte durch einen Dermatohistopathologen. Es konnte keine morphologische Trennung der beiden Gewebsquellen erfolgen (Abbildung 8). Auch in Immunfärbungen gegen B-Zellen (CD20), T-Zellen (CD3) und Makrophagen (CD68) und in histochemischen Spezialfärbungen (Naphtol AS-D Choracetatesterase- (Mastzellen), Elastika- und Muzin-Färbung) wurden keine signifikanten Unterschiede sichtbar (mündliche Mitteilung durch Herrn Dr C. Rose, Klinik für Dermatologie, Universität Lübeck; Daten nicht gezeigt). Für die Untersuchungen der adulten Stamm-/ Progenitorzellen wurde nur das subkutane Fettgewebe betrachtet. Dafür wurde die Epidermis und Dermis von dem subkutanen Fettgewebe durch ein Skapel getrennt.

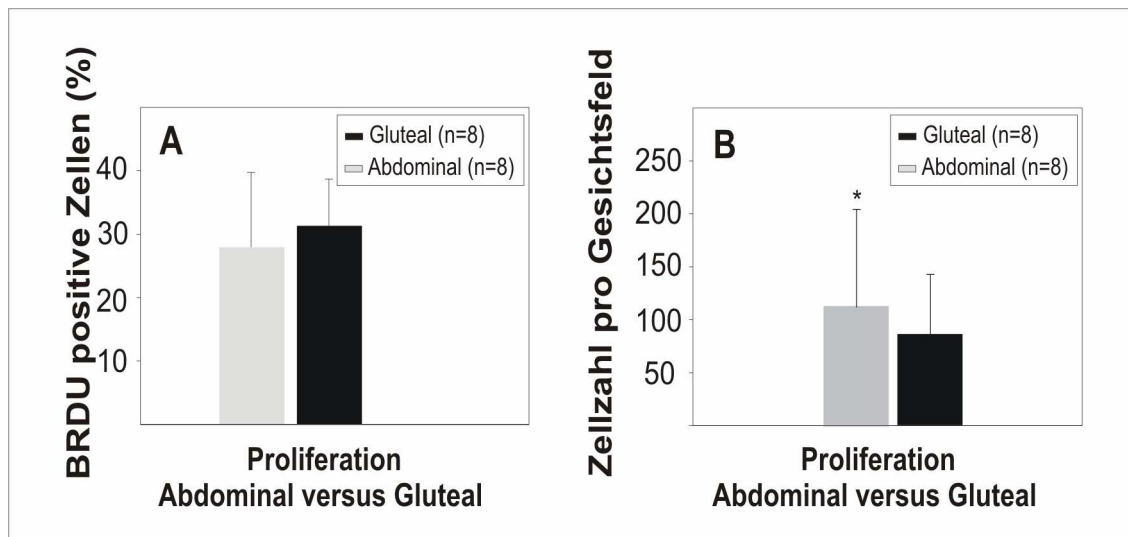


**Abbildung 8:** Übersichtsaufnahme einer glutealen (A) und abdominalen (B) Gewebeprobe in HE- (Hämatoxylin-Eosin-) Färbung.

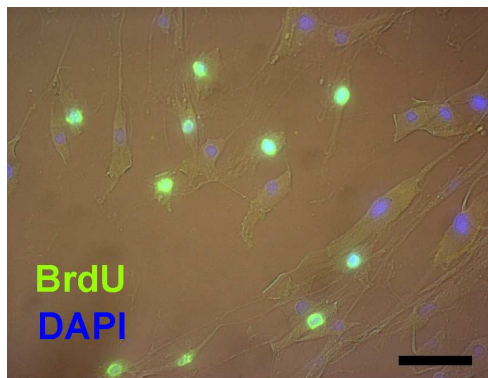
#### **3.2.2 Kein Unterschied in der Proliferation abdominalen und glutealen Zellisolate**

Die Proliferation der Plastik adhärenz Zellen wurde mit Hilfe eines BrdU-Assays von jeweils 8 glutealen und 8 abdominalen Zellisolaten aus Fettgewebeproben untersucht. Nach einer Kultivierung für 24 h gab es keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Inkorporation von BrdU zwischen den abdominalen

und glutealen Zellisolaten (Abbildung 9 A). Darüber hinaus wurde die Zellzahl pro Gesichtsfeld anhand der DAPI-positiven Zellen bestimmt.



**Abbildung 9:** Analyse der Zell-Proliferation mittels BrdU-Assays. Nur die Analyse BrdU-positiver Zellen im Verhältnis zu der Gesamtzahl der Zellen erbringt eine valide Aussage in Bezug auf die Proliferationsfähigkeit von Zellen. Wird allein die Zellzahl bestimmt, wichen die Zellzahlen pro Gesichtsfeld stark voneinander ab und können so den Eindruck einer in einer Probe (hier abdominal) größeren Zellmenge bedingen.



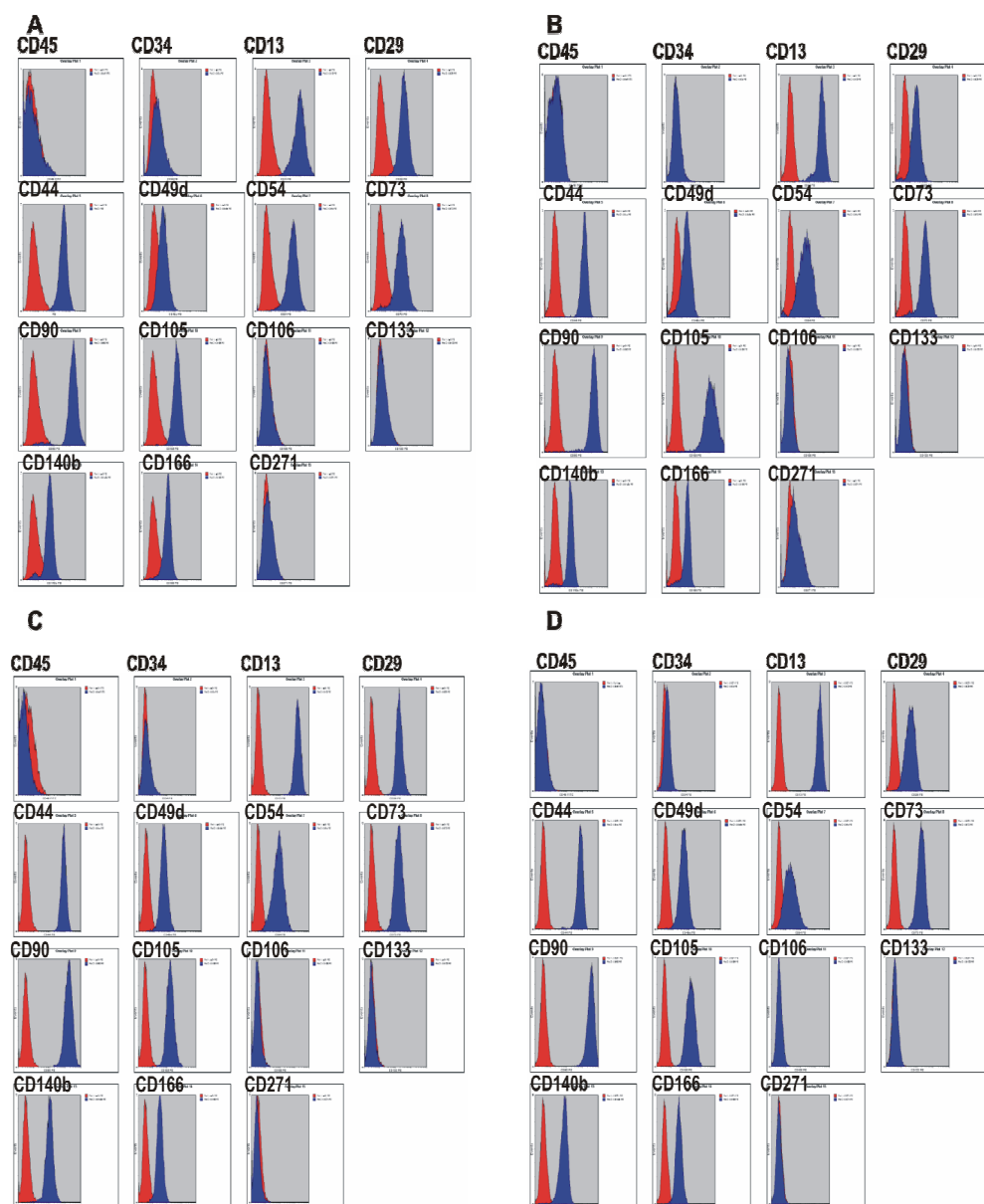
**Abbildung 10:** Exemplarisches Beispiel einer BrdU-/DAPI-Färbung von glutealen Stamm-/Progenitorzellen. Bar = 100µm.

Hierbei zeigte sich, dass nach 24 h die Zellzahl der abdominalen Isolate trotz initial gleicher Zellzahl statistisch signifikant größer war (Abbildung 9 B). Die Zellzahl zwischen den einzelnen Gesichtsfeldern schwankte. Es wurden für die Auswertung 10 Gesichtsfelder pro Probe mit dem 20er Objektiv am Mikroskop ausgewertet (Abbildung 10). Da die Zellzahl zwischen den einzelnen Gesichtsfeldern schwankte, kann die Zellzahl allein nicht zu einer Aussage bezüglich der Proliferation (im Sinne einer Zunahme der Zellzahl) herangezogen werden. Eine verlässliche Aussage lässt sich nur erzielen, wenn der Anteil der BrdU-positiven Zellen an allen Zellen dargestellt wird (Abbildung 9 A). Es bestand also kein Unterschied in der Proliferationsfähigkeit zwischen den glutealen und abdominalen

Zellen. Desweiteren konnte kein eindeutiger Unterschied im Proliferationsverhalten zwischen den Stamm-/ Progenitorzellen und den Kontroll-Fibroblasten detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

### 3.2.3 Kein Unterschied in der Expression von Oberflächenmarkermolekülen zwischen glutealen und abdominalen Zellisolaten

Der Immunphänotyp der abdominalen und glutealen adulten Plastik adhären Zellen wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht. Es wurde insgesamt die Expression von 15 Oberflächenmarkermolekülen analysiert. In Abbildung 11 ist ein repräsentatives Beispiel der FACS Analyse dargestellt.



**Abbildung 11:** Repräsentatives Beispiel der Immunphänotypisierung von glutealen (A), abdominalen (B), juvenilen Fibroblasten (C) und adulten Fibroblasten (D). Dargestellt sind die Isotypenkontrollen (rot) und die Analyse der Expressionsmuster von Oberflächenmarkermolekülen (blau).

Die abdominalen und glutealen Zellisolate zeigten sich bezüglich ihre Expression der Oberflächenzellmarker homogen. Darüber hinaus konnten die adulten Progenitorzellen beider Depots nicht von juvenilen oder adulten Fibroblasten unterschieden werden (siehe Abbildung 11 und Tabelle 5).

**Tabelle 5:** Übersicht über das mittels Durchflusszytometrie ermittelte Expressionsprofil von Oberflächenmarkermolekülen verschiedener Zellisolate. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung von unabhängigen Experimenten (gluteal n= 9; abdominal n= 8, juvenile Fibroblasten und adulte Fibroblasten jeweils n = 3). Angegeben ist der statistisch signifikante Unterschied in der Expression zu den adulten (a) und juvenilen (j) Fibroblasten \* =  $p \leq 0,05$ .

|         | Abdominal                                | Gluteal                                  | Fibroblasten adult (a) | Fibroblasten Juvenil (j) |
|---------|------------------------------------------|------------------------------------------|------------------------|--------------------------|
| CD 34   | 6,80 ( $\pm$ 6,70)                       | 10,90 ( $\pm$ 9,25)                      | 8,50 ( $\pm$ 5,02)     | 11,47 ( $\pm$ 9,73)      |
| CD 45   | 1,08 ( $\pm$ 0,72)                       | 2,09 ( $\pm$ 1,27)                       | 4,50 ( $\pm$ 6,95)     | 1,67 ( $\pm$ 2,63)       |
| CD 13   | 96,99 ( $\pm$ 4,71)                      | 91,43 ( $\pm$ 12,37)                     | 98,17 ( $\pm$ 1,42)    | 99,37 ( $\pm$ 0,55)      |
| CD 29   | 69,65 ( $\pm$ 22,53)                     | 80,38 ( $\pm$ 22,08)                     | 96,13 ( $\pm$ 0,42)    | 98,03 ( $\pm$ 2,11)      |
| CD 49d  | 49,15 ( $\pm$ 22,51)<br><sub>a*/j*</sub> | 48,22 ( $\pm$ 29,81)<br><sub>a*/j*</sub> | 91,23 ( $\pm$ 6,12)    | 90,23 ( $\pm$ 6,78)      |
| CD 44   | 96,90 ( $\pm$ 2,56)                      | 96,11 ( $\pm$ 4,20)                      | 97,66 ( $\pm$ 1,67)    | 98,90 ( $\pm$ 1,18)      |
| CD 54   | 59,28 ( $\pm$ 22,29)                     | 70,53 ( $\pm$ 25,73)                     | 70,77 ( $\pm$ 5,85)    | 93,50 ( $\pm$ 3,80)      |
| CD 73   | 90,08 ( $\pm$ 11,50)                     | 87,68 ( $\pm$ 4,09)                      | 88,70 ( $\pm$ 13,17)   | 97,17 ( $\pm$ 2,41)      |
| CD 90   | 96,62 ( $\pm$ 3,65)                      | 96,62 ( $\pm$ 3,64)                      | 98,60 ( $\pm$ 1,15)    | 99,47 ( $\pm$ 0,40)      |
| CD 105  | 95,86 ( $\pm$ 9,36)                      | 93,67 ( $\pm$ 9,36)                      | 98,23 ( $\pm$ 1,55)    | 96,57 ( $\pm$ 2,61)      |
| CD 106  | 0,87 ( $\pm$ 0,60)                       | 1,16 ( $\pm$ 0,88)                       | 7,13 ( $\pm$ 5,59)     | 0,33 ( $\pm$ 0,58)       |
| CD 133  | 0,98 ( $\pm$ 0,62)                       | 0,84 ( $\pm$ 0,32)                       | 5,20 ( $\pm$ 3,80)     | 0,20 ( $\pm$ 0,35)       |
| CD 140b | 72,06 ( $\pm$ 24,50)                     | 76,86 ( $\pm$ 25,72)                     | 93,87 ( $\pm$ 4,41)    | 96,33 ( $\pm$ 2,90)      |
| CD 166  | 57,03 ( $\pm$ 21,20)<br><sub>a*/j*</sub> | 49,83 ( $\pm$ 22,25)<br><sub>a*/j*</sub> | 92,80 ( $\pm$ 4,77)    | 89,87 ( $\pm$ 6,14)      |
| CD 271  | 5,31 ( $\pm$ 11,47)                      | 0,96 ( $\pm$ 0,39)                       | 5,83 ( $\pm$ 4,41)     | 0,20 ( $\pm$ 0,35)       |

Sowohl die glutealen als auch die abdominalen Zellen exprimierten die Markermoleküle CD73, CD90 und CD105. Negativ waren die Zellen für die hämatopoetischen Marker CD34 und CD45. Damit erfüllten die Zellen hinsichtlich ihres Expressionsmuster von Oberflächenmarkermolekülen die sog. Minimalkriterien für MSCs (Dominici et al., 2006). Ebenso waren die abdominalen und glutealen Zellen negativ für CD106, ein Marker, der prädominant von vaskulären Endothelzellen exprimiert wird, sowie für CD133 (Prominin1), welcher u.a. von hämatologischen Stammzellen, endotheliale Progenitorzellen und neurale Stammzellen exprimiert wird. CD271 wird auf Zellen des zentralen und peripheren Nervensystems beschrieben. Auch dieser Marker konnte nicht auf den abdominalen und glutealen Proben detektiert werden. CD49d wird vor allem auf Immunzellen gefunden. Im Gegensatz zu den Fibroblasten, die zu über 90 % CD49d besaßen, ließ sich dieser in den abdominalen und glutealen Proben nur zu ca. 50 % auf den glutealen und abdominalen Zellen ausmachen. CD166 spielt

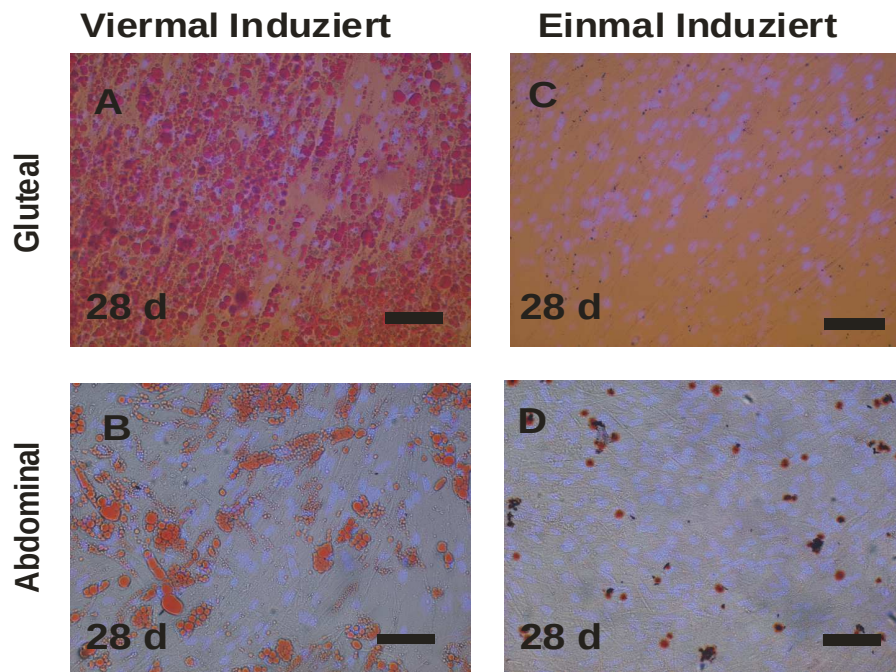
einer Rolle bei der Aktivierung von T-Lymphozyten. Auch hier exprimierten die Fibroblasten ca. 90% CD166, während dieses Oberflächenmarkermolekül auf den abdominalen und die glutealen Isolaten nur zwischen 49 % und 57 % detektiert wurde. CD29 (Integrin, beta 1) und CD54 (Interzellulär Adhäsion Molekül 1) wurden innerhalb beider Depots nur bis zu 80% exprimiert. CD 44 und CD13 wurde innerhalb beider Depots zu über 90 % und CD140b zu über 70 % gefunden (siehe Tabelle 5).

### **3.2.4 Charakterisierung der *in vitro* Differenzierung**

Um das Differenzierungspotential der isolierten adulten Stamm-/ Progenitorzellen zu charakterisieren, wurde die Fähigkeit der fibroblastoiden Zellen aus dem abdominalen und glutealen subkutanen Fettgewebe nach Applikation spezifischer Induktionsmedien zur Differenzierung in die adipogene, chondrogene und osteogene Richtung untersucht. Als Kontrolle wurden Fibroblasten verwendet.

#### **3.2.4.1 Optimierung des adipogenen Differenzierungsprotokolls**

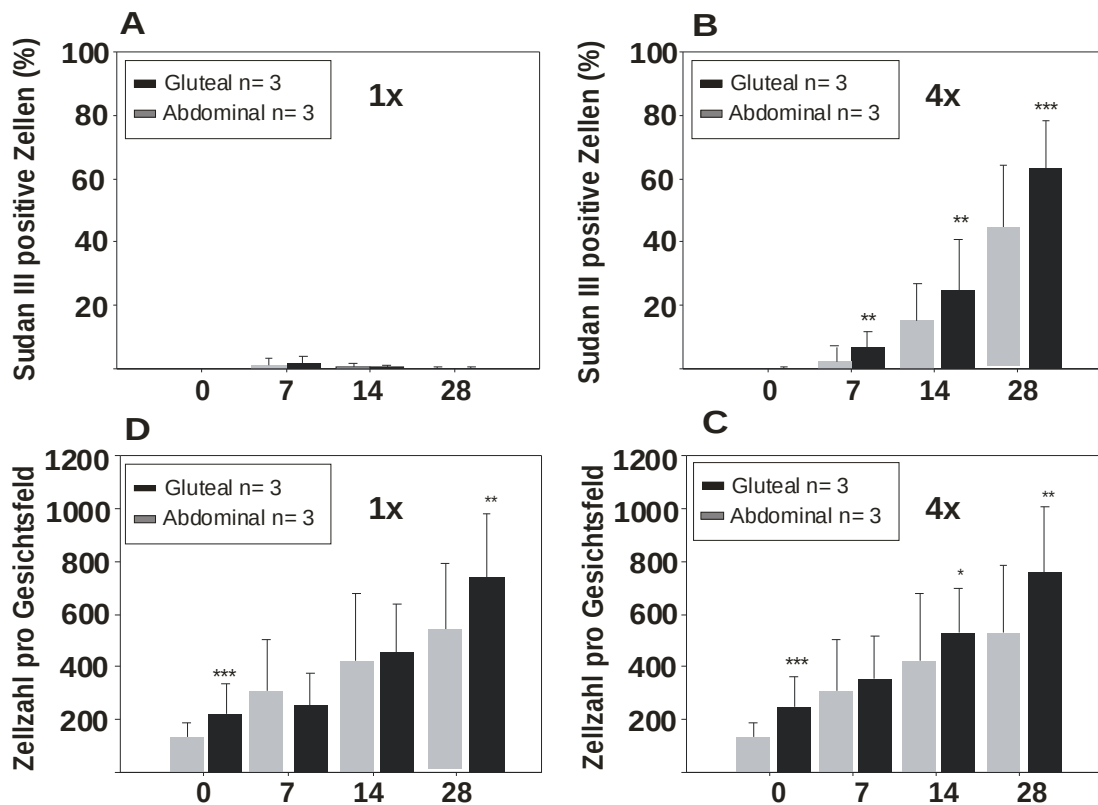
Aufgrund von Vorarbeiten zu dieser Promotionsarbeit wurde angenommen, dass die adipogene Differenzierung nach wiederholter Behandlung mit Induktionsmedium effizienter ist. Um diese Aussage zu verifizieren, wurde im Hinblick auf die adipogene Differenzierung das verwendete Protokoll mit viermaliger Induktion der Zellen an jeweils drei abdominalen und glutealen Proben mit dem klassischen Protokoll, das nur eine einmalige Induktion vorsieht, verglichen. Unter Verwendung der Sudan III-Färbung wurde die Differenzierung in Adipozyten nachgewiesen. Am Tag 28 zeigte sich ein sehr deutlicher Unterschied bezüglich der adipogenen Differenzierung. Während sowohl in den glutealen Proben (Abbildung 12 A) als auch in den abdominalen Isolaten (Abbildung 12 B) Sudan III-positive Fettzellen unter Anwendung der viermaligen Induktion detektiert wurden, ließen sich nach einmaliger Induktion keine Sudan III-positive Areale ausmachen (Abbildung 12 C, D).



**Abbildung 12:** Nach viermaliger Induktion konnten in den glutealen (A) und abdominalen (B) Proben an Tag 28 differenzierte, Sudan III-positive Bereiche nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu lassen sich bei der einmaligen Induktion sowohl gluteal (C) als auch abdominal (D) Sudan III-positive Areale ausmachen. Es ist zu beachten, dass in „D“ lediglich Artefakte rot zur Darstellung kommen. Zellkerne sind mit DAPI (blau) dargestellt. Bar =100 µm.

Auch die quantitative Auswertung der histochemischen Sudan III-Färbung zeigte, dass mit der einmaligen Applikation keine adipogene Differenzierung induziert werden konnte (Abbildung 13 A). Im Gegensatz dazu differenzierten nach viermaliger Induktionsbehandlung sowohl die abdominalen als auch die glutealen adulten Stamm-/ Progenitorzellen in Adipozyten. Hierbei war die adipogene Differenzierung der glutealen Zellen effizienter als die der abdominalen Zellen. Dieser Unterschied zeigte sich ab dem Tag 7 der Differenzierung (Abbildung 13 B). Des Weiteren wurde bei beiden Versuchsansätzen die Zellzahl während des Differenzierungsverlaufs bestimmt und es zeigte sich, dass die Zellen unabhängig von dem angewendeten Induktionsprotokoll ein vergleichbares Proliferationsmuster während der Differenzierung besaßen. Sowohl die Anzahl der abdominalen als auch der glutealen Zellen stieg während der Kultivierungen mit einmaliger und viermaliger Induktion stetig an (Abbildung 13 C, D). Während des Vergleichs der adipogenen Differenzierung aller Proben wurde aufgrund der eindeutig besseren Effizienz im Folgenden ausschließlich das Protokoll mit viermaliger Induktion verwendet.





**Zeitpunkt der Differenzierung (d) Zeitpunkt der Differenzierung (d)**

**Abbildung 13:** Die abdominalen und glutealen adulten Progenitorzellen von drei Probandinnen wurden adipogen differenziert, wobei in Vorversuchen ( $n = 3$ ) unterschiedliche Differenzierungsansätze benutzt wurden. Dargestellt ist der Anteil der Sudan III-positiven Zellen bei einmaliger (A) und viermaliger (B) Induktion. Ebenso ist die Zellzahl bei einmaliger (C) und viermaliger (D) Induktion gezeigt. Bei einmaliger Induktion differenzierten sowohl die glutealen als auch die abdominalen adulten Progenitorzellen nicht in Adipozyten (A). Dagegen ließ sich gluteal sowie abdominal eine adipogene Differenzierung bei der viermaligen Induktion beobachten. Die glutealen Zellen differenzierten statistisch signifikant besser (B). Die Zellzahl wurde nicht von den beiden Induktionsansätzen unterschiedlich beeinflusst. Es sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung voneinander unabhängigen Experimenten ( $n=3$ ) dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen der abdominalen und der glutealen Zellzahl bzw. zwischen den Sudan III-positiven Zellen: \* :  $p \leq 0,05$ ; \*\* :  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ .

### 3.2.4.2 Die glutealen adulten Stamm-/ Progenitorzellen differenzierten besser in Adipozyten als die abdominalen Zellen

Sowohl die abdominalen als auch die glutealen adulten Stamm-/ Progenitorzellen wurden durch viermalige Applikation von Induktionsmedium über 28 Tage in Adipozyten differenziert und zu verschiedenen Differenzierungszeitpunkten histochemisch und bezüglich der Genexpression adipogener Markermoleküle untersucht.

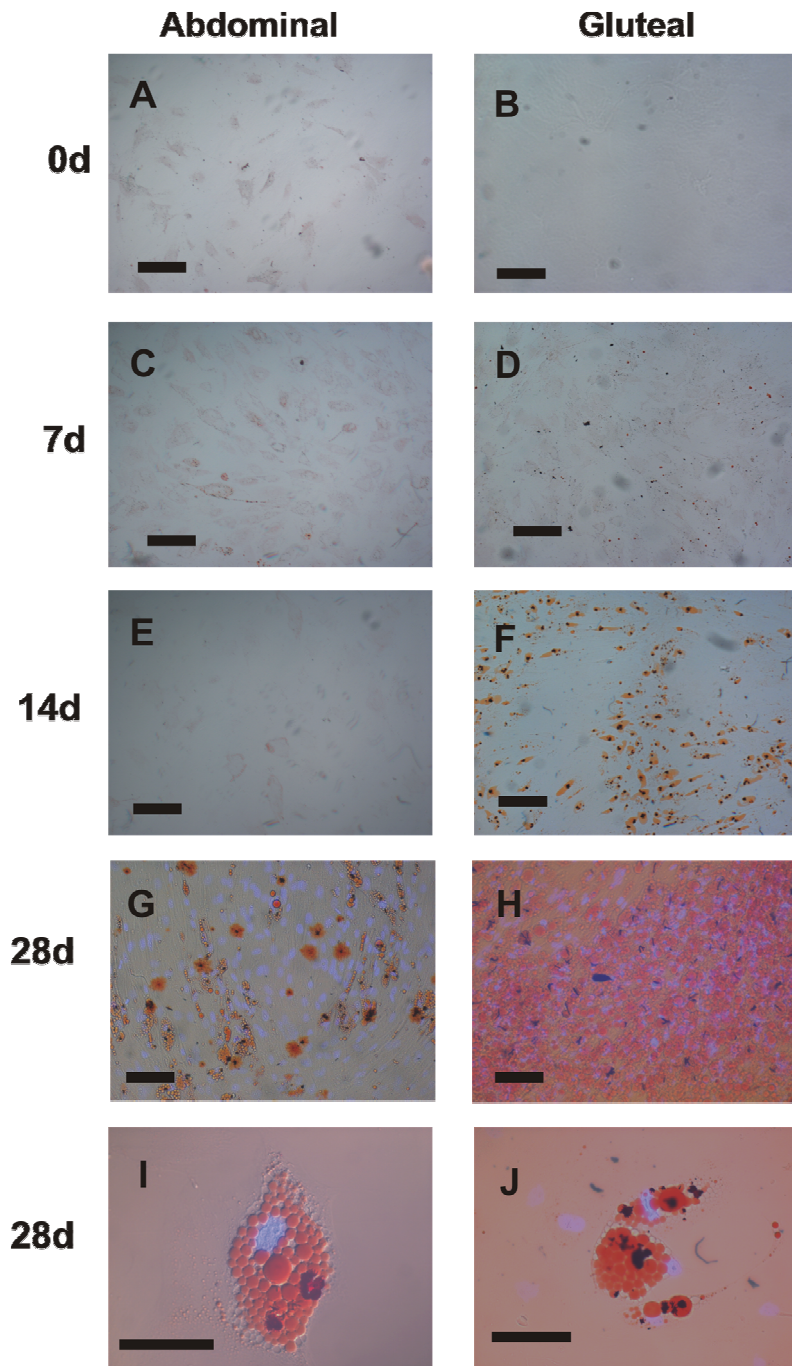
Durch Färbung von Lipidvakuolen mit Sudan III konnte die Differenzierung der Zellen in Adipozyten nachgewiesen werden. Am Tag 0 wurden sowohl in abdominalen (Abbildung 14 A) als auch glutealen (Abbildung 14 B) Zellisolaten

keine differenzierten, Sudan III-positiven Zellen gefunden. Ebenfalls zeigten sich an Tag 7 der Differenzierung bei beiden Zellquellen nur sehr vereinzelt positive Bereiche in der Sudan III-Färbung (Abbildung 14 C, D). Die ersten sichtbaren Unterschiede in der adipogenen Differenzierung der abdominalen und glutealen Zellisolate wurden am Tag 14 der Differenzierung detektiert. Die abdominalen Zellen zeigten weiterhin kaum eine Anfärbung mit Sudan III (Abbildung 14 E). Dagegen konnten in den glutealen Isolaten deutliche Sudan III-positive Bereiche nachgewiesen werden (Abbildung 14 F). Nach 28 Tagen wurden auch adipogen differenzierte Zellen mittels Sudan III-Färbung in den abdominalen Proben charakterisiert (Abbildung 14 G). Die adipogene Differenzierungsfähigkeit der glutealen Zellisolate (Abbildung 14 H) übertraf allerdings wiederum die der abdominalen Zellen. Hinsichtlich der Morphologie waren die Adipozyten homogen (Abbildung 14 I, J).

Zur quantitativen Auswertung wurde die gesamte Zellzahl anhand der DAPI-positiven Zellkerne (Abbildung 15 A) und die Anzahl der differenzierten Zellen anhand der Sudan III-positiven Zellen ermittelt und zueinander ins Verhältnis gesetzt (Abbildung 15 B). Bereits am Tag 0 (Beginn der Differenzierung) war die Zellzahl der glutealen Isolate signifikant größer als die der abdominalen Proben. Während des Zeitraums der adipogenen Differenzierung stieg die Zellzahl der beiden untersuchten Quellen kontinuierlich an. In den abdominalen Proben wurde jedoch nur ein signifikanter Anstieg der Zellzahl von Tag 0 auf Tag 7 beobachtet ( $p \leq 0,001$ ). Während der späteren Kultivierung stieg die abdominale Zellzahl leicht an, aber zwischen den einzelnen Untersuchungszeitpunkten nicht mehr statistisch signifikant. Die gluteale Zellzahl stieg während des gesamten Differenzierungs- zeitraums signifikant an ( $p \leq 0,01$ ). Hieraus resultierte eine signifikant höhere Zellzahl in den glutealen im Vergleich zu den abdominalen Proben sowohl an Tag 14 als auch an Tag 28 der Differenzierung. Dieses kann als Hinweis gewertet werden, dass die glutealen Zellen während der adipogenen Differenzierung besser proliferierten als die abdominalen Zellen (Abbildung 15 A). Die quantitative Auswertung der adipogenen Differenzierung zeigte eine signifikant bessere Differenzierung in Sudan III-positive Zellen innerhalb der glutealen Proben im Vergleich zu den abdominalen Isolaten (Abbildung 15 B). Die ersten adipogenen Zellen wurden vereinzelt an Tag 7 detektiert. Während der weiteren vierwöchigen Differenzierung nahm die Anzahl Sudan III-positiver Fettzellen in den

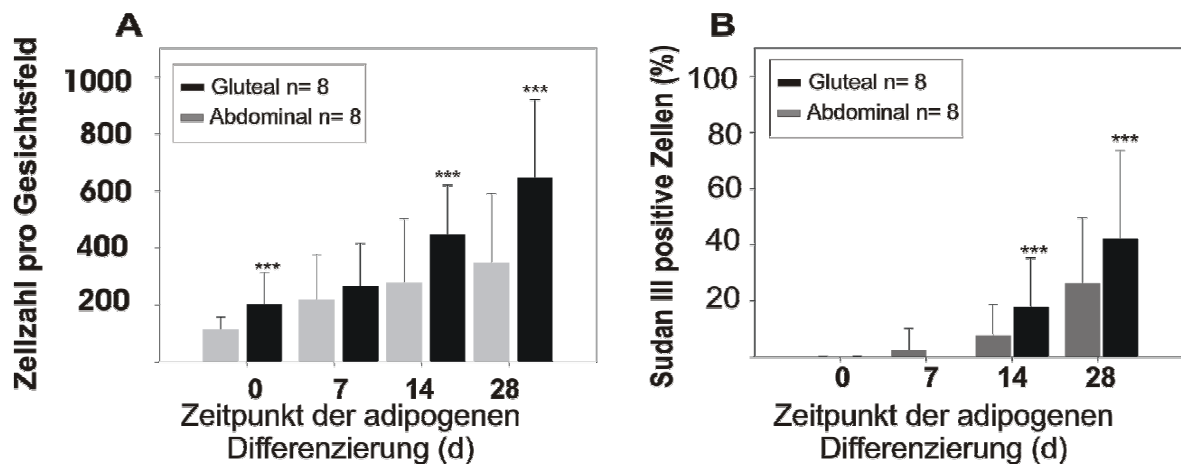


Isolaten glutealer und abdominaler Herkunft zu. An den Tagen 14 und 28 war die Fähigkeit zur adipogenen Differenzierung der glutealen Zellen im Vergleich zu den abdominalen signifikant besser.



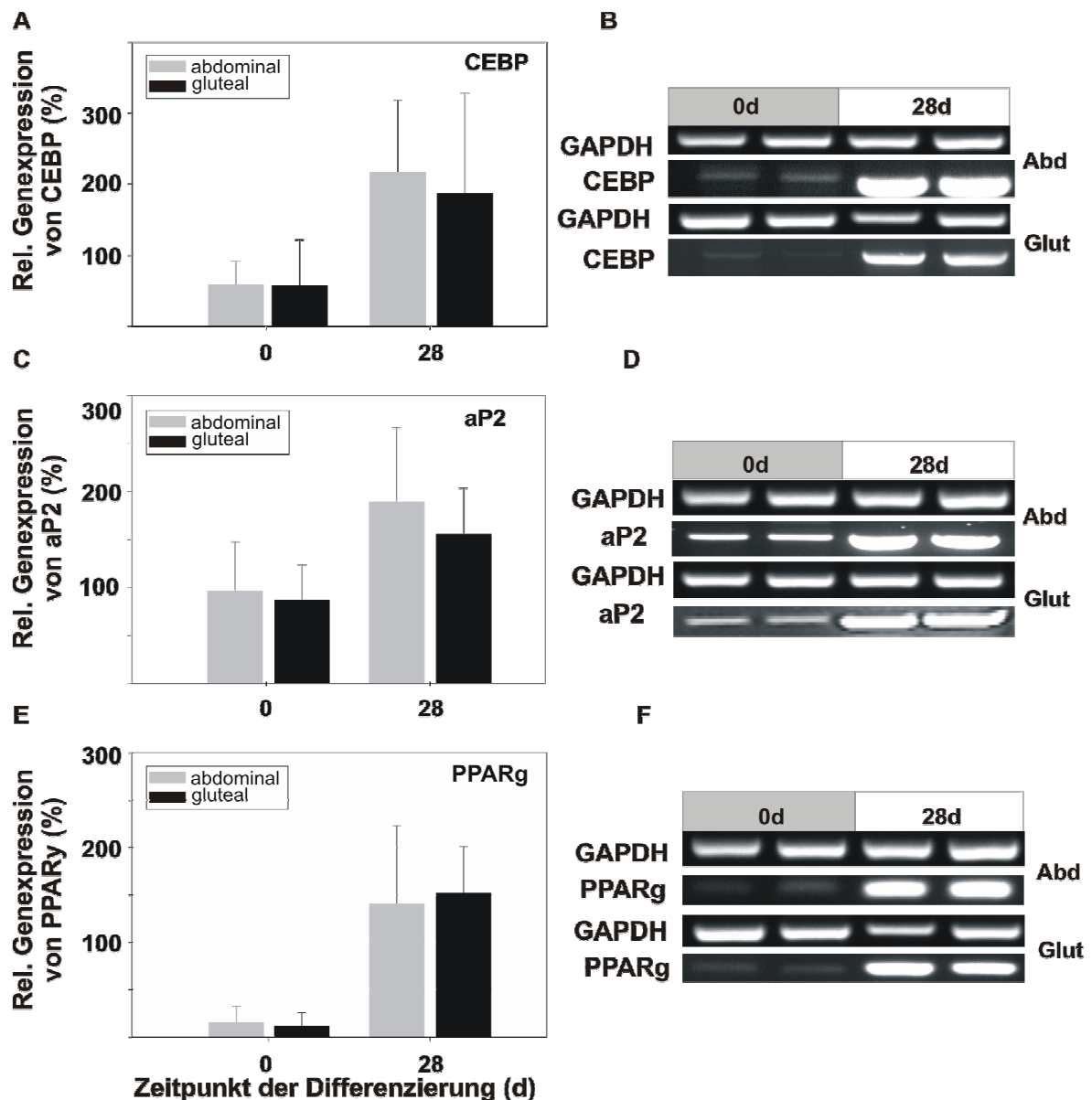
**Abbildung 14:**

Repräsentative Vorstellung der adipogenen Differenzierung. Während der adipogenen Differenzierung wurden die abdominalen und glutealen adulten Progenitorzellen an den Tagen 0 (A, B), 7 (C, D), 14 (E, F) und 28 d (G-J) mit Sudan III gefärbt. In den glutealen Proben wurden adipogen differenzierte Zellen in größerer Menge während früherer Stadien detektiert (F). Während der weiteren Differenzierung war die Anzahl der Sudan III-positiven Zellen in den glutealen Zellisolaten (H) ebenfalls deutlich größer als in den abdominalen Proben (G). Um einen morphologischen Eindruck der adipogenen Zellen zu bekommen, ist in Bild I und J eine höhere Vergrößerung des terminalen Differenzierungsstadiums gewählt. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) dargestellt. Bar = 100 µm.



**Abbildung 15:** Proliferation und adipogene Differenzierung. Während der Differenzierung *in vitro* proliferierten die glutealen adulten Progenitorzellen signifikant besser als die abdominalen Zellen (A). Ebenso nahm der Anteil Sudan III-gefärbter Zellen in den Isolaten signifikant stärker während der Differenzierung zu als in den abdominalen Proben (B). Es sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung voneinander unabhängigen Experimenten (n = 8) dargestellt. Signifikante Unterschiede in der Zellzahl (A) bzw. im Anteil der Sudan III-positiven Zellen zwischen den beiden Isolaten sind angezeigt (B): \*\*\*:  $p \leq 0,001$ .

Neben der histochemischen Untersuchung der adipogenen Zellen wurde auch die Expression fettspezifischer Gene mittels RT-PCR analysiert (Abbildung 16). Dafür wurde an den Tagen 0 und 28 d RNA isoliert und eine RT-PCR unter standardisierten Bedingungen durchgeführt. Die Expression der fettspezifischen Gene wurde im Verhältnis zu *GAPDH* als ubiquitär exprimierter Standard bestimmt, um eine semiquantitative Aussage bezüglich der Expression treffen zu können. Die Expression der untersuchten Fettzell-spezifischen Gene *CEBP* (Abbildung 16 A, B), *aP2* (Abbildung 16 C, D) und *PPAR $\gamma$*  (Abbildung 16 E, F) wurde während der adipogenen Differenzierung von 0 auf 28 d sowohl in den abdominalen als auch glutealen Proben statistisch signifikant hochreguliert. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den abdominalen und glutealen Proben nachgewiesen werden.



**Abbildung 16:** Fettzell-spezifische Gene werden während der Differenzierung glutealer und abdominalen Zellisolaten *in vitro* differenziell exprimiert. Wie die PCR Analysen zeigten, wurde die Expression der Gene *CEBP* (A, B), *aP2* (C, D) und *PPARγ* (E, F) während des Differenzierungsverlaufs hochreguliert. Die PCR Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Ethidiumbromid gefärbten Gele (B, D, F; repräsentative Beispiele) wurden mittels Computer-gestützter Densitometrie analysiert. Die Expression der Fettzell-spezifischen Gene wurde in Relation zu der Genexpression von *GAPDH* gesetzt, die als interner Standard genutzt wurde, um eine semiquantitative Aussage zu erhalten. Es ist zu beachten, dass die y-Achse teilweise unterschiedlich skaliert ist. Es sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler voneinander unabhängiger Experimente (n=8) dargestellt. Zusätzlich wurde jede unabhängige Probe zweifach analysiert wie anhand der Darstellung der repräsentativen Gele ersichtlich ist (B, D, F).

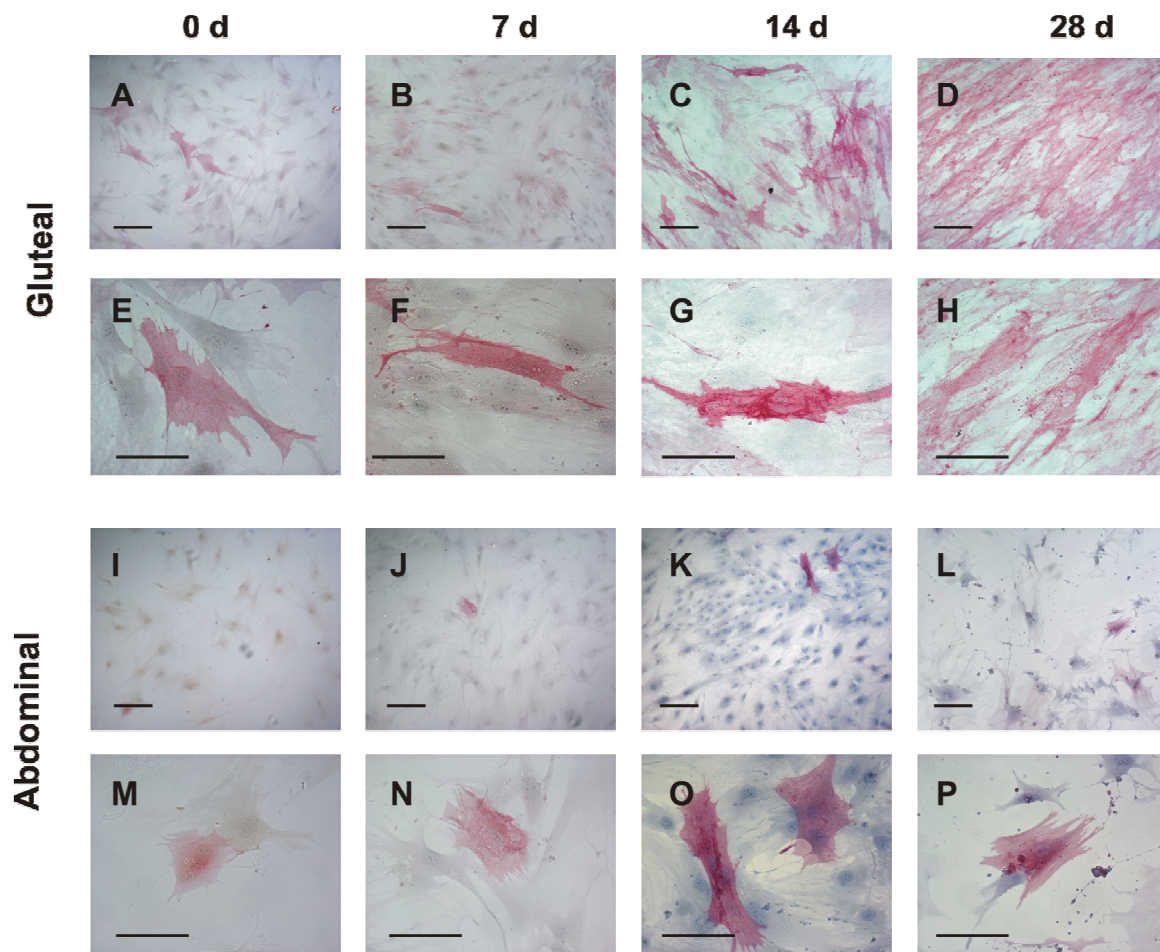
### 3.2.4.3 Die glutealen adulten Stamm-/ Progenitorzellen differenzierten besser in Osteoblasten als die abdominalen Zellen

Die abdominalen und glutealen Zellisolate wurden mit osteogenen Induktionsmedium behandelt und die Differenzierung wurde untersucht. Gluteale (Abbildung 17 A-H) und abdominale (Abbildung 17 I-P) Zellisolate wurden an den

Zeitpunkten 0, 7, 14 und 28 d zum Nachweis Alkalischer Phosphatase (AP) histochemisch gefärbt, um die Differenzierung in Osteoblasten nachzuweisen. An Tag 0 konnten in den glutealen Proben neben den undifferenzierten Zellen vereinzelt auch AP-positive Zellen gefunden werden (Abbildung 17 A, E). Im Gegensatz dazu waren in den abdominalen Proben initial am Tag 0 kaum AP-positive Areale sichtbar (Abbildung 17 I, M). Sowohl in den glutealen als auch in den abdominalen Zellisolaten blieb die Anzahl der AP-positiven Bereiche von Tag 0 bis zu Tag 7 der osteogenen Differenzierung konstant. Am Tag 14 (Abbildung 17 C, G) wurden in den glutealen Proben deutlich mehr differenzierte, AP-positive Zellen im Vergleich zu Tag 7 (Abbildung 17 B, D) detektiert. Im Gegensatz dazu konnten in den abdominalen Proben weiterhin nur sehr wenige AP-positive Zellen gefunden werden (Abbildung 17 K, O). Ein noch deutlicherer Unterschied zeigte sich an Tag 28. Nahezu alle glutealen Zellen erschienen während dieses späten Differenzierungszeitpunktes AP-positiv (Abbildung 17 D, H), wohingegen in den abdominalen Proben weiterhin nur vereinzelt AP-positive Zellen gefunden wurden (Abbildung 16 L, P).

Zur quantitativen Auswertung wurde die Zellzahl anhand der Zellkerne (Abbildung 18 A) und die Anzahl der osteogen differenzierten Zellen anhand der AP-positiven Zellen ermittelt und zur Zellzahl ins Verhältnis gesetzt (Abbildung 18 B). Während der osteogenen Differenzierung stieg die Zellzahl in den glutealen und abdominalen Zellisolaten kontinuierlich an. In den abdominalen Proben konnte ein statistisch hoch signifikanter Anstieg der Zellzahl von Tag 0 auf Tag 7 ( $p \leq 0,001$ ) und von Tag 7 auf Tag 14 ( $p \leq 0,001$ ) beobachtet werden. Während der weiteren Differenzierungszeit nahm die Zellzahl in den abdominalen Proben bis zum Tag 28 nur noch leicht zu. Hingegen stieg in den glutealen Proben die Zellzahl zu jedem ermittelten Zeitpunkt statistisch signifikant an. Zu jedem Untersuchungszeitpunkt (0, 7, 14 und 28 d) ließ sich eine statistisch signifikante höhere Zellzahl in den glutealen Proben im Vergleich zu den abdominalen Zellisolaten ausmachen (Abbildung 18 A). Somit proliferierten die glutealen Zellen während der osteogenen Differenzierung statistisch signifikant besser als die abdominalen Zellen (Abbildung 18 A). Darüber hinaus bestätigte die quantitative Auswertung der AP-positive Zellen den subjektiven morphologischen Eindruck, dass die glutealen Zellen besser in Osteoblasten differenzierten (Abbildung 18 B).

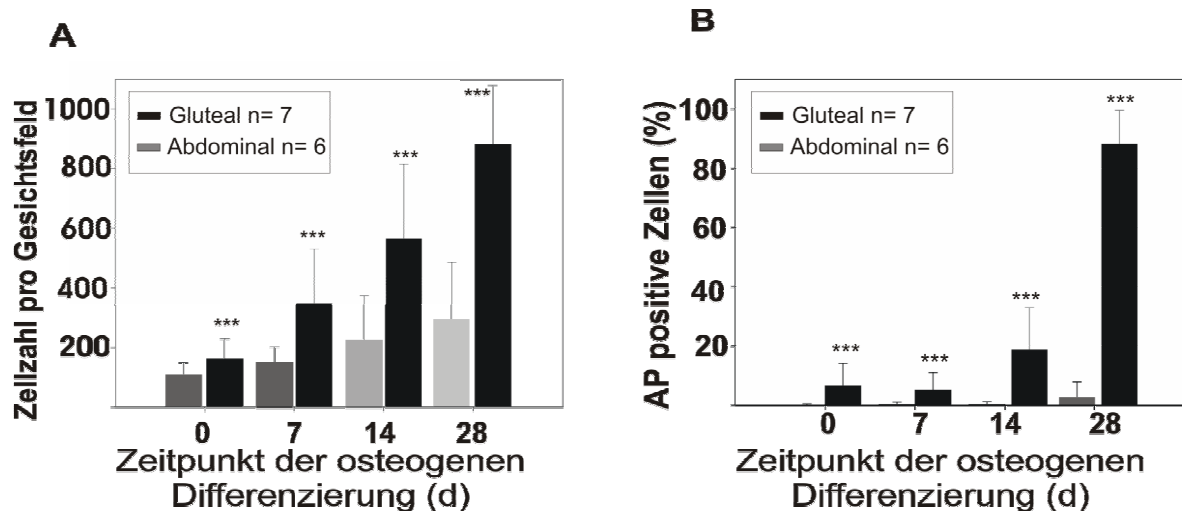




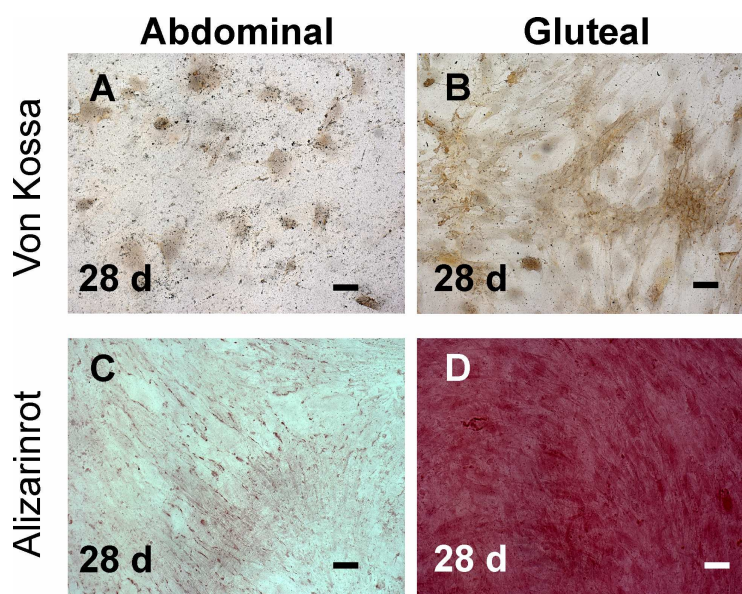
**Abbildung 17:** Darstellung der osteogenen Differenzierung der glutealen (A-H) und abdominalen (I-P) adulten Progenitorzellen während des zeitlichen Differenzierungsverlaufs anhand repräsentativer Färbungen zum Nachweis Alkalischer Phosphatase. Bar = 100  $\mu$ m.

Bereits an Tag 0 war der Anteil der glutealen AP-positiven Zellen statistisch signifikant größer als in den abdominalen Proben. Am Tag 7 blieb das Verhältnis positiver Zellen auf einem vergleichbaren Niveau. Im Laufe der weiteren Differenzierung nahm die Anzahl der osteogen differenzierten Zellen in den glutealen Proben signifikant zu ( $p \leq 0,001$ ). Am Tag 28 waren ca. 85 % der glutealen adulten Progenitorzellen in Osteoblasten differenziert. Im Gegensatz dazu blieb die Anzahl der AP-positiven Zellen in den abdominalen Proben nach Applikation des osteogen Differenzierungsmediums bis zu Tag 14 annähernd konstant. Nur bei der weiteren Kultivierung bis zu Tag 28 wurde ein leichter Anstieg der AP-positiven Zellen sichtbar. Der Anteil der abdominalen, AP-positiven Zellen blieb jedoch eindeutig statistisch signifikant niedriger als in den glutealen Proben. Die Färbungen mit Alizarinrot bzw. nach von Kossa zum Nachweis von Kalzium-Depositionen bestätigten die Ergebnisse. Lediglich in den glutealen Proben konnten vier Wochen nach Applikation des osteogenen Differenzierungs-

mediums eindeutige Kalifizierungen *in vitro* nachgewiesen werden (Abbildung 19). Somit wurde eindeutig gezeigt, dass die glutealen adulten Stamm-/Progenitorzellen signifikant besser in Osteoblasten differenzierten als die abdominalen Zellen.



**Abbildung 18:** Proliferation und osteogene Differenzierung. Während der Differenzierung *in vitro* proliferierten die glutealen Zellen statistisch signifikant besser als die abdominalen Zellen (A). Die abdominalen und glutealen adulten Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung zum histochemischen Nachweis von AP gefärbt und die Anzahl der gefärbten Zellen zur Zellzahl ins Verhältnis gesetzt (B). In den glutealen Proben konnten eindeutig mehr osteogene Zellen detektiert werden. Es sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung voneinander unabhängigen Experimenten ( $n = 8$ ) dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen der Zellzahl (A) bzw. dem Anteil der AP-positiven Zellen glutealer Proben im Vergleich zu den abdominalen Zellisolaten (B) sind dargestellt: \*\*\*:  $p \leq 0,001$ .

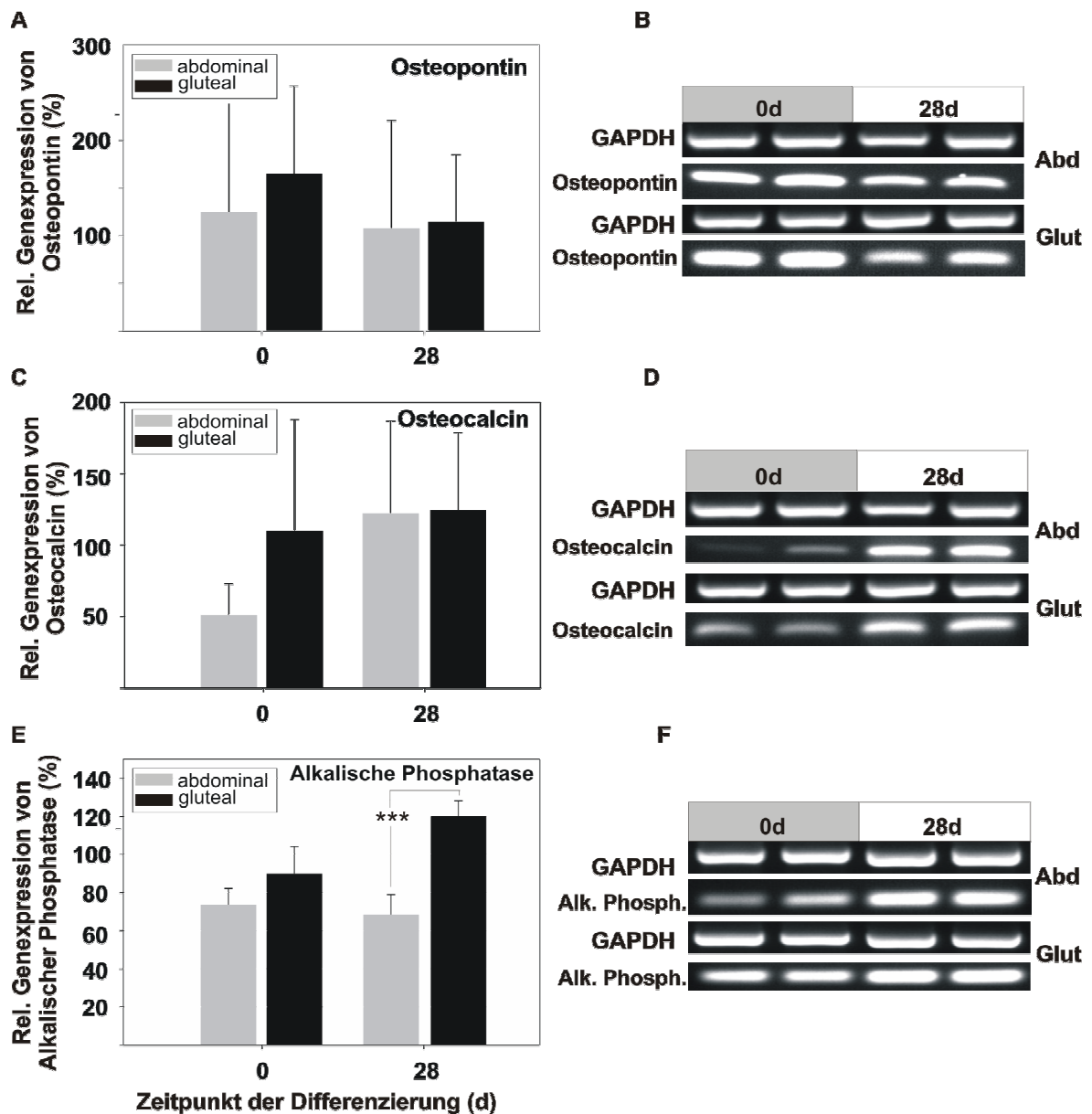


**Abbildung 19:** Dargestellt sind repräsentative Von Kossa-Färbungen (A, B) und Alizarinrot-Färbungen (C, D) am Tag 28. Eindeutige Kalziumdepositionen konnten nur in den glutealen Proben 28 d nach Behandlung mit osteogenem Induktionsmedium nachgewiesen werden (B, D). Bar = 100  $\mu$ m.

Des Weiteren wurde die osteogene Differenzierung auch auf Genexpressions-ebene mittels RT-PCR-Analysen untersucht. Analysiert wurde die Expression der

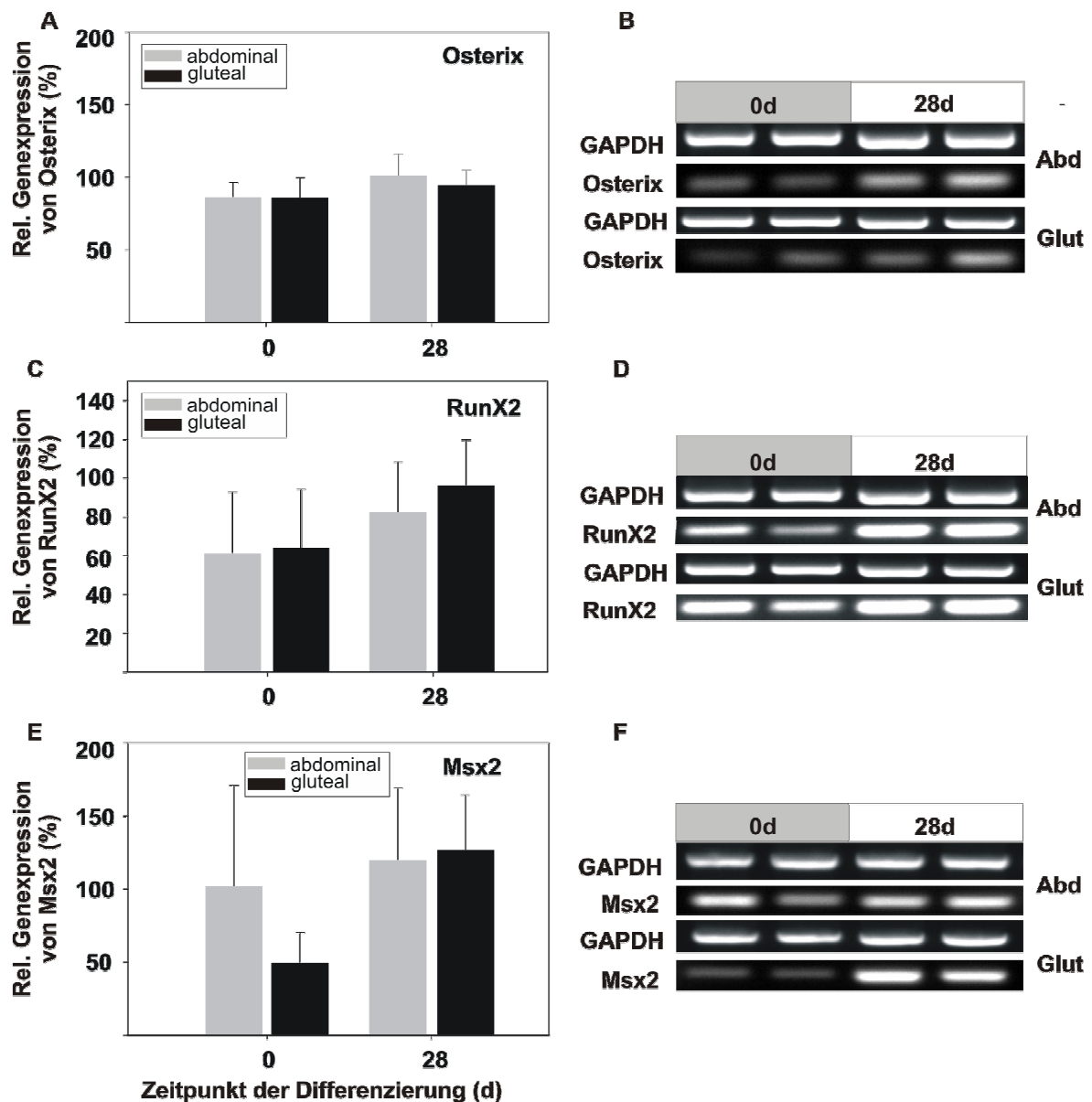
knochenassoziierten Gene *Osteopontin* (Abbildung 20 A, B) und *Osteocalcin* (Abbildung 20 C, D), *Alkalische Phosphatase* (Abbildung 20 E, F), *Osterix* (Abbildung 21 A, B), *RunX2* (*CBFA1*; Abbildung 21 C, D) und *Msx2* (Abbildung 21 E, F). Die Expression der osteogenen Markergene wurde in Relation zu der Genexpression von *GAPDH* gesetzt, die als interner Standard genutzt wurde, um eine semiquantitative Aussage treffen zu können. Die Expression von *Osteopontin* wurde während der Differenzierung sowohl in den glutealen als auch abdominalen Proben leicht herunterreguliert (Abbildung 20 A, B). *Osteocalcin* wurde in den glutealen Isolaten bereits an Tag 0 relativ stark exprimiert (Abbildung 20 C, D). Während der osteogenen Differenzierung der glutealen Isolate wurde die Expression von *Osteocalcin* hochreguliert, jedoch nicht signifikant (0 vs 28 d:  $p = 0,64$ ). Innerhalb der abdominalen Isolate wurde die Expression *Osteocalcin* signifikant hochreguliert (0 vs 28 d:  $p \leq 0,05$ ). Die Expression der *Alkalischen Phosphatase* (Abbildung 20 E, F) wurde in den abdominalen Isolaten leicht herunterreguliert (0 vs 28 d:  $p = 0,7$ ), in den glutealen Zellisolaten jedoch nahm die Expression zu (0 vs 28 d:  $p = 0,07$ ). Der Transkriptionsfaktor *Osterix* (Abbildung 21 A, B) wurde in beiden Depots während der Differenzierung leicht hoch reguliert (gluteal: 0 vs 28 d:  $p = 0,62$ ; abdominal: 0 vs 28 d:  $p = 0,42$ ). Der osteogene Transkriptionsfaktor *RunX2* (Abbildung 20 C, D) wurde während der Differenzierung innerhalb beider Depots statistisch signifikant hochreguliert (gluteal: 0 vs 28:  $p \leq 0,01$ ; abdominal: 0 vs 28:  $p \leq 0,05$ ). *Msx2* (Abbildung 21 E, F) wurde in den glutealen Zellisolaten während der Differenzierung statistisch hoch signifikant stärker exprimiert (0 vs 28:  $p \leq 0,001$ ). In den abdominalen Proben wurde *Msx2* bereits initial relativ stark exprimiert und stieg während der Differenzierung nur noch leicht an (0 vs 28:  $p = 0,47$ ).

Beim Vergleich der Expression der Gene zwischen den abdominalen und glutealen Isolaten wurde nur ein signifikanter Unterschied im Hinblick auf die Expression der *Alkalischen Phosphatase* detektiert (Abbildung 20 C). Die Expression der *Alkalischen Phosphatase* war an Tag 28 in den glutealen Proben signifikant höher als in den abdominalen Isolaten ( $p \leq 0,001$ ).



**Abbildung 20:** Die knochenassoziierten Gene *Osteopontin* (A, B), *Osteocalcin* (C, D) und *Alkalische Phosphatase* (E, F) werden während der Differenzierung glutealer und abdominalen Zellisolate *in vitro* exprimiert. Die PCR Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Ethidiumbromid gefärbten Gele (B, D, F; repräsentative Beispiele) wurden mittels Computergestützter Densitometrie analysiert. Die Expression der knochenassoziierten Gene wurde in Relation zu der Genexpression von *GAPDH* als interner Standard, um eine semiquantitative Aussage zu erhalten. Es ist zu beachten, dass die y-Achse unterschiedlich skaliert wurde. Es sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler voneinander unabhängiger Experimente ( $n=8$ ) dargestellt. Zusätzlich wurde jede Probe zweifach analysiert wie anhand der Darstellung der repräsentativen Gele ersichtlich ist (B, D, F). \*\*\*:  $p \leq 0,001$ .



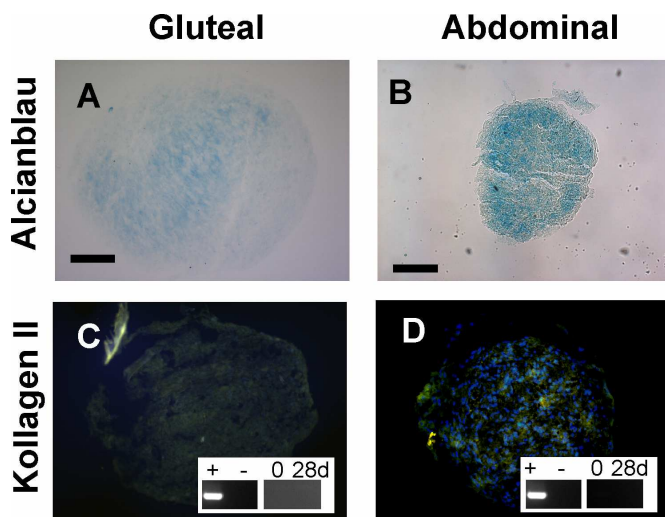


**Abbildung 21:** Die kochenassoziierten Gene *Osterix* (A, B), *RunX2* (C, D) und *Msx2* (E, F) werden während der Differenzierung glutealer und abdominalen Zellen *in vitro* exprimiert. Die PCR Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Ethidiumbromid gefärbten Gele (B, D, F; repräsentative Beispiele) wurden mittels Computer-gestützter Densitometrie analysiert. Die Expression der kochenassoziierten Gene wurde in Relation zu der Genexpression von GAPDH als interner Standard gesetzt, um eine semiquantitative Aussage zu erhalten. Es ist zu beachten, dass die y-Achse unterschiedlich skaliert wurde. Es sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler voneinander unabhängiger Experimente (n=8) dargestellt. Zusätzlich wurde jede Probe zweifach analysiert wie anhand der Darstellung der repräsentativen Gele ersichtlich ist (B, D, F).

### 3.2.4.4 Kein Unterschied in der chondrogenen Differenzierung zwischen den glutealen und abdominalen Zellen

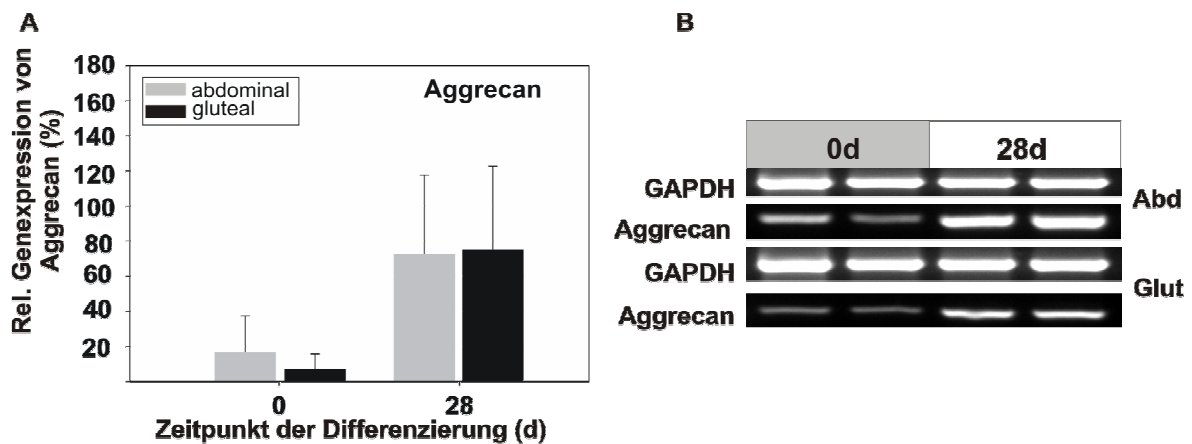
Zum Nachweis der chondrogenen Differenzierung wurden die glutealen und abdominalen Zellisolate, die *via Mirco Mass Body*-Kultivierung differenziert wurden, am Tag 28 der Applikation des chondrogenen Induktionsmediums mit

Alcianblau (Abbildung 22 A, B) und immunhistochemisch mit Kollagen II (Abbildung 22 C, D) gefärbt. Darüberhinaus wurde die chondrogene Differenzierung auch auf Genexpressionsebene mittels RT-PCR-Analysen untersucht. Analysiert wurde die Expression der Knorpel-spezifischen Gene *Kollagen II* und *Aggrecan*.



**Abbildung 22:** Dargestellt sind repräsentative Beispiele der chondrogenen Differenzierung. Sowohl in den glutealen (A) als auch abdominalen Zellisolaten (B), die *via Micro Mass Body* (MMB)-Kultivierung differenziert wurden, konnten Alcianblau-positive Bereiche am Tag 28 nach Applikation des chondro-genen Induktionsmediums gezeigt werden. Jedoch wurde in den MMBs nicht das knorpelspezifische Kollagen II nachgewiesen (C, D). In den Immunfärbungen (C, D) sind die Zellkerne mit DAPI (blau) dargestellt. Die Inserts zeigen anhand repräsentativer Beispiele, dass auch auf Genexpressionsebene kein Nachweis von Kollagen II in den induzierten MMBs gelang (C, D). Für die RT-PCR-Analyse wurde als Positiv-Kontrollen(+) Nasenknorpel verwendet. Bar = 100  $\mu$ m.

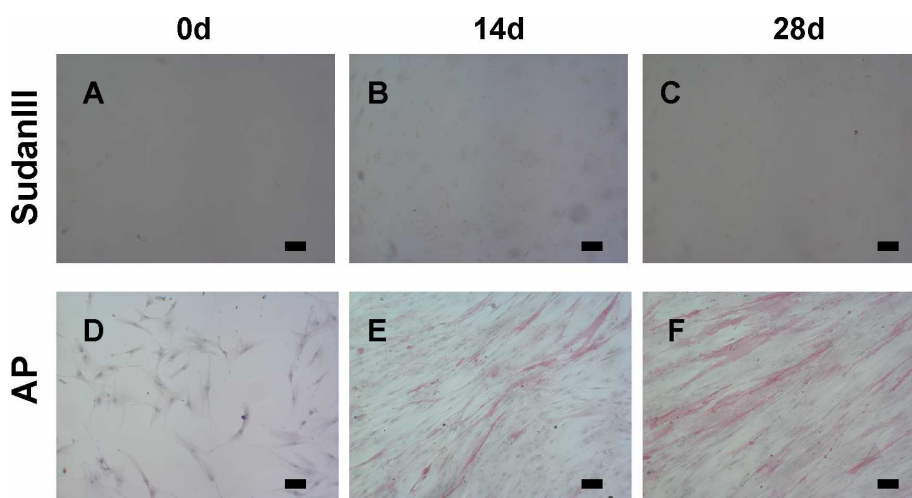
Sowohl in den glutealen als auch abdominalen Proben wurden Alcianblau-positive Mykosubstanzen (Glykosaminoglykane) nach Behandlung mit Induktionsmedium und Differenzierung *via Micro Mass Body*-Kultivierung nachgewiesen (Abbildung 22 A, B). Die Expression von *Aggrecan* (Abbildung 23 A, B) wurden signifikant hochreguliert (0 vs 28 d: abdominal  $p \leq 0,01$ ; gluteal  $p \leq 0,01$ ). Dagegen konnte sowohl immunhistochemisch als auch auf der Genexpressionsebene kein Knorpel spezifisches Kollagen II detektiert werden (Abbildung 22 C, D).



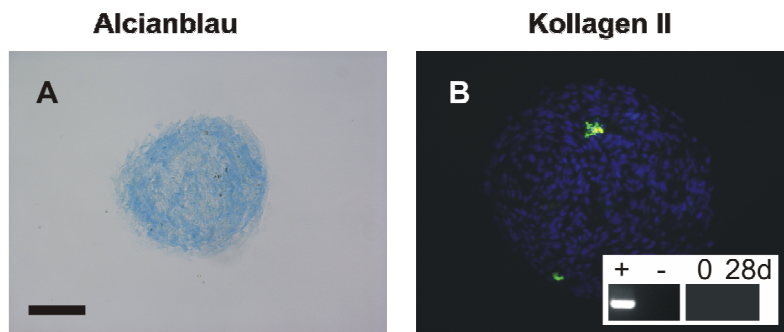
**Abbildung 23:** Das Knorpel spezifische Gene *Aggrecan* (A, B) wurde während der Differenzierung *in vitro* exprimiert. Die PCR Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Ethidiumbromid gefärbten Gele (B, repräsentative Beispiele) wurden mittels Computer-gestützter Densitometrie analysiert. Die knorpelspezifische Genexpression wurde in Relation zu der Genexpression von *GAPDH* als interner Standard gesetzt, um eine semiquantitative Aussage zu erhalten. Es sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler voneinander unabhängiger Experimente ( $n=8$ ) dargestellt. Zusätzlich wurde jede unabhängige Probe zweifach analysiert wie anhand der Darstellung der repräsentativen Gele (B) ersichtlich ist.

### 3.2.4.5 Fibroblasten und uninduzierte Stamm-/ Progenitorzellen zeigten keine Differenzierung

Die juvenilen und adulten Fibroblasten, die als Kontrolle mitgeführt wurden, zeigten zu keinen der untersuchten Zeitpunkte eine adipogene (Abbildung 24 A-C), eine eindeutige osteogene (Abbildung 24 D-F) oder eine chondrogene (Abbildung 25 A, B) Differenzierung nach Applikation der jeweiligen Induktionsmedien.

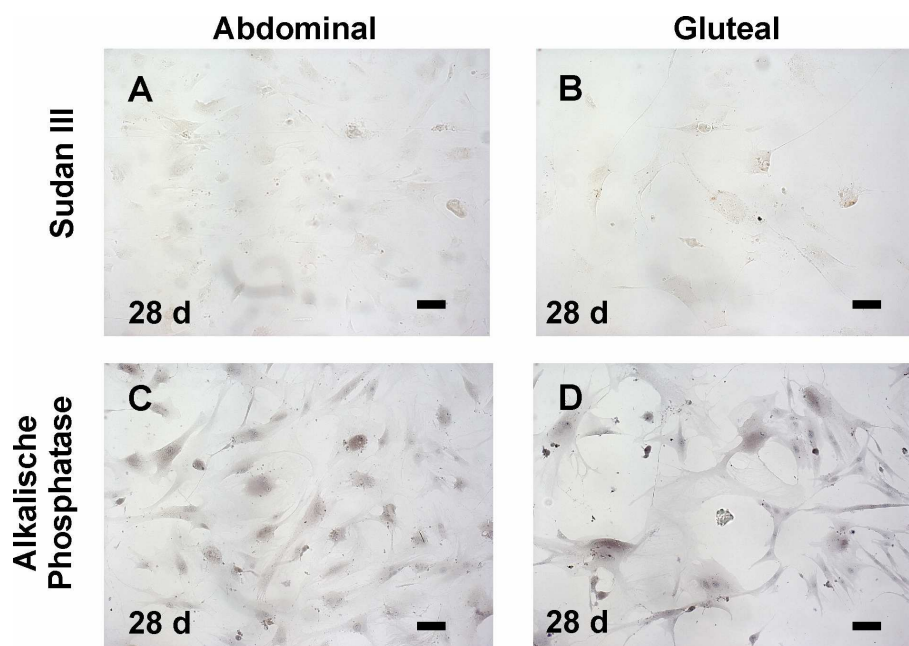


**Abbildung 24:** Dargestellt sind repräsentative Bilder des Versuches der adipogenen (A-C) und osteogenen Differenzierung (D-F) von Fibroblasten nach Applikation des jeweiligen Induktionsmedien. Mittels Sudan II-Färbung konnten keine Fettvakuolen nachgewiesen werden. Nur vereinzelt konnten AP-positive Zellen ausgemacht werden. Eine eindeutige Differenzierung der Fibroblasten konnte nicht induziert werden. Bar = 100  $\mu$ m.



**Abbildung 25:** Dargestellt sind repräsentative Bilder des Versuchs der chondrogenen Differenzierung von Fibroblasten 28 Tage nach Applikation des Induktionsmediums. Es konnte keine chondrogene Differenzierung nachgewiesen werden. Bei der Alcianblau-Färbung (A) zeigten sich zwar positive Bereiche, jedoch wurde nicht die Expression des knorpelspezifischen Kollagen II mittels Immunfärbung (B) oder RT-PCR (B, Insert) nachgewiesen. In der Immunfärbung wurden die Zellkerne mit DAPI (blau) dargestellt. Als Positiv-Kontrolle (+) für die RT-PCR wurde humaner Nasenknorpel verwendet (B). Bar = 100 µm.

Darüber hinaus wurden als Kontrolle die glutealen und abdominalen Zellisolate ohne Applikation der jeweiligen Induktionsmedien für 28 Tage kultiviert. Uninduzierte Zellen differenzierten weder in Adipozyten (Abbildung 26 A, B) oder Osteoblasten (Abbildung 26 C, D) noch in Knorpelzellen (nicht gezeigt).



**Abbildung 26:** Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte der Sudan III- (A, B) und Alkalische-Phosphatase-Färbung (C, D) uninduzierter Stamm-/ Progenitorzellen. Sowohl bei den abdominalen (A, C) als auch den glutealen (B, D) Zellisolaten konnten keine Sudan III-positive bzw. AP-positive Bereiche ohne Applikation der entsprechenden Induktionsmedien detektiert werden. Bar = 100 µm.

## **4 Diskussion**

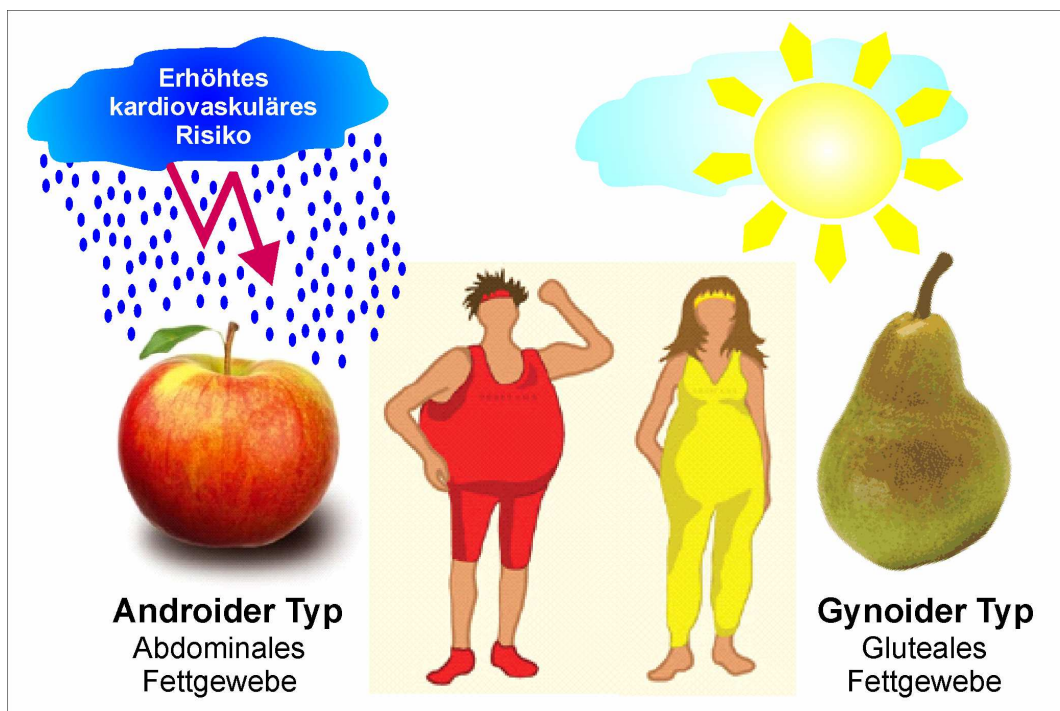
### **4.1 Das subkutane Fettgewebe als Stamm-/ Progenitorzellreservoir**

In den letzten Jahren erweckte die Forschung mit adulten Progenitorzellen aus dem subkutanen Fettgewebe immer größeres Interesse. Es wurde schon mehrfach gezeigt, dass aus dem Fettgewebe stammende adulte Stamm-/ Progenitorzellen *in vitro* in Adipozyten, Osteoblasten, Chondroblasten, Myozyten und Kardiomyozyten differenzieren können (Zuk et al., 2001 und 2002; de Ugarte et al., 2003; Planard-Bernard et al., 2004; Dicker et al., 2005). Neben der Differenzierung in Zellen mesodermalen Ursprungs gibt es Hinweise, dass diese adulten Stamm-/ Progenitorzellen ebenfalls in Zellen nicht-mesodermalen Ursprungs differenziert werden können. So wurden humane Zellen hepatogen (Seo et al., 2005; Talens-Visconti et al., 2006), neurogen (Zuk et al., 2001 und 2002; de Ugarte et al., 2003; Safford, 2002; Safford und Rice, 2005; Krampera et al., 2007), epithelial (Planard-Bernard et al., 2004; Brzoska et al., 2005) und endothelial (Cao et al., 2005; Martínez-Estrada et al., 2005; Moon et al., 2006;) differenziert. Diese Transdifferenzierung ist allerdings weiterhin aktueller Forschungsgegenstand und noch nicht eindeutig erwiesen (zur Übersicht: Zuk et al., 2002; Strem et al., 2005). Insbesondere durch die Möglichkeit der leichten und wiederholbaren Isolierung, die für den Patienten mit einem geringen Morbiditätsrisiko verbunden ist (Housman et al., 2002), erscheint derzeit das subkutane Fettgewebe eines der vielversprechendsten Stammzellreservoirs zu sein (Zur Übersicht: Strem et al., 2005; Glimble et al., 2007; Schaffler und Buchler, 2007).

Dabei wurde die Charakterisierung einzelner subkutaner Fettgewebedepots bisher nicht ausreichend durchgeführt. Somit wurden in dieser Arbeit die aus dem glutealen und abdominalen subkutanen Fettgewebe isolierten adulten Zellen hinsichtlich ihrer Proliferation, ihrer Expression von Oberflächenmarkern und ihrer multipotenten Differenzierungskapazität untersucht und verglichen. Ziel der Studie war es Unterschiede zwischen den abdominalen und glutealen subkutanen Fettgewebedepots zu beschreiben.

Vorab wurde darauf geachtet, dass die Gruppe der Probandinnen, die für die Studie ausgewählt wurden, sehr homogen waren. Dieses sollte eventuellen Stör- bzw. Einflussfaktoren ausschließen. Die klinischen und laborchemischen

Untersuchungsergebnisse der ausgewählten Probandinnen waren alle im Normbereich und sehr einheitlich, so dass ein metabolisches Ungleichgewicht nahezu ausgeschlossen werden konnte. Die Biopsien wurden außerdem am 7. ( $\pm$  1) Tag nach der Menstruation durchgeführt, um hormonelle Schwankungen und damit weitere metabolische Einflüsse zu vermeiden. Ein besonderer Wert wurde auf den BMI, die W/H Ratio und den Körperfettanteil gelegt, da diese Werte von der Fettverteilung stark beeinflusst werden. Die Fettverteilung übt einen großen Einfluss auf die metabolischen Funktionen des Fettgewebes aus (Adams et al., 1997) und spielt ebenfalls eine Rolle bei der Entstehung von metabolischen Erkrankungen wie Glukose-Intoleranz, Hyperinsulinämie, Dyslipidämie und Hypertonie (Arner et al., 1995). Ansteigendes abdominales Fettgewebe, sog. androide Adipositas, korreliert eng mit einem vergrößerten Erkrankungsrisiko für kardiovaskuläre Erkrankungen wie Diabetes mellitus Typ II, Hypertonie, Artherosklerose und Dyslipidämie (Frübeck, 2008). Dem glutealen Fettgewebe werden eher protektive Eigenschaften zugeschrieben (Kahn et al., 1996). Eine Studie zeigte, dass das gluteale Fettgewebe einen geringeren Blutfluss und eine niedrigere hormon-sensitive Lipase-Rate als das abdominale Fettgewebe aufwies. Damit soll das gluteale Fettgewebe mit einem geringeren Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen assoziiert sein (Tan et al., 2004; Abbildung 27).



**Abbildung 27:** Die Fettverteilung beeinflusst das kardiovaskuläre Risikoprofil. Hierbei könnte neben der unterschiedlichen endokrinologischen Aktivität verschiedener Fettgewebedepots auch das uneinheitliche Vorkommen von Stamm-/ Progenitorzellen in glutealen bzw. abdominalen Regionen eine Rolle spielen.



#### **4.2 Die Analyse der Proliferationsfähigkeit und die Immunphänotypisierung sind nicht zur alleinigen Stamm-/ Progenitorzell-Charakterisierung geeignet**

Sowohl aus dem glutealen als auch dem abdominalen Fettgewebe konnten in der vorliegenden Arbeit erfolgreich Zellen durch ihre Fähigkeit der Plastikadhärenz isoliert werden. Diese Eigenschaft stellt ein erstes Kriterium für mesenchymale Stromazellen (MSC) dar (Dominici et al., 2006). Diese heterogene Zellpopulation beschreibt dabei übergeordnet auch eine Gruppe von Stamm-/ Progenitorzellen. Stammzellen besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung *via* symmetrische Teilung. Die asymmetrische Teilungsfähigkeit wiederum ermöglicht die Differenzierung (Caplan, 1991) *via* Vorläufer- (Progenitor-) Zellen. Die Proliferation der Zellen aus dem glutealen bzw. abdominalen Fettgewebe wurde in dieser Arbeit nach einer 24-stündigen Kultivierung mittels eines BrdU Assays untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Zellen beider Depots hinsichtlich ihrer Proliferation nicht zu unterscheiden sind. In einer vor kurzem durchgeführten Studie wurde ebenfalls die Proliferation adulter Stamm-/ Progenitorzellen aus verschiedenen Fettgewebedepots nach 48 und 92 Stunden miteinander verglichen und es wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede detektiert (Schipper et al., 2008). Beim Vergleich des Proliferationsverhaltens zwischen dem subkutanen und omentalen Fettgewebe wurde in der Vergangenheit gezeigt, dass auch hier keine signifikanten Unterschiede bestehen (Roncari et al., 1981; Petterson et al., 1985). Allerdings wurde in einer Studie eine bessere Proliferationsfähigkeit von Stamm-/ Progenitorzellen aus dem subkutanen Fettgewebe im Vergleich zu den Zellen aus omentalem (viszeralem) Fettgewebe demonstriert (Van Harmelen et al., 2004). Diese Unterschiede lassen sich eventuell auch auf verschiedene methodologische Ansätze zurückführen.

In der vorliegenden Arbeit wurde nach einer 24-stündigen Kultivierung eine signifikant höhere Zellzahl in abdominalen Isolaten bestimmt als in glutealen Proben. Jedoch kann nur die Analyse BrdU-positiver Zellen im Verhältnis zur Zellzahl eine valide Aussage in Bezug auf die Proliferationsfähigkeit von Zellen erbringen. Die alleinige Bestimmung der Zellzahl kann einen anderen Eindruck ergeben, da die Anzahl der undifferenzierten Zellen in den einzelnen Gesichtsfeldern zu sehr schwankt.

Ein zweites Kriterium für die Definition von MSCs stellt die Expression eines spezifischen Musters von Oberflächenmarkermolekülen dar (Dominci et al., 2006). Bei der Untersuchung des Expressionsprofils von 15 verschiedenen Oberflächenmarkern konnten im Rahmen dieser Promotionsarbeit keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zellisolaten aus dem glutealen und abdominalen Fettgewebe detektiert werden. Sowohl die abdominalen als auch die glutealen Zellen exprimierten die Oberflächenmarker CD73 (Ecto-5'-Nukleotidase), CD90 (Thy-1) und CD105 (Endoglin). Diese Marker lassen sich charakteristischerweise auf der Oberfläche mesenchymaler Stamm- bzw. Stromazellen des Knochenmarks (z.B. Oswald et al., 2004; Izadpanah et al., 2005; Keating, 2006) und des subkutanen Fettgewebes nachweisen (z.B. Krampera et al., 2007, Meliga et al., 2007). Allerdings konnten Yamamoto et al. (2007) mittels Immunfärbungen in Mäusen zeigen, dass CD90, CD105, Sca-1 und p75NTR in Fettgewebe weit verteilt sind und damit einzeln nicht spezifisch für Stammzellen sind. Die abdominalen und glutealen adulten Progenitorzellen waren durchgehend negativ für den hämatopoetischen Marker CD34. Darüber hinaus wurde auch der Pan-Leukozytenmarker CD45 sowie der vaskuläre endotheliale Marker CD106 (VCAM-1 = *vascular cell adhesion molecule-1*) nicht auf den Zellen detektiert. CD133 (Prominin1), ein Marker für endotheliale Progenitorzellen (Quirici et al., 2001), wurde ebenfalls nicht exprimiert. Auf den abdominalen und glutealen adulten Progenitorzellen konnte auch nicht die Expression von CD271 (*low-affinity nerve growth factor receptor*) gefunden werden. Dies ist ein Marker, der für die positive Selektion mesenchymaler Stammzellen (Quirici et al., 2002) verwendet wurde, dessen Expression allerdings während der *in vitro*-Kultivierung verloren geht. Da in der vorliegenden Studie Zellen der 2. Passage durchflusszytometrisch analysiert wurden, schließt also aufgrund der vorausgegangenen *in vitro*-Kultivierung eine fehlende Expression von CD271 das Vorhandensein von mesenchymalen Stamm-/ Progenitorzellen nicht aus. Der Hyaluronsäurerezeptor CD44 spielt eine Rolle für die Migration mesenchymaler Stammzellen (Zhu et al., 2006) und auch dieser stromale Marker wurde von den isolierten Zellen beider Depots exprimiert.

Die phänotypische Identifizierung von mesenchymalen Stammzellen mittels FACS Analyse ist nach wie vor nicht eindeutig möglich (Wagner und Ho, 2007). Zum Beispiel beschreibt die Mehrheit der Autoren die aus dem Fettgewebe isolierten



adulten Progenitorzellen als eine CD34 negative Zellentität (Zuk et al., 2002; Ashjian et al., 2003; Wagner et al., 2005), während andere Publikationen eine CD34 positive Stammzellpopulation charakterisierten (Miranville et al., 2004; Planat-Benard et al., 2004; Sengenès et al., 2005). Dies kann zum einen durch die Analyse heterogener Zellisolate erklärt werden, zum anderen beeinflussen aber auch exogene Faktoren bei der *in vitro*-Kultivierung die Expression Stroma- und Stammzellassoziierter Markermoleküle (Mitchell et al., 2006). Auch die Einflussgrößen Geschlecht, Alter und Entnahmeregion sowie eventuell bestehende Grunderkrankungen können hierbei von Bedeutung sein (Wagner und Ho, 2007). Die in diese Arbeit aus dem Fettgewebe untersuchten Zellen zeigten dennoch ein relativ einheitliches Antigen-Expressionsprofil, das den Mindestkriterien für die Definition von MSCs (Dominici et al., 2006) entsprach. Damit konnte gezeigt werden, dass die Entnahmeregion bezüglich des subkutanen Fettgewebes keine Rolle für das Expressionsmuster der untersuchten Oberflächenmarkermoleküle spielt. Allerdings wiesen die zusätzlich untersuchten juvenilen und adulten Fibroblasten ebenfalls ein vergleichbares Expressionsmuster auf. Signifikante Unterschiede gab es hierbei nur hinsichtlich der Expression von CD49d (*alpha 4 subunit of VLA-4 receptor = Very Late Antigen-4*) und CD166 (*activated leukocyte cell adhesion molecule*). Diese Marker wurden zu über 90 % von den Fibroblasten exprimiert; in den glutealen und abdominalen Isolaten war hingegen nur auf 50-60 % der Zellen eine Expression nachweisbar. Insgesamt konnten die glutealen und abdominalen Zellen aber nicht eindeutig von Fibroblasten anhand der Expression von Oberflächenmarkermolekülen unterschieden werden. Diese Beobachtung entspricht einer anderen Studie, in der die humanen Fibroblasten Zell-Linien HS68 und NHDF einen identischen Phänotyp besaßen und nicht von mesenchymalen Stammzellen unterschieden werden konnten (Wagner und Ho, 2007). Mittels der Charakterisierung unter der Verwendung herkömmlicher verwendeter Oberflächenmarkermoleküle können mesenchymale Stamm-/ Progenitorzellen demnach nicht ausreichend identifiziert werden. Das entscheidende Kriterium zur Definition von MSC und damit mesenchymaler Stamm-/ Progenitorzellen stellt daher die Beschreibung der Differenzierung in Knorpel-, Knochen- und Fettzellen (Dominici et al., 2007) dar.

#### 4.3 Die *in vitro* Differenzierung als unverzichtbarer Standard der Charakterisierung von Stamm-/ Progenitorzellen

Neben der Analyse der Proliferation und der Expression bestimmter Oberflächenmarkermoleküle wurden die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zellen in die adipogene, chondrogene und osteogene Richtung differenziert. Die Fähigkeit der adipogenen Differenzierung *in vitro* wurde anhand von histochemisch mit Sudan III- bzw. Oil-red O-gefärbten Zellen nachgewiesen. Bei den adulten Progenitorzellen beider Depots konnten zu verschiedenen Differenzierungszeitpunkten unterschiedlich stark gefärbte Zellen detektiert werden. Dabei ließen sich abdominal erst während späterer Differenzierungszeitpunkte (Tag 28) deutlich sichtbare Sudan III-positive Fettvakuolen ausmachen, während eine adipogene Differenzierung der glutealen Zellen bereits ab Tag 14 detektiert wurde. Insgesamt fanden sich an Tag 28 in den glutealen Proben eindeutig mehr mit Sudan III-gefärbte Fettzellen als in den abdominalen Isolaten. Auch bei der Analyse der Genexpression mittels RT-PCR konnte innerhalb beider Depots von Tag 0 zu Tag 28 ein signifikanter Anstieg der Expression der fettzellspezifischen Gene *C/EBP-β*, *aP2* und *PPARγ* beobachtet werden. Entsprechend den histochemischen Ergebnissen wurden die Fettzellmarker am späteren Untersuchungszeitpunkt dabei in den glutealen Isolaten stärker exprimiert. *PPARγ* ist ein adipogener Transkriptionsfaktor, der während der adipogenen Differenzierung besonders hochreguliert (Tontonoz und Spiegelman, 2008). *aP2* wird primär von Adipozyten und Makrophagen exprimiert und stellt ein Carrier für Fettsäuren dar (Baxa et al., 1989). *C/EBP-β* ist ein in der frühen Differenzierungsphase exprimierter Transkriptionsfaktor und gilt als Marker für die frühe adipogene Differenzierung (Gustafson und Smith, 2006; Rosen und MacDougald, 2006).

Eine andere Studie zeigte einen geringen Unterschied beim Vergleich der Differenzierung von Präadipozyten aus dem femoralen und abdominalen subkutanen Fettgewebe. Hierbei wurde bei 24 übergewichtigen Probandinnen Fettgewebe durch eine Nadelbiopsie entnommen. Das Ausmaß der adipogenen Differenzierung wurde durch Bestimmung des Fettzelldurchmessers und der Aktivität der Glycerol-3-Phosphat Dehydrogenase (GPDH) bestimmt. Dabei wurden anhand des Fettzelldurchmessers keine Unterschiede detektiert. Jedoch

wurde bei den abdominalen Zellen eine statistisch signifikant höhere GPDH Aktivität beobachtet, so dass die abdominalen Zellen besser in Adipozyten zu differenzieren schienen (Hauner et al., 1991). Hingegen wurde in der vorliegenden Arbeit basierend auf der morphologischen Beschreibung tendentiell eine bessere adipogene Differenzierung der glutealen Zellen beschrieben. Diese unterschiedlichen Beobachtungen könnten durch unterschiedliche Kulturbedingungen entstanden sein, durch die jeweils eine bestimmte Zelllinie selektioniert sein könnte (Gregoire et al., 1998). Darüber hinaus wurde bei der Studie von Hauner et al. (1991) das Fettgewebe übergewichtiger Probandinnen untersucht. Die Frauen in der vorliegenden Arbeit besaßen hingegen alle einen BMI im Normbereich. Es ist bekannt, dass sich die Sekretion bestimmter Adipokine bei Gewichtszunahme verändert (zur Übersicht: Ahima und Osei, 2008). Dadurch könnten ebenfalls die Differenzierungskapazitäten der Stamm-/ Progenitorzellen bei Übergewichtigen gegenüber Normalgewichtigen verändert werden. Bei einer neueren Studie wurden Stamm-/ Progenitorzellen aus fünf verschiedenen subkutanen Fettgewebedepots (abdominal oberflächlich und tief, Arm-, Oberschenkel- und Tronchanter-Region) von 12 Probandinnen miteinander verglichen und darüber hinaus der Einfluss des Alters untersucht (Schipper et al., 2008). Dabei wurde gezeigt, dass die Gruppe der 40 bis 45 Jährigen bei der zusammenfassenden Betrachtung aller Depots statistisch signifikant mehr Lipide einlagerte als die Gruppe der 25 bis 30 Jährigen und der 55 bis 60 Jährigen. Bei der Betrachtung der einzelnen Depots wurden allerdings keine Unterschiede ausgemacht (Schipper et al., 2008). Auch hierbei wurden aber Probandinnen ausgewählt, bei denen der BMI zwischen 24 bis 28 kg/m<sup>2</sup> variierte, so dass die Probandinnen teilweise übergewichtig waren (BMI > 25 kg/m<sup>2</sup>). Dieses relativ uneinheitliche Probandinnenkollektiv könnte wiederum die Differenzierungskapazität beeinflusst haben. Außerdem wurden die drei unterschiedlichen Altersgruppen (25 bis 30 Jahre, 40 bis 45 Jahre und 55 bis 60 Jahre) bei der Untersuchung der einzelnen Depots zusammen betrachtet. Die Studie zeigte, dass das Alter auf die Differenzierung einen Einfluss ausübte. Dadurch könnten tatsächlich vorhandene Unterschiede innerhalb der einzelnen Depots fälschlich aufgehoben worden sein. Darüber hinaus wurden keine Angaben zum weiblichen Zyklus der Probandinnen gemacht.

In der vorliegenden Arbeit hingegen wurden alle Probandinnen am 7.Tag ( $\pm 1$ ) nach dem letzten Tag der Menstruation biopsiert. Außerdem wurden die Probandinnen mit einem durchschnittlichen Alter von 29,4 ( $\pm 3,7$ ) und einem BMI von 22,5 ( $\pm 1,8$ ) ausgewählt. Damit konnten altersbedingte Einflüsse sowie ein verändertes Sekretionsprofil bei Übergewicht ausgeschlossen werden. Eine weitere Begründung für die unterschiedlichen Ergebnisse bei der adipogenen Differenzierung wäre, dass die Population der adulten Stamm-/ Progenitorzellen heterogen ist. So zeigte eine Studie, dass die aus dem subkutanen Fettgewebe isolierten Zellen von 12 Probandinnen bei gleichen optimalen adipogenen Kulturbedingungen *in vitro* unterschiedlich differenzierten (Sen et al., 2001). Dieses führte zu der Annahme, dass die *via* Plastikadhärenz ohne eindeutige Selektion isolierten adulten Progenitorzellen unterschiedliches Potential zur Differenzierung besitzen können. Zusätzlich können bereits kleine Änderung in den Kultivierungsprotokollen das Ausmaß der Differenzierung modulieren (Wagner und Ho, 2007). Beispielsweise wurde der Einfluss der Induktionsfrequenz in der vorliegenden Promotionsarbeit deutlich. Die adulten Progenitorzellen differenzierten nur nach viermaliger Induktion nicht hingegen nach einmaliger Applikation des Induktionsmediums in Fettzellen. Hierbei wurden zufällig drei Isolate untersucht, die eine besonders gute adipogene Differenzierung aufwiesen. Dadurch erklärt sich auch der Unterschied in der adipogenen Differenzierung aller Isolate im Vergleich zu den drei ausgewählten Proben. Bei der Bestimmung der Zellzahl hingegen wurde kein Unterschied bei viermaliger Induktion im Vergleich zur einmaligen Applikation des Induktionsmediums detektiert. Daraus könnte geschlossen werden, dass das Induktionsmedium keinen Einfluss auf die Proliferation der Zellen, sondern nur auf die Differenzierung der Zellen ausübt. Die adulten Stamm-/ Progenitorzellen beider subkutaner Fettgewebedepots wurden auch in die osteogene Richtung differenziert. Dabei wurde die Fähigkeit der Zellen zur osteogenen Differenzierung *in vitro* histochemisch mit der Alkalischen Phosphatase Färbung sowie dem Nachweis von Kalziumdepositionen mittels Alizarinrot- bzw. von Kossa-Färbung nachgewiesen. Der Anstieg der Genexpression des osteoblastenspezifischen Markers *Osteocalcin* bestätigte die osteogene Differenzierung (Aubin, 1998; Stein et al., 1996). Das *Osteocalcin* ist ein extrazelluläres nicht kollagenes Matrix Protein, welches ausschließlich von Osteoblasten zur Formung einer mineralisierten Matrix produziert wird (Hauschka

et al., 1989). Weitere knochenassoziierten Gene, deren Expression zur Bestätigung der osteogenen Differenzierung untersucht wurden, waren *RunX2* (Lian und Stein, 2003), *MSX2* (Zhang et al., 1997), *Osterix* (Gao et al., 2004) und *Alkalische Phosphatase (AP)*. In den glutealen Isolaten wurden die Expression von *MSX2*, *RunX2 (Cbfa1)* und der *AP* hoch signifikant hochreguliert. In den abdominalen Isolaten wurde der osteogene Transkriptionsfaktor *RunX2* während der Differenzierung statistisch signifikant hochreguliert. *RunX2* ist ein osteogener Transkriptionsfaktor, der für die Differenzierung von Osteoblasten notwendig ist (Deng et al., 2008). *Osterix* reguliert die späteren Differenzierungsstufen der Osteoblasten (Franceschi, 2005; Friedman et al., 2006). Nur bei der Expression der *AP* konnte an Tag 28 ein statistisch hoch signifikanter Unterschied zwischen den abdominalen und glutealen Isolaten detektiert werden. Im Knochen spielt die *AP* eine Rolle bei der Mineralisation (Fedde et al., 1988). *In vitro* wird die *AP* als relativer Marker für die Knochenzelldifferenzierung angesehen (Rodan und Rodan, 1984). Dabei wird eine Zunahme der Enzymaktivität in Korrelation mit dem Differenzierungsstadium der Osteoblasten gesehen (Aubin und Heersche, 1993). Die Herunterregulation der Expression von *Osteopontin* während der Differenzierung erklärt sich dadurch, dass bereits undifferenzierte mesenchymale Stamm-/Progenitorzellen diesen Marker stark exprimieren (Kramer et al., 2006). *Osteopontin* ist daher nicht knochenspezifisch, sondern wird auch in anderen Geweben gebildet (Butler, 1989).

Studien, die sich mit der osteogenen Differenzierung von Progenitorzellen aus verschiedenen subkutanen Fettgewebedepots befassen, sind rar. In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde die osteogene Differenzierungskapazität zwischen dem tiefen und oberflächlichen subkutanen Fettgewebe bei drei Frauen und drei Männern verglichen (Aksu et al., 2008). Dabei wurden keine signifikanten Unterschiede im Grad der Differenzierung, bei den aus weiblichem Fettgewebe isolierten Zellen gefunden. Dagegen differenzierten die Zellen aus dem oberflächlichen subkutanen Fettgewebe der Männer schneller und besser in Osteoblasten als die Zellen aus dem tiefen Fettgewebe. Somit stellte das tiefe subkutane abdominale Fettgewebe der Männer das Gewebe mit der vermeintlich größten Potenz zur osteogenen Differenzierung dar (Aksu et al., 2008). Auch bei dieser Studie betrug die Altersspanne bis zu 19 Jahren und der BMI wurde nur als  $< 35 \text{ kg/m}^2$  festgelegt. Somit könnte auch hier wiederum in dem relativ kleinen

Kollektiv das Alter bzw. der Körperfettanteil mit variierenden Sekretionsprofil die osteogene Differenzierung der Stamm-/ Progenitorzellen beeinflusst haben. Eine weitere Studie verglich ebenfalls das gluteale und abdominale Fettgewebe hinsichtlich der Möglichkeit Stamm-/ Progenitorzellen zu isolieren und ihrer Fähigkeit zur Differenzierung (Jurgens et al., 2008). Jurgens et al. (2008) zeigten einen signifikanten Unterschied in der Proliferation beider Zellisolate. Dabei proliferierten die abdominalen Zellen besser als die glutealen. Bei der osteogenen und chondrogenen Differenzierung wurden keine Unterschiede detektiert. Wie bei den zuvor zitierten Studien wurde auch hier ein Kollektiv gewählt, in dem Alter (24 bis 62 Jahre; Mittelwert: 40 Jahre) und BMI (22,2 bis 29,6 kg/m<sup>2</sup>, Mittelwert 25,5 kg/m<sup>2</sup>) relativ stark variierten. Darüber hinaus wurde bei den 22 weiblichen Probandinnen entweder abdominal (n=12) oder gluteal (n=10) Fettgewebe entnommen. Im Vergleich zu der vorliegenden Arbeit wurde allerdings hierbei nicht der weibliche Zyklus beachtet. Der erhöhte BMI, die Altersspanne und interne Differenzen zwischen den beiden Kollektiven könnten somit die Ergebnisse beeinflusst haben. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Zellen aus dem glutealen subkutanen Fettgewebe am besten in Osteoblasten differenzierten. Die Zellen aus dem abdominalen Fettgewebe hingegen zeigten kaum eine osteogene Differenzierung.

Die abdominalen und glutealen Zellisolate, die in der vorliegenden Dissertationsarbeit untersucht wurden, wurden ebenfalls hinsichtlich der chondrogenen Differenzierungsfähigkeit analysiert. Es konnten in glutealen sowie abdominalen Zellisolate anhand der Alcianblaufärbung Hinweise für eine chondrogene Differenzierung gefunden werden. Jedoch war die chondrogene Differenzierung nicht konstant. Auch der Nachweis der Expression des knorpelspezifischen Kollagen II gelang nicht. Dieses schließt jedoch nicht aus, dass es sich bei den isolierten Zellen um mesenchymale Stamm-/ Progenitorzellen handelt. Wie bereits dargelegt, stellen MSCs eine heterogene Population dar. In dieser Population gibt es mono-, bi- und tripotente mesenchymale Stamm-/ Progenitorzellen. Die Isolation *via* Plastikadhärenz ermöglicht allerdings nicht immer und keinenfalls zuverlässig die Isolation tripotenter Zellen. Die Identifikation eines mesenchymalen Stammzellmarkers, der eine eindeutige Selektion ermöglichen würde, stellt daher eine der wichtigsten und entscheidenden Ziele der adulten Stammzellforschung für die Zukunft dar.

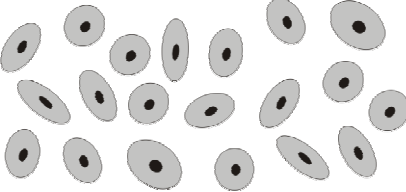
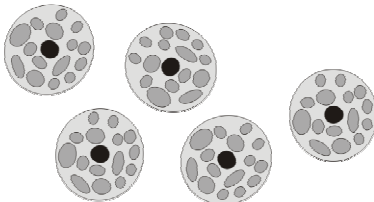
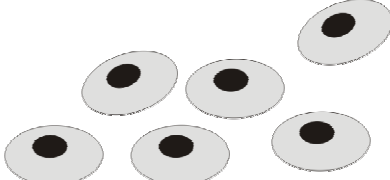
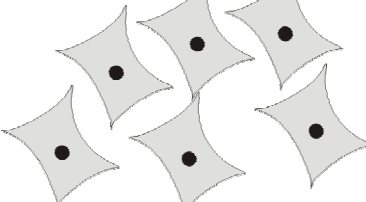
#### 4.4 Ausblick: Klinischer Einsatz von Stamm-/ Progenitorzellen aus Fettgewebe

Aus den wenigen Studien zur Untersuchung der einzelnen unterschiedlichen Fettgewebedepots wird deutlich, dass sich nicht nur viszerales und subkutanes Fettgewebe hinsichtlich ihres Hormonprofils und ihrer adulten Stamm-/ Progenitorzellen unterscheiden, sondern dass es auch „Unterformen“ innerhalb des subkutanen Fettgewebes gibt.

In Zukunft müssen noch weitere Studien durchgeführt werden, um die Vor- und Nachteile der einzelnen subkutanen Fettgewebedepots im Detail hervorzuheben. Besonders bei der Entwicklung stammzell-basierter Therapien und bei dem sog. *tissue engineering* versprechen zunehmend die adulten Stamm-/ Progenitor-zellen große Hoffnungen (zur Übersicht: Zuk et al., 2008, Mizuno, 2009). Autologe humane Stamm-/ Progenitorzellen aus dem Fettgewebe wurden bereits erfolgreich zur Behandlung von offenen Fisteln bei 5 Patienten mit der chronisch entzündlichen Darmerkrankung Morbus Crohn (Gracia-Olmo et al.; 2005) sowie zur Reparatur tracheomediastinaler Fisteln (Alvarez et al., 2008) eingesetzt. Eine weitere Behandlungsmethode ist der sog. *Cell-assisted Lipotransfer* (Yoshimura et al., 2008). Hierbei wird dem Fettgewebe eine zusätzliche Menge an humane Stamm-/ Progenitorzellen aus dem Fettgewebe hinzugefügt. Diese Technik kam zum Beispiel schon bei der kosmetischen Brustvergrößerung und bei der Behandlung facialer Lipoatrophie (Yoshimura et al., 2008) zum Einsatz. Eine Übersicht über die Rolle der humanen Stamm-/ Progenitorzellen bezüglich ihres Einsatzes bei Weichteilvergrößerung bzw. -umgestaltung bietet Yoshimura et al. (2009).

Auch die Transplantation von autologen Stamm-/ Progenitorzellen aus dem Fettgewebes bei einem sieben Jahre alten Mädchen führte bereits erfolgreich zum Verschluss eines großen, bilateralen Calvariumdefekts (Lendeckel et al., 2004). Eine Übersicht über die Verwendung von Stamm-/ Progenitorzellen aus dem Fettgewebe zur Behandlung kranio-faszialer Knochendefekte gibt Patricia Zuk (2008). Auch bei Schäden von Sehnen, Knochen und Knorpel orthopädischer Patienten werden adipogene Stamm-/ Progenitorzellen als Quelle für zelluläre Therapien diskutiert (zur Übersicht: Tapp et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass das gluteale subkutane Fettgewebe ein großes Potential zur

osteogenen Differenzierung besitzt (siehe Abbildung 27). Somit stellt das gluteale subkutane Fettgewebe ein geeignetes Reservoir an osteogenen Progenitorzellen dar. Zukünftig sollte daher subkutanes Fettgewebe aus dem glutealen Bereich für die Stamm-/ Progenitorzellvermittelte Heilung entsprechender Knochendefekte verwendet werden.

| <b>Abdominal</b> | <b>Fettgewebsquelle für mesenchymale Stromazellen</b><br> | <b>Gluteal</b> |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| <b>+</b>         | <b>Adipogene Differenzierung</b><br>                     | <b>++</b>      |
| <b>+/-</b>       | <b>Chondrogene Differenzierung</b><br>                  | <b>+/-</b>     |
| <b>(+)</b>       | <b>Osteogene Differenzierung</b><br>                    | <b>+++</b>     |

**Abbildung 28:** In Hinblick auf die adipogene, chondrogene und osteogene Differenzierungsfähigkeit konnten aus dem glutealen Fettgewebe im Vergleich zum abdominalen Fettgewebe mesenchymale Stromazellen mit einer deutlich höheren Potenz gewonnen werden.

+ = Nachweis einer zellulären Differenzierung; ++ = Nachweis einer ausgeprägten zellulären Differenzierung; +++ = Nachweis einer sehr ausgeprägten zellulären Differenzierung;  
 - = kein Nachweis einer zellulären Differenzierung; +/- = Indifferente Befunde, kein eindeutiger Nachweis einer zellulären Differenzierung.



## **5 Zusammenfassung**

Das Fettgewebe besitzt nicht nur die Rolle der Speicherung und Abgabe von Energie, sondern greift auch als endokrin aktives Organ in viele Stoffwechselwege ein. Zusätzlich konnte schon mehrfach gezeigt werden, dass das Fettgewebe Stamm-/ Progenitorzellen enthält.

Das Ziel der Studie war es, mesenchymale adulte Stamm-/ Progenitorzellen aus dem glutealen und abdominalen subkutanen Fettgewebe zu isolieren und vergleichend zu charakterisieren.

Dafür wurde subkutanes Fettgewebe aus dem periumbilikalen (abdominalen) und glutealen Bereich von 10 Probandinnen entnommen. Die Probandinnen wurden zuvor genau befragt und untersucht, um eine homogene Biopsiegruppe zusammenzustellen. Zusätzlich wurde einheitlich der 7.Tag nach dem letzten Tag der Menstruation als Biopsietag gewählt. Die Gewebeproben beider Depots wurden histologisch durch einen Dermatohistopathologen untersucht. Die Zellen wurden *via* Plastikadhärenz isoliert und durchflusszytometrische Analysen zur Untersuchung der Expression von Oberflächenmarkermolekülen wurden durchgeführt. Darüber hinaus wurde die Proliferationskapazität der Zellen mittels eines BrdU-Assays analysiert. Das Differenzierungspotential in die adipogene, osteogene und chondrogene Zellrichtung wurde durch spezielle histochemische Färbungen, Immunfärbungen und RT-PCR Analysen beurteilt.

Mittels histologischer Beurteilung der Gewebedepots konnten keine morphologischen Unterschiede zwischen dem glutealen und abdominalen Fettgewebe detektiert werden. Darüber hinaus zeigten die Zellisolate aus dem glutealen und abdominalen Fettgewebe keine Unterschiede bei der Proliferation sowie bei der Expression von zellulären Oberflächenmarkermolekülen. Jedoch konnte in der vorliegenden Arbeit festgestellt werden, dass die adipogene und osteogene Differenzierung der glutealen adulten Stamm-/ Progenitorzellen im Vergleich zu den Zellen aus dem abdominalen Fettgewebe signifikant besser war. Aus dem glutealen Fettgewebe können also Stamm-/ Progenitorzellen mit einem höheren Differenzierungspotential gewonnen werden. Falls für zukünftige regenerative Strategien im Bereich Knochen- und / oder Fettgewebeersatz Stamm-/ Progenitorzellen aus Fettgewebe eingesetzt werden, sollte daher das gluteale Fettgewebedepot als Zellquelle gewählt werden. Im Rahmen der Promotionsarbeit wurde desweiteren deutlich, dass die Isolation *via*

Plastikadhärenz zu einer relativ heterogenen mesenchymalen Stromazellpopulation führt. Einer der zukünftigen Herausforderungen der adulten Stammzellforschung ist damit die Identifikation eines mesenchymalen Stammzellmarkers, der eine eindeutige Selektion von definierten Stammzellen ermöglichen würde.

**6 Literaturverzeichnis**

**Abate**, N.; Burns, D.; Peshock, R.M.; Garg, A.; Grundy, S.M. Estimation of adipose tissue mass by magnetic resonance imaging: validation against dissection in human cadavers. *J. Lipid Res.* 35: 1490-1496. (1994).

**Adams**, M.; Montague, C.T.; Prins, J.B.; Holder, J.C.; Smith, S.A.; Sanders, L.; Digby, J.E.; Sewter, C.P.; Lazar, M.A.; Chatterjee, V.K.; O'Rahilly, S. Activators of peroxisome proliferator-activated receptor gamma have depot-specific effects on human preadipocyte differentiation. *J. Clin. Invest.* 100: 3149-3153. (1997).

**Afzelius**, BA. Brown adipose tissue: its gross anatomy, histology and cytology. Lindberg O, editor. *Brown adipose tissue*. Elsevier: 1-31. (1970).

**Ahima**, R.S. Adipose tissue as an endocrine organ. *Obesity*. (Silver Spring) 14 Suppl. 5: 242-249. (2006)

**Ahima**, R. S. and Osei, S. Y.. Adipokines in obesity. *Front. Horm. Res.* 36:182-197. (2008)

**Ailhaud**, G. Adipose tissue as an endocrine organ. *Int. J. Obes. Relat Metab. Disord.* 24: 1-3. (2000).

**Aksu**, A.E.; Rubin, J.P.; Dudas, J.R.; Marra, K.G. Role of gender and anatomical region on induction of osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. *Ann. Plast. Surg.* 60: 306-322. (2008).

**Alvarez**, P. D.; Garcia-Arranz, M.; Georgiev-Hristov, T.; Garcia-Olmo, D. A new bronchoscopic treatment of tracheomediastinal fistula using autologous adipose-derived stem cells. *Thorax* 63: 374-376. (2008).

**Arner**, P. Differences in lipolysis between human subcutaneous and omental adipose tissues. *Ann. Med.* 27: 435-438. (1995).

**Ashjian**, P.H.; Elbarbary, A.S.; Edmonds, B.; DeUgarte, D.; Zhu, M.; Zuk, P.A.; Lorenz, H.P.; Benhaim, P.; Hedrick, M.H. In vitro differentiation of human processed lipoaspirate cells into early neural progenitors. *Plast. Reconstr. Surg.* 111: 1922-1931. (2003).

**Aubin**, J.E. Advances in the osteoblast lineage. *Biochem. Cell Biol.* 76: 899-910. (1998).

- Aubin**, J.E. and Heersche, J. N.M.. Osteoblastic Cell Lineage. In: M. Noda. Cellular and Molecular Biology of Bone. ed. San Diego: Academic Press. 1-29. (1993)
- Aust**, L.; Devlin, B.; Foster, S.J.; Halvorsen, Y.D.; Hicok, K.; du, Laney T.; Sen, A.; Willingmyre, G.D.; Gimble, J.M. Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. *Cytotherapy*. 6: 7 -14. (2004).
- Avram** , A.S.; Avram, M.M.; James, W.D. Subcutaneous fat in normal and diseased states: 2. Anatomy and physiology of white and brown adipose tissue. *J. Am. Acad. Dermatol*. 53: 671-683. (2005).
- Bacigalupo**, A.; Tong, J.; Podesta, M.; Piaggio, G.; Figari, O.; Colombo, P.; Sogno, G.; Tedone, E.; Moro, F.; Van Lint, M.T. Bone marrow harvest for marrow transplantation: effect of multiple small (2 ml) or large (20 ml) aspirates. *Bone Marrow Transplant* 9: 467-470. (1992).
- Baxa**, C. A.; Sha, R. S.; Buelt, M. K.; Smith, A. J.; Matarese, V.; Chinander, L.L.; Boundy, K.L.; Bernlohr, D.A. Human adipocyte lipid-binding protein: purification of the protein and cloning of its complementary DNA. *Biochemistry* 28: 8683–8690. (1989).
- Bianco**, P.and Robey, P.G. Stem cells in tissue engineering. *Nature* 414: 118-121. (2001).
- Björntorp**, P. Obesity: a chronic disease with alarming prevalence and consequences. *J. Intern. Med*. 244: 267- 269. (1998).
- Brzoska**, M.; Geiger, H.; Gauer, S.; Baer, P. Epithelial differentiation of human adipose tissue-derived adult stem cells. *Biochem. Biophys. Res Commun*. 330: 142 -50. (2005).
- Bunnell**, B.A.; Flaat, M.; Gagliardi, C.; Patel, B.; Ripoll, C. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods* 45:115-20. (2008).
- Butler**, W.T. The nature and significance of osteopontin. *Connect Tissue Res*. 23:123-136. (1989).
- Cannon**, B. and Nedergaard, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol. Rev*.84: 277-359. (2004).

- Campagnoli, C.;** Roberts, I.A.; Kumar, S.; Bennett, P.R.; Bellantuono, I.; Fisk, N.M.. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* 98: 2396- 2402. (2001)
- Cao, Y.;** Sun, Z.; Liao, L.; Meng, Y.; Han, Q.; Zhao, R.C. Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 332: 370 – 379. (2005).
- Caplan, A.I.** Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* 9: 641-650. (1991).
- Colter, D.C.;** Class, R.; DiGirolamo, C.M.; Prockop, D.J. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:3213 -3218. (2001).
- De Bari, C.;** Dell'Accio, F.; Tylzanowski, P.; Luyten, F.P. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum.* 44: 1928-1942.
- Deng, Z.L.;** Sharff, K.A.; Tang, N.; Song, W. X.; Luo, J.; Luo, X.; Chen, J.; Bennett, E.; Reid, R.; Manning, D.; Xue, A.; Montag, A.G.; Luu, H.H.; Haydon, R.C.; He, T.C. (2008). Regulation of osteogenic differentiation during skeletal development. *Front Biosci* 13: 2001-2021. (2001).
- De Ugarte, D.A.;** Morizono, K.; Elbarbary, A.; Alfonso, Z.; Zuk, P.A.; Zhu, M.; Dragoo, J.L.; Ashjian, P.; Thomas, B.; Benhaim, P.; Chen, I.; Fraser, J.; Hedrick, M.H. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs* 174: 101-109. (2003).
- Dicker, A.;** Le Blanc, K.; Astrom, G.; van Harmelen, V.; Gotherstrom, C.; Blomqvist, L.; Arner, P.; Ryden, M. Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue. *Exp. Cell Res.* 308: 283-290. (2005).
- Dominici, M.;** Le Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F.; Krause, D.; Deans, R.; Keating, A.; Prockop, D.J.; Horwitz, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8: 315-317. (2006).
- Dragoo, J.L.;** Carlson, G.; McCormick, F.; Khan-Farooqi, H.; Zhu, M.; Zuk, P.A.; Benhaim, P. Healing full-thickness cartilage defects using adipose-derived stem cells. *Tissue Eng.* 13: 1615- 1621. (2007).

- Erices**, A.; Conget, P.; Minguell, J.J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br. J. Haematol.* 109: 235-242. (2000).
- Fain**, J.N.; Madan, A.K.; Hiler, M.L.; Cheema, P.; Bahouth, S.W. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* 145: 2273-2282. (2004).
- Fan**, C.G.; Tang, F.W.; Zhang, Q.J.; Lu, S.H.; Liu, H.Y.; Zhao, Z.M.; Liu, B.; Han, Z.B.; Han, Z.C. Characterization and neural differentiation of fetal lung mesenchymal stem cells. *Cell Transplant* 14: 311-321. (2005).
- Fantuzzi**, G.; Mazzone, T. Adipose tissue and atherosclerosis: exploring the connection. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27: 996-1003. (2007).
- Farooqi**, I.S. Leptin and the onset of puberty: insights from rodent and human genetics. *Semin. Reprod. Med.* 20: 139-144. (2002).
- Fedde**, K.N.; Lane, C.C.; Whyte, M.P. Alkaline phosphatase is an ectoenzyme that acts on micromolar concentrations of natural substrates at physiologic pH in human osteosarcoma (SAOS-2) cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 264: 400-409. (1988).
- Fischer-Posovszky**, P.; Wabitsch, M.; Hochberg, Z. Endocrinology of adipose tissue - an update. *Horm. Metab. Res.* 39: 314-21. (2007).
- Franceschi**, R.T. Biological approaches to bone regeneration by gene therapy. *J. Dent. Res.* 84:1093–1103. (2005).
- Friedenstein**, A. J.; Petrakova, K. V.; Kurolesova, A. I.; Frolova, G. P. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 6: 230-247. (1968).
- Friedman**, M.S.; Long, M.W.; Hankenson, K.D. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells is regulated by bone morphogenetic protein-6. *J. Cell Biochem.* 98:538–554. (2006).
- Frühbeck**, G. Overview of Adipose Tissue and Its Role in Obesity and Metabolic Disorders. *Methods. Mol. Bio.* 456: 1-22. (2008).

- Gao, Y.;** Jheon, A.; Nourkeyhani, H.; Kobayashi, H., Ganss, B. Molecular cloning, structure, expression, and chromosomal localization of the human Osterix (SP7) gene. *Gene* 341: 101- 110. (2004).
- Garcia-Olmo, D.;** Garcia-Arranz, M.; Herreros, D.; Pascual, I.; Peiro, C.; Rodriguez-Montes, J.A. A phase I clinical trial of the treatment of Crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation. *Dis. Colon Rectum* 48: 1416-1423. (2005).
- Gimble, J. M.;** Katz, A. J.; Bunnell, B. A. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ. Res.* 100: 1249-1260. (2007).
- Gregoire, F.M.;** Smas, C.M.; Sul, H.S. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol. Rev.* 78: 783-809. (1998).
- Gronthos, S.;** Mankani, M.; Brahimi, J.; Robey, P.G.; Shi, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 13625-13630. (2000).
- Gronthos, S.;** Franklin, D.M.; Leddy, H.A.; Robey, P.G.; Storms, R.W.; Gimble, J.M. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J. Cell Physiol.* 189: 54-63. (2001).
- Guerre-Millo M.** Adipose tissue and adipokines: for better or worse. *Diabetes Metab.* 30:13-19. (2004).
- Gustafson, B. and Smith, U.** Cytokines promote Wnt signaling and inflammation and impair the normal differentiation and lipid accumulation in 3T3-L1 preadipocytes. *J. Biol. Chem.* 281: 9507-9516. (2006).
- Hauner, H. and Entenmann, G.** Regional variation of adipose differentiation in cultured stromal-vascular cells from the abdominal and femoral adipose tissue of obese women. *Int. J. Obes.* 15: 121-126. (1991).
- Hauschka, P. V., Lian, J.B., Cole, D. E., Grundberg, C. M.** Osteocalcin und matrix Gla protein: Vitamin K-depentent proteins in bone. *Physiol. Rev.* 69: 990. (1989).
- Haynesworth, S.E.;** Goshima, J.; Goldberg, V.M.; Caplan, A.I. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone* 13: 81-88. (1992).

**Housman**, T. S.; Lawrence, N.; Mellen, B. G.; George, M. N.; Filippo, J. S.; Cervený, K. A.; De Marco, M.; Feldman, S. R.; Fleischer, A. B. The safety of liposuction: results of a national survey. *Dermatol. Surg.* 28: 971-978. (2002).

**In 't Anker**, P.S.; Scherjon, S.A.; Kleijburg-van der Keur, C.; Noort, W.A.; Claas, F.H.; Willemze, R.; Fibbe, W.E.; Kanhai, H.H. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood* 4: 1548-1549. (2003).

**Izadpanah**, R.; Joswig, T.; Tsien, F.; Dufour, J.; Kirijan, J.C.; Bunnell, B.A. Characterization of multipotent mesenchymal stem cells from the bone marrow of rhesus macaques. *Stem Cells Dev.* 14: 440 -451. (2005).

**Izadpanah**, R.; Trygg, C.; Patel, B.; Kriedt, C.; Dufour, J.; Gimble, J.M.; Bunnell, B.A. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *J. Cell Biochem.* 99: 1285- 1297. (2006).

**Jiang**, Y.; Jahagirdar, B.N.; Reinhardt, R.L.; Schwartz, R.E.; Keene, C-D.; Ortiz-Gonzalez, X.R.; Reyes, M.; Lenvik, T.; Lund, T.; Blackstad, M.; Du. J.; Aldrich, S.; Lisberg, A.; Low, W.C.; Largaespada, D.A.; Verfaillie, C.M. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418:41-49. (2002).

**Jurgens**, W.J.; Oedayrajsingh-Varma, M. J.; Helder, M. N.; Zandiehoulabi, B.; Schouten, T.E.; Kuik, D. J.; Ritt, M. J.; van Milligen, F. J. Effect of tissue-harvesting site on yield of stem cells derived from adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Cell Tissue Res.* 3: 415- 426. (2008).

**Kahn**, H.S.; Austin, H.; Williamson, D.F.; Arsensberg, D. Simple anthropometric indices associated with ischemic heart disease. *J. Clin. Epidemiol.* 49: 1017- 1024. (1996).

**Keating**, A. Mesenchymal stromal cells. *Curr Opin Hematol.* 13: 419-425. (2006).

**Kern**, S.; Eichler, H.; Stoeve, J.; Kluter, H.; Bieback, K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells.* 24: 1294-1301. (2006).

**Kershaw**, E.E.; Flier, J.S. Adipose tissue as an endocrine organ. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89: 2548-2556. (2004).



- Kiel**, M. J. and Morrison, S. J. Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. *Nat. Rev. Immunol.* 8: 290- 301. (2008).
- Kiess**, W.; Petzold, S.; Topfer, M.; Garten, A.; Bluher, S.; Kapellen, T.; Korner, A.; Kratzsch, J. Adipocytes and adipose tissue. *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 22: 135- 153. (2008).
- Kim**, Y.; Kim, H.; Cho, H.; Bae, Y.; Suh, K.; Jung, J. Direct comparison of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissues and bone marrow in mediating neovascularization in response to vascular ischemia. *Cell Physiol Biochem.* 20: 867-876. (2007).
- Klein**, J.; Fasshauer, M.; Klein, H. H.; Benito, M.; Kahn, C. R. Novel adipocyte lines from brown fat: a model system for the study of differentiation, energy metabolism, and insulin action. *Bioessays* 24: 382-388. (2002).
- Kramer**, J.; Bohrsen, F.; Lindner, U.; Behrens, P.; Schlenke, P.; Rohwedel, J. In vivo matrix-guided human mesenchymal stem cells. *Cell Mol.Life Sci.* 63: 616-626. (2006).
- Krampera**, M.; Marconi, S.; Pasini, A.; Galiè, M.; Rigotti, G.; Mosna, F.; Tinelli, M.; Lovato, L.; Anghileri, E.; Andreini, A.; Pizzolo, G.; Sbarbati, A.; Bonetti, B. Induction of neurallike differentiation in human mesenchymal stem cells derived from bone, fat, spleen and thymus. *Bone* 40: 382 -390.
- Lee**, C.Y.; Liu, X.; Hsu, H.C.; Wang, D.Y.; Luo, Z.P. (2005). A modified cell culture method for autologous chondrocyte transplantation. *Connect.Tissue Res.* 46: 93-99. (2007).
- Lendeckel**, S.; Jodicke, A.; Christophis, P.; Heidinger, K.; Wolff, J.; Fraser, J.K.; Hedrick, M.H.; Berthold, L.; Howaldt, H.P. Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report. *J. Craniomaxillofac. Surg.* 32: 370-373. (2007).
- Lian**, J. B. and Stein, G. B. Runx2/Cbfa1: a multifunctional regulator of bone formation. *Curr. Pharm. Des.* 9: 2677- 2685. (2003).

- Lin, G.;** Garcia, M.; Ning, H.; Banie, L.; Guo, Y.L.; Lue, T.F.; Lin, C.S. Defining Stem and Progenitor Cells within Adipose Tissue. *Stem cells and Development* 17: 1053- 1064. (2008).
- Löffler, P.** Stoffwechsel der Lipide. In: *Biochemie und Pathobiochemie*. Berlin-Heidelberg. 5: 425-482. (1997).
- Martínez-Estrada, O.M.;** Muñoz-Santos, Y.; Julve, J.; Reina, M.; Vilaró, S. Human adipose tissue as a source of Flk-1+ cells: new method of differentiation and expansion. *Cardiovasc Res* 65: 328 – 333. (2005)
- Meliga E.,;** Strem B.M.; Duckers, H.J.; Serruys, P.W. Adipose-derived stem cells. *Cell Transplant.* 16:963-70. (2007).
- Minguell, J.J.;** Erices, A.; Conget, P. Mesenchymal stem cells. *Exp.Biol.Med.* (Maywood) 226: 507-520. (2001).
- Miranville, A.;** Heeschen, C.; Sengenes, C.; Curat, C.A.; Busse, R.; Bouloumie, A. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation* 110: 349-355. (2004).
- Mitchell, J. B.;** McIntosh, K.; Zvonic, S.; Garrett, S.; Floyd, Z.E.; Kloster, A.; Di Halvorsen, Y.; Storms, R. W.; Goh, B.; Kilroy, G.; Wu, X.; Gimble, J. M. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers: *Stem Cells* 24: 376- 385. (2006).
- Mizuno, H.** Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review. *J. Nippon Med. Sch.* 76: 56- 66. (2009).
- Mizuno, H.;** Zuk, P.A.; Zhu, M.; Lorenz, H.P.; Benhaim, P.; Hedrick, M.H. Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells. *Plast. Reconstr. Surg.* 109: 199-209. (2002).
- Moon, M.H.;** Kim, S.Y.; Kim, Y.J.; Kim, S.J.; Lee, J.B.; Bae, Y.C.; Sung, S.M.; Jung, J.S. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve postnatal neovascularization in a mouse model of hindlimb ischemia. *Cell Physiol Biochem.* 17: 279-290. (2006).
- Moseley, T.A.;** Zhu, M.; Hedrick, M.H. Adipose-derived stem and progenitor cells as fillers in plastic and reconstructive surgery. *Plast. Reconstr. Surg.* 118: 121-128. (2006).

**Mullis**, K.; Faloona, F.; Scharf, S.; Saiki, R.; Horn, G.; Erlich, H. Spezifische enzymatische amplifikation von DNA *in vitro*: die Polymerase-Kettenreaktion. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 51 Pt 1: 263-273. (1986).

**Napolitano**, L. The Differentiation of white adipose cells. An electron microscope study. J. Cell Biol. 18: 663-679. (1963).

**Niemeyer**, P.; Krause, U.; Fellenberg, J.; Kasten, P.; Seckinger, A.; Ho, A.D.; Simank, H.G. Evaluation of mineralized collagen and alpha-tricalcium phosphate as scaffolds for tissue engineering of bone using human mesenchymal stem cells. Cells Tissues Organs 177:68-78. (2004)

**Noort**, W.A.; Kruisselbrink, A.B.; in't Anker, P.S.; Kruger, M.; van Bezooijen, R.L.; de Paus, R.A.; Heemskerk, M.H.; Lowik, C.W.; Falkenburg, J.H.; Willemze, R.; Fibbe, W.E. Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34 (+) cells in NOD/SCID mice. Exp. Hematol. 30: 870-878. (2002).

**Oedayrajsingh-Varma**, M.J.; van Ham, S.M.; Knippenberg, M.; Helder, M.N.; Klein-Nulend, J.; Schouten, T.E.; Ritt, M.J.; van Milligen, F.J. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. Cytotherapy 8: 166-177. (2006).

**Oswald**, J.; Boxberger, S.; Jorgensen, B.; Feldmann, S.; Ehninger, G.; Bornhauser, M.; Werner, C. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. Stem Cells 22: 377-384. (2004).

**Otto, W. R.** and Rao, J. Tomorrow's skeleton staff: mesenchymal stem cells and the repair of bone and cartilage. Cell Prolif. 37: 97-110. (2004).

**Pettersson**, P.; Van, R.; Karlsson, M.; Bjorntorp, P. Adipocyte precursor cells in obese and nonobese humans. Metabolism 34: 808-812. (1985).

**Pittenger**, M.F.; Mackay, A.M.; Beck, S.C.; Jaiswal, R.K.; Douglas, R.; Mosca, J.D.; Moorman, M.A.; Simonetti, D.W.; Craig, S.; Marshak, D.R. Multi-lineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 284: 143-147. (1999).

**Planat-Benard**, V.; Menard, C.; Andre, M.; Puceat, M.; Perez, A.; Garcia-Verdugo, J.M.; Penicaud, L.; Casteilla, L. Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. Circ. Res. 94: 223-229. (2004).

- Planat-Benard**, V.; Silvestre, J.S.; Cousin, B.; Andre, M.; Nibbelink, M.; Tamarat, R.; Clergue, M.; Manneville, C.; Saillan-Barreau, C.; Duriez, M.; Tedgui, A.; Levy, B.; Penicaud, L.; Casteilla, L. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* 109: 656-663. (2004).
- Prunet-Marcassus**, B.; Cousin, B.; Caton, D.; Andre, M.; Penicaud, L.; Casteilla, L. From heterogeneity to plasticity in adipose tissues: site-specific differences. *Exp. Cell Res.* 312: 727-736. (2006).
- Quirici**, N.; Soligo, D.; Bossolasco, P.; Servida, F.; Lumini, C.; Delilieri, G.L. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Exp. Hematol.* 30: 783- 791. (2002).
- Quirici**, N.; Soligo, D.; Caneva, L.; Servida, F.; Bossolasco, P.; Delilieri, G. L. Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133 (+) cells. *Br. J. Haematol.* 115: 186- 194. (2001).
- Rehman**, J.; Traktuev, D.; Li, J.; Merfeld-Clauss, S.; Temm-Grove, C.J.; Bovenkerk, J.E.; Pell, C.L.; Johnstone, B.H.; Considine, R.V.; March, K.L. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* 109: 1292-1298. (2004).
- Rodan** , G.A. and Rodan, S.B. Expression of the osteoblastic phenotype. *Bone and Mineral Research* 2: 244-285. (1984).
- Rodriguez**, A.M.; Elabd, C.; Delteil, F.; Astier, J.; Vernochet, C.; Saint-Marc, P.; Guesnet, J.; Guezennec, A.; Amri, E.Z.; Dani, C.; Ailhaud, G. Adipocyte differentiation of multipotent cells established from human adipose tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315: 255- 263. (2004).
- Rodriguez**, L.V.; Alfonso, Z.; Zhang, R.; Leung, J.; Wu, B.; Ignarro, L.J. Clonogenic multipotent stem cells in human adipose tissue differentiate into functional smooth muscle cells. *Proc. Natl. Acad.Sci. U.S.A.* 103: 12167-12172. (2006).
- Romeis**, B. In *Mikroskopische Technik* (Ed.: P. Böck), S. 455- 426 und S. 443-444, Urban und Schwarzenberg, München. (1989).

- Roncari**, D.A.; Lau, D.C.; Kindler, S. Exaggerated replication in culture of adipocyte precursors from massively obese persons. *Metabolism*.30:425-427. (1981).
- Ronti**, T.; Lupattelli, G.; Mannarino, E. The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clin. Endocrinol.* 64: 355-365. (2006).
- Rosen**, E.D. and MacDougald, O.A. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7:885-896. (2006).
- Safford**, K.M.; Hicok, K.C.; Safford, S.D.; Halvorsen, Y.D.; Wilkison, W.O.; Gimble, J.M.; Rice, H.E. Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294: 371-379. (2002).
- Safford**, K.M. and Rice, H.E. Stem cell therapy for neurologic disorders: therapeutic potential of adipose-derived stem cells. *Curr. Drug Targets* 6: 57-62. (2005).
- Saiki**, R.K.; Bugawan, T.L.; Horn, G.T.; Mullis, K.B.; Ehrlich, H.A. Analysis of enzymatically amplified beta-globulin and HLA-DQ alpha cDNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 324: 163- 166. (1986).
- Schaffler**, A. and Buchler, C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells* 25: 818- 827. (2007).
- Scherer**, P.E. Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. *Diabetes* 55: 1537-1545. (2006).
- Schipper**, B.M.; Marra, K.G.; Zhang, W.; Donnenberg, A.D.; Rubin, J.P. Regional anatomic and age effects on cell function of human adipose-derived stem cells. *Ann. Plast. Surg.* 60: 538-544. (2008).
- Sell**, H.; Deshaies, Y.; Richard, D. The brown adipocyte: update on its metabolic role. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36:2098-2104. (2004).
- Sen**, A.; Lea-Currie, Y.R.; Sujkowska, D.; Franklin, D.M.; Wilkison, W.O.; Halvorsen, Y.D.; Gimble, J.M. Adipogenic potential of human adipose derived stromal cells from multiple donors is heterogeneous. *J. Cell Biochem.* 81: 312-319. (2001).

**Sengenès**, C.; Lolmede, K.; Zakaroff-Girard, A.; Busse, R.; Bouloumie, A. Preadipocytes in the human subcutaneous adipose tissue display distinct features from the adult mesenchymal and hematopoietic stem cells. *J. Cell Physiol.* 205: 114-122. (2005).

**Seo**, M.J.; Suh, S.Y.; Bae, Y.C.; Jung, J.S. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res. Commun.* 328:258 – 64. (2005).

**Smith**, P.; Adams, W.P., Jr.; Lipschitz, A.H.; Chau, B.; Sorokin, E.; Rohrich, R.J.; Brown, S.A. Autologous human fat grafting: effect of harvesting and preparation techniques on adipocyte graft survival. *Plast. Reconstr. Surg.* 117: 1836-1844. (2006).

**Smith**, S.R.; Lovejoy, J.C.; Greenway, F.; Ryan, D.; de Jonge, L.; de la Bretonne J.; Volafava, J.; Bray, G.A. Contributions of total body fat, abdominal subcutaneous adipose tissue compartments, and visceral adipose tissue to the metabolic complications of obesity. *Metabolism* 50: 425-435. (2001).

Statistisches Bundesamt:

<http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Content/Statistiken/Gesundheit/Todesursachen/Aktuell.psml> (Tag des Zugriffs: 07.01.2009).

**Steedman**, H.F. Alcianblue 8GS: a new stain für mucin. *Quart. J. micr. Sci.* 91: 477- 479. (1950).

**Stein**, G.S.; Lian, J.B.; Stein, J.L.; van Wijnen, A.J.; Montecino, M. Transcriptional control of osteoblast growth and differentiation. *Physiol. Rev.* 76: 593-629. (1996).

**Strem**, B.M.; Hicok, K.C.; Zhu, M.; Wulur, I.; Alfonso, Z.; Schreiber, R.E.; Fraser, J.K.; Hedrick, M.H. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J. Med.* 54: 132-141. (2005).

**Talens-Visconti**, R.; Bonora, A.; Jover, R.; Mirabet, V.; Carbonell, F.; Castell, J.V.; Gomez- Lechon, M.J. Hepatogenic differentiation of human mesenchymal stem cells from adipose tissue in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *World J. Gastroenterol.* 12: 5834-5845. (2006).

**Tan**, G.D.; Goossens, G.H.; Humphreys, S.M.; Vidal, H.; Karpe, F. Upper and lower body adipose tissue function: a direct comparison of fat mobilization in humans. *Obes. Res.* 11: 114- 118. (2004).

- Tapp**, H.; Hanley Jr.; E.N.; Patt, J.C.; Gruber, H.E. Adipose-Derived Stem Cells: Charakterization and Current Applcation in Orthopedics Tissue Repair. *Exp.Biol.Med.* (Maywood) 234: 1-9. (2009).
- Thiele**, D. (1991). The polymerase chain reaction and its possible applications. *Immun. Infekt.* 19: 138- 142.
- Tontonoz**, P. and Spiegelman, B. M. Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annu. Rev. Biochem.* 77: 289- 312. (2008).
- Van Harmelen**, V; Rohrig, K.; Hauner, H. Comparison of proliferation and differentiation capacity of human adipocyte precursor cells from the omental and subcutaneous adipose tissue depot of obese subjects. *Metabolism* 53: 632-637. (2004).
- Von Kossa**, J. Über die im Organismus künstlich erzeugbaren Verkalkungen. *Ziegler`s Beitr. Path. Anat.* 29: 163- 202. (1901).
- Vazquez-Vela**, M.E.; Torres,N.; Tovar,A.R. White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. *Arch. Med. Res.* 39: 715-128. (2008).
- Waki**, H. and Tontonoz, P. Endocrine functions of adipose tissue. *Annu. Rev. Pathol.* 2: 31-56. (2007).
- Wagner**, W. and Ho, A.D. Mesenchymal stem cell preparations-comparing apples and oranges. *Stem Cell Rev.* 3: 239-248. (2007).
- Wagner**, W.; Wein, F.; Seckinger, A.; Frankhauser, M.; Wirkner, U.; Krause, U.; Blake, J.; Schwager, C.; Eckstein, V.; Ansorge, W.; Ho, A.D. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp. Hematol.* 33: 1402-1416. (2005).
- Williams**, J.T.; Southerland, S.S.; Souza,J.; Calcutt, A.F.; Cartledge, R.G. Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes. *Am. Surg.* 65: 22-26. (1999).
- Wulf**, G.G.; Chapuy, B.; Trumper, L. [Mesenchymal stem cells from bone marrow. Phenotype, aspects of biology, and clinical perspectives]. *Med. Klin.* (Munich). 101: 408-413. (2006).

- Yamamoto**, N.; Akamatsu, H.; Hasegawa, S.; Yamada, T.; Nakata, S.; Ohkuma, M.; Miyachi, E.; Marunouchi, T.; Matsunaga, K. Isolation of multipotent stem cells from mouse adipose tissue. *J. Dermatol. Sci.* 48: 43-52. (2007).
- Yoshimura**, K.; Suga, H.; Eto, H. Adipose-derived stem/progenitor cells: roles in adipose tissue remodeling and potential use for soft tissue augmentation. *Regen.Med.* 4: 265- 273. (2009).
- Yoshimura**, K.; Sato, K.; Aoi, N.; Kurita, M.; Hirohi, T.; Harii, K. Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: supportive use of adipose-derived stem/stromal cells. *Aesthetic Plast.Surg.* 32. 48- 55. (2008).
- Yoshimura**, K.; Sato, K.; Aoi, N.; Kurita,M.; Inoue, K.; Suga, H.; Eto, H.; Kato, H.; Hirohi, T.; Harii, K. Cell-assisted lipotransfer for facial lipoatrophy: efficacy of clinical use of adipose-derived stem cells. *Dermatol.Surg.* 34: 1178- 1185. (2008).
- Zhang**, H.; Hu, G.; Wang, H.; Sciavolino, P.; Iler, N.; Shen, M.M.; Abate-Shen, C. Heterodimerization of Msx and Dlx homeoproteins results in functional antagonism. *Mol. Cell. Biol.* 17: 2920- 2932. (1997).
- Zhu**, H.; Mitsuhashi, N.; Klein, A.; Barsky, L.W.; Weinberg, K.; Barr, M.L.; Demetriou, A.; Wu, G.D. The role of the hyaluronan receptor CD44 in mesenchymal stem cell migration in the extracellular matrix. *Stem Cells* 24: 928-935. (2006).
- Zuk**, P.A Tissue engineering craniofacial defects with adult stem cells? Are we ready yet? *Pediatr.Res.* 63: 478- 486. (2008).
- Zuk**, P.A.; Zhu, M.; Mizuno, H.; Huang,J.; Futrell, J.W.; Katz, A.J.; Benhaim, P.; Lorenz, H.P.; Hedrick, M.H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 7: 211-228. (2001).
- Zuk**, P.A.; Zhu, M.; Ashjian, P.; De Ugarte, D.A.; Huang, J.I.; Mizuno, H.; Alfonso, .C.; Fraser, J.K.; Benhaim, P.; Hedrick, M.H.. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell.* 13: 4279-4295. (2002)
- Zylka-Menhorn**, V. Prospektive Langzeitstudie: Körperfettverteilung beeinflusst die Mortalität. *Deutsches Ärzteblatt.* Jg. 105. Heft 48: A-2570 / B-2182 / C-2101. (2008).



**Danksagung**

Zum Abschluss möchte ich allen herzlich danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. Jan Kramer für die Vergabe dieser spannenden und Themen übergreifenden Doktorarbeit, für seine enorme Geduld, für die Korrektur dieser Arbeit und für die ständige Gesprächsbereitschaft. Darüber hinaus danke ich Herrn PD Dr. Jan Kramer, Prof. Dr. Jürgen Rohwedel und Prof. Dr. nat. Norbert Tautz für die Möglichkeit im Institut für Virologie und Zellbiologie mitarbeiten zu dürfen. Mein Dank gilt auch Prof. Dr. H. Lehnert, dem Direktor der Medizinischen Klinik I, für die Möglichkeit in seiner Klinik forschen zu dürfen. Insbesondere danke ich Herrn Prof. Dr. Johannes Klein für die Unterstützung bei dem klinischen Teil dieser Promotionsarbeit.

Außerdem danke ich allen Mitarbeiter der AG Klein, besonders Dr. Alexander Iwen, Britta Meier, Maren Drenkhan, Dirk Hadaschik und Dr. Nina Perwitz für die Unterstützung beim klinischen Teil dieser Doktorarbeit. Für das geduldige Einarbeiten, für die nette Arbeitsatmosphäre und die ständige Bereitschaft des Beantwortens meiner Fragen während des experimentellen Teils bedanke ich mich bei allen Mitarbeiter der interdisziplinären AG Stammzellbiologie (Kramer/Rohwedel) der Medizinischen Klinik I und des Instituts für Virologie und Zellbiologie: Barbara Andresen, Alexandra Eirich und Dr. Uli Lindner.

Darüber hinaus gilt mein Dank Dr. Werner Eisenbeiss für die Durchführung der Biopsieentnahme und für die Unterstützung bei den Nachuntersuchungen, Dr. Christian Rose für die histologische Untersuchung der Fettgewebeproben sowie der Beiersdorf AG Hamburg, besonders Dr. Andreas Schepky und Marc Winnefeld, für die finanzielle Unterstützung und Kooperation bei der Durchführung der Studie.

Christina Petersen danke ich für die Durchsicht und Korrektur des Manuskripts.

Mein ganz persönlicher Dank gilt meiner Familie, vor allem meiner Mutter und meinem Bruder Henry, und Michael Priewe für die finanzielle und persönliche Unterstützung sowie für den Rückhalt, den sie mir während meines Studiums und beim Erstellen dieser Arbeit stets gegeben haben.

Vielen Dank!

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Nachname: Bohl  
Vorname: Anna-Christin  
Geburt: 04.08.1983 in Eutin  
Familienstand: ledig



### **Schulausbildung**

1990 – 1994 Grundschohule in Süsel  
1994 – 2003 Gymnasium in Eutin  
2003 **Abitur** im Sommer 2003 (Note: 1,9)

### **Hochschulstudium**

Seit Herbst 2003 **Studium der Humanmedizin** an der Medizinischen Universität zu Lübeck

Prüfungen: 2005 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note „gut“  
Frühjahr 2010: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note „gut“

Famulaturen: Anästhesie, Schön Klinik, Neustadt i.H.  
Innere Medizin, Schön Klinik, Neustadt i.H.  
Gynäkologie und Geburtshilfe, Sana Klinik, Eutin  
Angiologische Ambulanz, Universität zu Lübeck

Praktisches Jahr: **Innere Medizin:** Kantonsspital Frauenfeld, Schweiz  
**Gynäkologie und Geburtshilfe:** Sana Klinik, Eutin  
**Chirurgie:** Asklepios Klinik, Bad Oldesloe

### **Wissenschaftliche Tätigkeit:**

Oktober 2006 Beginn der Promotion: **Klinischer Teil**

März 2007 -  
Oktober 2008 **Experimenteller Teil:** „Isolation und Charakterisierung humaner Stamm-/ Progenitorzellen aus glutealem und abdominalem Fettgewebe“

**Wissenschaftliche Zusammenfassung**

Bohl, A.C., Klein, J., Lindner, U., Iwen, A., Rose, C., Eisenbeiss, W., Winnefeld, M., Lehnert, H., Rohwedel, J., Kramer, J. Human abdominal and gluteal fat depots: the latter is better. Tissue Engineering Part A. 15(3): 675-737. (2009).

**Poster**

Bohl, A.C., Klein, J., Lindner, U., Iwen, A., Rose, C., Eisenbeiss, W., Winnefeld, M., Lehnert, H., Rohwedel, J., Kramer, J. Human abdominal and gluteal fat depots: the latter is better. 3rd Congress on Regenerative Biology and Medicine; 3rd Congress of the German Society of Stem Cell Research, Stuttgart, 09.-11. Oktober 2008.

**In Vorbereitung**

Iwen, A., Schepky, A., Bohl, A.C., Wessel, S., Kunst, F., Rose, C., Siegner, R., Max, H., Stäb, F., Wenck, H., Kramer, J., Winnefeld, M. and Klein, J. Depot-specific morphologic and functional characteristics in deep subcutaneous abdominal and gluteal human adipocytes.

**Tabelle 1 des Anhangs:** Dargestellt sind die Ergebnisse der laborchemischen Analysen der einzelnen Probandinnen (n= 14). zwm= zu wenig Material.

| Probanden-nummer | Natrium | Kalium | Calcium | Chlorid | Phosphat | Glucose mmol/l | Glucose mg/dl | Lactat | Creatinin | Harnsäure | Bilirubin | Folsäure i.S. |
|------------------|---------|--------|---------|---------|----------|----------------|---------------|--------|-----------|-----------|-----------|---------------|
| 50               | 140     | 3,65   | 2,41    | 106     | 1,28     | 4,81           | 87            | 0,65   | 67        | 150       | 15,8      | 7,9           |
| 34               | 138     | 3,88   | 2,26    | 110     | 1,08     | 5,34           | 96            | 1,19   | 68        | 205       | 12,3      | 13,4          |
| 41               | 139     | 3,74   | 2,26    | 108     | 0,94     | 5,2            | 94            | 0,51   | 61        | 187       | 9,8       | zwm           |
| 5                | 138     | 3,71   | zwm     | 105     | 0,91     | 5,57           | 100           | 1,3    | 62        | 140       | 6         | 16            |
| 18               | 139     | 3,74   | 2,33    | 107     | 1,02     | 5,13           | 92            | 1,66   | 80        | 207       | 12,4      | 15,6          |
| 27               | 140     | 3,77   | 2,3     | 107     | 1,3      | 5,15           | 93            | 1,02   | 76        | 273       | 5,5       | 9             |
| 35               | 140     | 4,25   | 2,27    | 109     | 1,2      | 5,38           | 97            | 1,16   | 52        | 245       | 7         | 9,8           |
| 16               | 137     | 3,48   | 2,26    | 105     | 0,82     | 4,87           | 88            | 1,72   | 62        | 259       | 8         | 15,9          |
| 17               | 135     | 3,39   | 2,29    | 105     | 0,97     | 5,91           | 106           | 1,31   | 65        | 160       | 16,5      | 13,4          |
| 22               | 139     | 3,51   | 2,38    | 103     | 1,26     | 4,67           | 84            | 0,91   | 72        | 186       | 10,1      | 12,1          |
| 45               | 138     | 3,66   | 2,25    | 104     | 1,09     | 4,5            | 81            | 0,86   | 69        | 261       | 13,6      | 13,3          |
| 23               | 138     | 3,61   | 2,33    | 104     | 1,09     | 5,17           | 93            | 0,8    | 78        | 221       | 13,5      | 7             |
| 26               | 137     | 3,61   | 2,39    | 103     | 1,19     | 5,38           | 97            | 0,58   | 61        | 215       | 9,3       | 6,9           |
| 10               | 139     | 3,83   | 2,39    | 105     | 1,21     | 5,16           | 93            | 0,98   | 66        | 76        | zwm       | 10,8          |

**Tabelle 2 des Anhangs:** Dargestellt sind die Ergebnisse der laborchemischen Analysen der einzelnen Probandinnen (n= 14). zwm= zu wenig Material.

| Probanden-nummer | Vit B12 i.S. | Cholesterin | HDL-Ch. | LDL-Ch. | TAG  | Albumin i.P. | Ferritin i.S. | CRP | ASAT | ALAT | γ GT | Hb A1c i.BI |
|------------------|--------------|-------------|---------|---------|------|--------------|---------------|-----|------|------|------|-------------|
| 50               | 0,62         | 5,68        | 2,03    | 3,27    | 1,25 | 41,1         | 40            | 2   | 20   | 15   | 10   | 5,2         |
| 34               |              | 5,11        | 1,9     | 2,92    | 0,96 | 36,7         |               | 1,6 | 20   | 16   | 16   | 5,2         |
| 41               | 0,64         | 5,25        | 1,71    | 3,22    | 0,92 | 36,7         | 38            | 1,5 | 15   | 14   | 20   | 5,7         |
| 5                | 0,6          | 4,08        | 1,48    | 2,37    | 0,41 | 39,5         | 54            | 2,7 | 18   | 12   | 11   | zwm         |
| 18               | 0,4          | 4,58        | 1,68    | 2,47    | 0,83 | 40,9         | 23            | 3,8 | 18   | 18   | 15   | 5,1         |
| 27               | 0,53         | 4,99        | 2,14    | 2,35    | 0,54 | 38,6         | 9             | 0,2 | 18   | 15   | 17   | 5,4         |
| 35               | 0,45         | 4,28        | 1,73    | 2,13    | 0,6  | 35,8         | 107           | 0,9 | 16   | 24   | 11   | 5           |
| 16               | 0,46         | 6,56        | 1,34    | 3,99    | 4    | 35,2         | 22            | 2,7 | 10   | 11   | 10   | 5,5         |
| 17               | 0,37         | 4,37        | 1,22    | 2,39    | 0,86 | 37           | 14            | 1,3 | 11   | 10   | 30   | 6,1         |
| 22               | 0,33         | 5,25        | 1,69    | 3,25    | 0,97 | 38,9         | 15            | 1,4 | 12   | 12   | 10   | 5,8         |
| 45               | 0,55         | 4,35        | 1,88    | 1,92    | 0,97 | 43,7         | 34            | 0,2 | 20   | 16   | 15   | 5,9         |
| 23               | 0,34         | 5,45        | 1,23    | 3,82    | 1    | 43           | 41            | 1,2 | 12   | 12   | 11   | 5,4         |
| 26               | 0,52         | 4,51        | 1,25    | 3       | 0,45 | 39,5         | 35            | 0,8 | 15   | 12   | 10   | 5,8         |
| 10               | 0,28         | 4,49        | 1,31    | 2,92    | 0,69 | 46,3         | 11            | 0,3 | 12   | 8    | 10   | 5,2         |

**Tabelle 3 des Anhangs:** Dargestellt sind die Ergebnisse der laborchemischen Analysen der einzelnen Probandinnen (n= 14). zwm= zu wenig Material.

| Probanden-nummer | Alk. Phosp. | LDH | Lipase | f T3 i.S. | f T4 i.S. | Insulin i.S. | C-Peptid | Cortisol ug/dl | ACTH i.P. | Renin i.Pl. | TSH i.S. | FSH i.S. |
|------------------|-------------|-----|--------|-----------|-----------|--------------|----------|----------------|-----------|-------------|----------|----------|
| 50               | 33          | 161 | 20     | 4,58      | 14,77     | 5,79         | 1,49     | 33,3           | 29,61     | zwm         | 2,58     | 0,988    |
| 34               | 40          | 143 | 12     | 4,96      | 15,39     | 5,03         | 1,3      | zwm            | 35,87     | 8,53        | 3,1      | zwm      |
| 41               | 37          | 125 | 22     | 6,93      | 29,28     | zwm          | zwm      | 26,8           | 21,94     | 4,19        | 0,029    | 6,14     |
| 5                | 70          | 132 | 36     | 4,97      | 15,7      | 6,13         | 1,49     | 18,8           | 19,88     | 8,01        | 1,57     | 5,77     |
| 18               | 56          | 129 | 17     | 5,31      | 12,87     | 4,76         | 1,04     | 30,4           | 25,39     | 7,21        | 2,58     | 2,4      |
| 27               | 51          | 182 | 22     | 4,94      | 14,87     | 4,74         | 1,36     | 25,4           | 75,3      | 5,68        | 2,04     | 4,78     |
| 35               | 54          | 105 | 24     | 4,75      | 17,04     | 6,09         | 1,61     | 25,8           | 19,45     | 3,48        | 1,47     | 7,05     |
| 16               | 39          | 130 | 22     | 5,05      | 14,38     | 15,7         | > 15     | 52,5           | 42,74     | 5,08        | 2,15     | 1,68     |
| 17               | 78          | 104 | 14     | 5,1       | 18,72     | 6,74         | 1,92     | 39,9           | 27,57     | 4,16        | 1,61     | 2,39     |
| 22               | 31          | 131 | 21     | 5,5       | 15,02     | 6,39         | 1,94     | 41,6           | 22,11     | 11,1        | 2,59     | 1,28     |
| 45               | 54          | 176 | 22     | 5,12      | 17,62     | 16,8         | 1,77     | 13,6           | 16,41     | 5,89        | 0,867    | 6,15     |
| 23               | 48          | 143 | 24     | 4,38      | 16,68     | 2,78         | 1,49     | 14,1           | 29,87     | 5,26        | 1,82     | 5,51     |
| 26               | 53          | 111 | 7      | 5,1       | 14,64     | 5,81         | 1,65     | 13,1           | 21,65     | 19,4        | 2,45     | 6,87     |
| 10               | 40          | 137 | 16     | 3,97      | 11,39     | 4,69         | 1,28     | 14,1           | 15,81     | 7,1         | 2,86     | 10,53    |

**Tabelle 4 des Anhangs:** Dargestellt sind die Ergebnisse der laborchemischen Analysen der einzelnen Probandinnen (n= 14). zwm= zu wenig Material.

| Probanden-nummer | Aldosteron i.S. | LH i.S. | Östra-diol i.S. | Proges-teron i.S. | Testos-tron i.S. | DHEAS i.S. | SHBG i.S. | Albumin i.U. | Leptin | Adipo-nectin | IL 6   | TNF alpha |
|------------------|-----------------|---------|-----------------|-------------------|------------------|------------|-----------|--------------|--------|--------------|--------|-----------|
| 50               |                 | 0,1     | 8,53            | 0,952             | 0,251            | 1,27       | 1,68      | 10,4         | 6,97   | 9,23         | < 2,00 | 4         |
| 34               | 142             | 8,73    | 10,86           | 0,281             | 0,172            | zwm        | zwm       | 10,4         | 22,5   | 9,09         | < 2,00 | 7,1       |
| 41               | 276             | 8,28    | 71,28           | 0,376             | 0,315            | 1,09       | 267,9     | 12,6         | 6,76   | 10,7         | < 2,00 | 6,2       |
| 5                | 70,3            | 12,48   | 195,2           | 0,393             | 0,176            | 1,04       | 76,41     | 10,4         | 21,7   | 9,98         | < 2,00 | 7         |
| 18               | 137             | 2,19    | 14,39           | 0,818             | 0,709            | 3,89       | 165,2     | 10,4         | 8,12   | 6,07         | < 2,00 | 4,7       |
| 27               | 120             | 3,52    | 117,6           | 1,11              | 0,503            | 3,17       | 50,42     | 10,5         | 14,6   | 8,98         | < 2,00 | 4         |
| 35               | 127             | 6,68    | 89,56           | 0,354             | 0,321            | 1,29       | 185,1     | 10,4         | 7,36   | 9,21         | < 2,00 | 7,2       |
| 16               | 195             | 0,623   | 11,33           | 0,77              | 0,338            | 2,57       | 282,3     | 14,4         | 17,3   | 6,52         | < 2,00 | 5,4       |
| 17               | 140             | 4,37    | 178,5           | 0,969             | 0,457            | 2,66       | 58,5      | 2            | 9,09   | 5,93         | < 2,00 | 6         |
| 22               | 132             | 0,934   | 12,8            | 0,552             | 0,283            | 2,13       | 191,6     | 117          | 10,3   | 4,31         | < 2,00 | 8,9       |
| 45               | 71,1            | 11,08   | 38,7            | 0,642             | 0,402            | 3,82       | 47,49     | 4,12         | 3,62   | 17,8         | < 2,00 | 6,2       |
| 23               | 153             | 8,77    | 49,11           | 0,477             | 0,324            | 1,68       | 72,33     | 6,13         | 8,91   | 13,4         | < 2,00 | 4,6       |
| 26               | 104             | 23,52   | 373,8           | 0,384             | 0,42             | 1,49       | 98        | 13,1         | 4,78   | 6,43         | < 2,00 | 4         |
| 10               | 232             | 8,35    | 37              | 0,508             | 0,365            | 1,83       | 35,92     | 9,06         | 7,19   | 2,59         | < 2,00 | 10,7      |



Medizinische Klinik I • Direktor: Prof. Dr. med. H.L. Fehm

## Probandinnenaufklärung

### **Zur Studie: „Charakterisierung differenzieller Fettgewebsdepot-Funktionen bei Frauen mit und ohne gynäkoider Lipodystrophie („Zellulite““**

Vielen Dank für Ihr Interesse an unserer Studie.

Innerhalb des letzten Jahrzehnts hat sich die Sicht auf die Funktion des Fettgewebes stark gewandelt. Seit der Entdeckung von Hormonen aus Fettzellen rückt neben der seit langem bekannten Energiespeicherfunktion inzwischen die hormonelle Aktivität des Fettgewebes in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses, nicht zuletzt wegen damit z. T. bereits erfolgreich erprobter neuer Therapiemöglichkeiten. In jüngster Zeit mehren sich zudem Befunde, die ein außergewöhnliches Potenzial von Stammzellen des Unterhautfettgewebes zur Umwandlung in andere Gewebe, z. B. zur Heilung von Knochendefekten, nahe legen.

Studien legen nahe, dass unterschiedliche Fettgewebsdepots sich in ihrer Funktion erheblich unterscheiden. So ist das „viszerale“ (Bauch-)Fettgewebe mit einem erhöhten Risiko verbunden, Herz-Kreislauferkrankungen zu entwickeln. Im Gegensatz dazu scheint das „glutäale“ (Hüft-)Fettgewebe vor diesen Erkrankungen besonders zu schützen.

Ein Beispiel für eine gewebsdepot-spezifisch auftretende Veränderung bei Frauen ist die gynäkoide Lipodystrophie („Zellulite“). Sie ist eine Haut-/Unterhaut- u. Bindegewebsveränderung, die kosmetisch als störend empfunden wird, deren mögliche medizinische Bedeutung aber derzeit gänzlich unbekannt ist.

Das Ziel dieser Studie ist eine genauere Untersuchung der unterschiedlichen Funktionen des Unterhautfettgewebes am Bauch im Vergleich mit dem Unterhautfettgewebe an der Hüfte bei Frauen mit und ohne Zellulite. Damit soll die Studie dazu beitragen, ein besseres Verständnis von verursachenden bzw. schützenden Faktoren für die Entstehung bzw. Verhinderung von Stoffwechsel- und Herz-/Kreislauferkrankungen sowie Zellulite zu gewinnen, um daraus neue Therapieansätze zu entwickeln.

Die Studie wird von der Firma Beiersdorf finanziell unterstützt.

Um Ihnen eine Entscheidung über die Teilnahme an dieser Studie zu ermöglichen, werden Ihnen im Folgenden die Voraussetzungen für die Studienteilnahme und der Versuchsaufbau genau beschrieben.

## **I. Ein- und Ausschlusskriterien**

### Einschlusskriterien:

- Weibliches Geschlecht
- Alter zwischen 25 und 35 Jahren
- Keine regelmäßige Medikamenteneinnahme außer hormoneller Kontrazeption ( „Pille“)

### Ausschlusskriterien:

- Zyklusstörungen / Menopause
- Bekannte Fettstoffwechselstörungen
- Andere Lipodystrophieformen („Fettverteilungsstörung“) außer gynäkoider Lipodystrophie
- Diabetes mellitus
- Regelmäßiger Nikotinkonsum
- Übermäßiger Alkoholkonsum (nicht mehr als 20g Alkohol pro Tag; das entspricht einem Glas Wein)
- Keloidbildungstendenz ( Tendenz zu „überschießenden Narbenbildung“)
- Bekannte Allergie auf Lokalanästhetika

## **II. Zeitlicher Ablauf**

Der erste Untersuchungstermin findet in der Poliklinik für Endokrinologie der Universität zu Lübeck statt.

Es erfolgt zunächst eine genaue Aufklärung. Dann werden wir mit Ihnen eine ausführliche standardisierte Befragung und körperliche Untersuchung durchführen.

Darüber hinaus erhalten Sie ein Ernährungsprotokoll, welches eine Woche lang geführt werden muss. Hierbei ist es wichtig, dass Sie ihre üblichen Essgewohnheiten beibehalten.

Zu ihrem nächsten Termin erwarten wir Sie im *Test-Center* der Beiersdorf AG in Hamburg. Dort werden weitere Untersuchungen zur Ausprägung der gynäkoiden Lipodystrophie („Zellulite“) durchgeführt (Fotodokumentation und Zellulite-Begutachtung, Laserdoppler, Lipometrie, Impedanz-Messung).

Nach diesen beiden Untersuchungstagen wird entschieden, ob Sie für eine Gewebeentnahme in Frage kommen.

Vor dem dritten Termin in der Universität zu Lübeck bitten wir Sie, acht Stunden nichts mehr zu essen und nur noch Wasser oder andere ungesüßte Getränke zu sich zu nehmen.

Es erfolgt eine Blutentnahme zur Bestimmung bekannter Risikofaktoren für Herzkreislauf- und Stoffwechselerkrankungen.

Schließlich werden durch einen plastischen Chirurgen aus dem Bereich des Bauchnabels und der Umschlagsfalte der Gesäßhaut Gewebeproben mit Hautanhang entnommen. Hierzu wird eine lokale Betäubung durchgeführt und ein ca.10cm langer und ca.3-4cm tiefer Schnitt an der Umschlagsfalte gemacht. Der Schnitt am Bauchnabel wird entsprechend kleiner ausfallen und um den Bauchnabel herum verlaufen. Die Entnahmestelle wird danach wieder verschlossen und es wird eine kaum sichtbare Narbe verbleiben. Das Gewebe wird nach dem Eingriff insgesamt straffer sein.

Nach ca. 10 Tage wird das Nahtmaterial entfernt und es erfolgt eine abschließende Nachuntersuchung.

Die Proben werden hinsichtlich ihrer feingeweblichen Unterschiede und ihres Risikoprofils für Herzkreislauf- und Stoffwechselerkrankungen auf Zell- und Genebene untersucht. Außerdem werden wir aus einzelnen Proben Stammzellen isolieren und charakterisieren.

Nach der Übersendung des ausgefüllten Ernährungsprotokolls erhalten Sie dann eine Aufwandsentschädigung von 1000 Euro. Die nicht für die Gewebeentnahme ausgesuchten Probandinnen erhalten eine Aufwandsentschädigung von 200 Euro.

### III. Risiken der Eingriffe

Die Risiken der Blutentnahme unterscheiden sich nicht von einer Routine-Blutentnahme: Kleine Blutergüsse, Fehlpunktionen mit Verletzung von Nerven und Gefäßen (mit Bildung von größeren Blutergüssen, Venenentzündungen, ggf. Thrombosen). Bei sachgerechter Durchführung treten diese schweren Komplikationen jedoch nur sehr selten auf.

Die Entnahme der Gewebeproben wird durch einen erfahrenen Facharzt für Plastische Chirurgie durchgeführt. Bei der lokalen Betäubung kann es zu einer begrenzten Schwellung und Rötung kommen. Ebenso können allergische Reaktionen auf das lokale Betäubungsmittel vorkommen. In seltensten Fällen kann sich daraus ein allergischer Schock entwickeln, der eine stationäre Behandlung erforderlich macht. Durch die Gewebeentnahme kann es zu Blutergüssen kommen, seltener können Wundheilungsstörungen, Blutungen, Nervenschäden oder eine kosmetisch nicht zufrieden stellende Narben auftreten. Ebenso kann sich eine Infektion entwickeln, die auch in seltenen Einzelfällen in einem septischer Schock („Blutvergiftung“) enden kann.

Außerdem werden Sie in den ersten 6-12 Tagen mit Bewegungseinschränkungen rechnen müssen. Des Weiteren sollten Sie in den ersten zwei Wochen nicht baden, nicht ins Schwimmbad oder in die Sauna gehen, um Verunreinigungen und Aufweichungen zu vermeiden.

Tritt im Rahmen der Studiendurchführung ein Schaden auf, der den Studienteilnehmern durch

das schuldhafte Verhalten eines Beschäftigten des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (UK SH) zugefügt wurde, haftet die gesetzliche Haftpflicht des UK SH.

Zur weiteren Absicherung sind alle Probandinnen durch die Betriebshaftpflicht der Beiersdorf AG Hamburg versichert.

### IV. Freiwilligkeit der Teilnahme, Rücktritt, Auskunft

Die Teilnahme an dieser Studie ist freiwillig. Sie können jederzeit ohne Angabe von Gründen die Teilnahme an der Studie beenden, ohne dass Ihnen dadurch Nachteile entstehen. Nach Beendigung Ihrer Teilnahme werden keine weiteren Daten von Ihnen erhoben. Ihre bisherigen Daten werden dann unwiderruflich anonymisiert, d.h. Sie können nicht mehr anhand der Daten identifiziert werden. Auf Wunsch können wir Sie über die Ergebnisse informieren, hierzu bitten wir um eine Terminvereinbarung mit den verantwortlichen Studienleitern.

### V. Rücknahme der Einwilligungserklärung, Recht auf Einsicht der Daten



Sie haben jederzeit das Recht, alle über Sie gespeicherten Informationen einzusehen. Sie können Ihre Einwilligung in die Speicherung Ihrer Daten und Lagerung Ihrer Gewebeproben jederzeit ohne Angaben von Gründen widerrufen. Bitte wenden Sie sich hierzu an die Studienleiter.

## **VI. Datenschutzrechtliche Informationen**

Für die Datenverarbeitung sind die Studienleiter verantwortlich. Die Datenerhebung erfolgt zum Zweck des oben genannten Forschungsvorhabens. Ihre Daten werden in pseudonymisierter Form, d.h. ohne direkten Bezug zu Ihrem Namen, elektronisch gespeichert und ausgewertet. Die Bestimmungen des Datenschutzgesetzes werden eingehalten. Zugriff auf Ihre Daten haben nur Mitarbeiter der Studie. Diese Personen sind zur Verschwiegenheit verpflichtet. Die Daten sind vor fremden Zugriff geschützt. Außerdem sollen die Daten und die gewonnenen Gewebeproben dauerhaft archiviert beziehungsweise gelagert werden.

Sollten Sie weitere Fragen bezüglich der Studie haben, wenden Sie sich bitte an das **Studienteam**:

### **Medizinische Klinik I**

PD Dr. med. Johannes Klein (Studienleiter)  
Dr. med. Alexander Iwen (stellvertretender Studienleiter)  
Cand. med. Anna-Christin Bohl

Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck  
Ratzeburger Allee 160  
23538 Lübeck  
Tel.: 0451/500-2869

### **Interdisziplinäre Arbeitsgruppe Stammzellbiologie**

Dr. med. Jan Kramer  
PD Dr. rer. nat. Jürgen Rohwedel

### **Sektion für Plastische Chirurgie**

Dr. med. Werner Eisenbeiss

### **Klinik für Dermatologie und Venerologie**

Dr. med. Christian Rose

### **Beiersdorf AG**

Dr. Andreas Schepky