

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

---

**Etablierung einer dreidimensionalen *in vitro*-Kultivierung mesenchymaler  
Stammzellen und Nachweis der *in vivo* Matrix-vermittelten Migration  
mesenchymaler Stammzellen in einen Knorpeldefekt**

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

vorgelegt von  
Björn Florian Böhrnsen  
aus Hamburg

Lübeck 2009

1.   Berichterstatter:                   Priv.-Doz. Dr. med. Jan Kramer
  2.   Berichterstatter:                   Priv.-Doz. Dott. Dr. med. (U.C.MI.) Lutz Wünsch
- Tag der mündlichen Prüfung:                   26.05.2010
- Zum Druck genehmigt. Lübeck, den                   26.05.2010

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach  
-Dekan der Medizinischen Fakultät-

Meinen Eltern  
Meiner Familie  
und in Erinnerung an meinen Großvater AmtsR. Hans Böhrnsen

## Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| Inhaltsverzeichnis .....   | I         |
| Abkürzungsverzeichnis .....  | V         |
| <b>1. Einleitung .....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>1.1. Definition und Charakterisierung mesenchymaler Stamm-/ Progenitorzellen .....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>1.2. Standardisierung der <i>in vitro</i> Differenzierung von Stamm-/ Progenitorzellen .....</b>                                  | <b>2</b>  |
| <b>1.3. Nachteile herkömmlicher Knorpelersatztherapien.....</b>  | <b>3</b>  |
| <b>1.4. Zielsetzung der Arbeit.....</b>  | <b>4</b>  |
| 1.4.1. Optimierte Charakterisierung von Stamm-/ Progenitorzellen mittels einer standardisierten 3D-Differenzierungsmethode.....      | 4         |
| 1.4.2. Nachweis Matrix-vermittelter Migration von Stamm-/ Progenitorzellen an den Ort eines Gewebedefektes .....                     | 5         |
| <b>2. Material und Methoden .....</b>  | <b>6</b>  |
| <b>2.1. Materialien und Geräte.....</b>  | <b>6</b>  |
| <b>2.2. Allgemeine Lösungen .....</b>  | <b>7</b>  |
| <b>2.3. Medien zur Isolation und Kultivierung von Stamm-/ Progenitorzellen.....</b>  | <b>8</b>  |
| 2.3.1. Kultivierungsmedium .....   | 8         |
| 2.3.2. Transfermedium für Knochenmark .....  | 8         |
| 2.3.3. Isolationsmedium mit Kollagenase .....  | 8         |
| <b>2.4. Medien zur Differenzierung von Stamm-/ Progenitorzellen .....</b>  | <b>8</b>  |
| 2.4.1. Medium zur osteogenen Induktion.....  | 9         |
| 2.4.2. Medium zur chondrogenen Induktion .....   | 9         |
| 2.4.3. Medium zur adipogenen Induktion .....   | 9         |
| 2.4.4. Medium zum Erhalt adipogener Differenzierung .....  | 9         |
| <b>2.5. Techniken der Kultivierung von Stamm-/ Progenitorzellen .....</b>  | <b>9</b>  |
| 2.5.1. Ablösen, Zentrifugieren und Passagieren von Stamm-/ Progenitorzellen .....  | 10        |
| 2.5.2. Kryokonservierung von Stamm-/ Progenitorzellen.....   | 11        |
| <b>2.6. Techniken zur Isolation von Stamm-/ Progenitorzellen .....</b>   | <b>11</b> |
| 2.6.1. Isolation muriner Stamm-/ Progenitorzellen aus dem Knochenmark .....  | 11        |
| 2.6.2. Isolation muriner Stamm-/ Progenitorzellen aus perirenalem Fettgewebe .....   | 12        |
| 2.6.3. Isolation muriner Stamm-/ Progenitorzellen aus mediastinalem Bindegewebe....  | 12        |
| 2.6.4. Isolation humaner Stamm-/ Progenitorzellen aus einer <i>in vivo</i> zur Defektheilung verwendeten Kollagen I/III-Matrix ..... | 13        |
| <b>2.7. Analyse der Proliferations-, Telomerase- und Oberflächencharakteristika von Stamm-/ Progenitorzellen.....</b>                | <b>14</b> |
| 2.7.1. Bestimmung des Verdopplungsfaktors .....  | 15        |
| 2.7.2. Bestimmung der Telomeraseaktivität mittels Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) .....                                    | 15        |
| 2.7.3. Durchflusszytometrische Analyse von Stamm-/ Progenitorzellen.....   | 16        |

|              |   |           |
|--------------|---|-----------|
| <b>2.8.</b>  | <b>Klassisches Monolayer- und MicroMassBody-System zur Differenzierung von Stamm-/ Progenitorzellen .....</b>   | <b>17</b> |
| 2.8.1.       | Osteogene und adipogene Differenzierung im klassischen Monolayer-System ...   | 17        |
| 2.8.2.       | Chondrogene Differenzierung im klassischen MicroMassBody-System .....   | 18        |
| <b>2.9.</b>  | <b>Etablierung einer 3D-Kultivierungsmethode zur adipogenen, osteogenen und chondrogenen Differenzierung mesenchymaler Stamm-/ Progenitorzellen. ....</b> | <b>19</b> |
| 2.9.1.       | Herstellung der MMS im „hängenden Tropfen“ .....  | 19        |
| 2.9.2.       | Plattieren der MMS auf Gewebekulturflächen.....   | 20        |
| 2.9.3.       | Induktion und Differenzierung plattierter MMS .....   | 20        |
| <b>2.10.</b> | <b>Screening-Verfahren zur Beschreibung der Differenzierungsfähigkeit von Stamm-/ Progenitorzellen .....</b>  | <b>21</b> |
| <b>2.11.</b> | <b>Analysemethoden zur Charakterisierung der Differenzierung von Stamm-/ Progenitorzellen .....</b>   | <b>23</b> |
| 2.11.1.      | MMB-Kryopräparate chondrogen differenzierter Stamm-/ Progenitorzellen.....  | 23        |
| 2.11.2.      | Eindeckmedium für histochemische und immunhistochemische Färbungen sowie Darstellung intranukleärer DNA .....   | 24        |
| <b>2.12.</b> | <b>Histochemische Analysemethoden zur Charakterisierung der Differenzierung von Stamm-/ Progenitorzellen .....</b>  | <b>24</b> |
| 2.12.1.      | Nachweis alkalischer Phosphatase zur Darstellung der osteogenen Differenzierung .....   | 24        |
| 2.12.2.      | Sudan III Färbung zur Darstellung der adipogenen Differenzierung.....   | 25        |
| 2.12.3.      | Alcianblau Färbung zur Darstellung der chondrogenen Differenzierung .....   | 25        |
| 2.12.4.      | Quantitative Auswertung der histochemischen Färbungen.....  | 26        |
| <b>2.13.</b> | <b>Immunhistochemische Analysemethoden zur Charakterisierung der Differenzierung von Stamm-/ Progenitorzellen .....</b>                                   | <b>26</b> |
| 2.13.1.      | Darstellung zelltypspezifischer Proteinexpression mittels indirekter Immunfluoreszenz.....  | 26        |
| 2.13.2.      | Darstellung zelltypspezifischer mRNA-Expression mittels Fluoreszenz <i>in situ</i> -Hybridisierung.....   | 28        |
| 2.13.3.      | Herstellung der <i>in situ</i> -mRNA-Sonden .....   | 29        |
| 2.13.4.      | Hybridisierung der mRNA-Sonde.....  | 30        |
| <b>2.14.</b> | <b>Darstellung zelltypspezifischer Genexpression zur Charakterisierung der Differenzierung von Stamm-/ Progenitorzellen.....</b>                          | <b>31</b> |
| 2.14.1.      | Sequenzspezifisches Primerdesign.....   | 32        |
| 2.14.2.      | RNA-Isolierung .....  | 35        |
| 2.14.3.      | RT-Reaktion .....   | 36        |
| 2.14.4.      | PCR-Reaktion.....   | 36        |
| 2.14.5.      | Agarose-Gelelektrophorese und densitometrische Auswertung .....   | 38        |
| <b>2.15.</b> | <b>Statistische Auswertung.....</b>   | <b>39</b> |
| <b>3.</b>    | <b>Ergebnisse .....</b>   | <b>40</b> |
| <b>3.1.</b>  | <b>Isolation muriner Stamm-/ Progenitorzellen aus verschiedenen Gewebequellen.....</b>  | <b>40</b> |
| <b>3.2.</b>  | <b>Charakterisierung muriner Stamm-/ Progenitorzellen aus verschiedenen Gewebequellen.....</b>  | <b>41</b> |

|             |  |           |
|-------------|--|-----------|
| 3.2.1.      | Stamm-/ Progenitorzellen aus verschiedenen murinen Gewebequellen zeigen vergleichbare Proliferationseigenschaften .....                              | 41        |
| 3.2.2.      | Stamm-/ Progenitorzellen aus verschiedenen murinen Gewebequellen zeigen geringe Unterschiede in der Expression von Oberflächenmolekülen .....        | 41        |
| 3.2.3.      | Stamm-/ Progenitorzellen aus verschiedenen murinen Gewebequellen zeigen eine erfolgreiche adipogene, osteogene und chondrogene Differenzierung ..... | 43        |
| 3.2.3.1.    | <i>Etablierung einer standardisierten 3D-Kultivierung von Stamm-/ Progenitorzellen</i> .....   | 43        |
| 3.2.3.2.    | <i>Die standardisierte 3D-Kultivierung via MMS ermöglicht eine effiziente Differenzierung</i> .....  | 45        |
| 3.2.4.      | Stammzellen aus verschiedenen Gewebequellen besitzen Unterschiede in ihrer Differenzierungsfähigkeit .....   | 47        |
| <b>3.3.</b> | <b>Gen- und Proteinexpression während der klassischen Monolayer und MMB-Differenzierung</b> .....  | <b>48</b> |
| 3.3.1.      | Bestätigung der osteogenen Differenzierung im Monolayer-System auf Gen- und Proteinexpressionsebene .....  | 48        |
| 3.3.2.      | Bestätigung der adipogenen Differenzierung im Monolayer-System auf Gen- expressionsebene .....   | 49        |
| 3.3.3.      | Bestätigung der chondrogenen Differenzierung im MMB-System auf Gen- und Proteinexpressionsebene .....  | 50        |
| <b>3.4.</b> | <b>Gen- und Proteinexpression während der standardisierten MMS-Kultivierung</b> .....  | <b>52</b> |
| 3.4.1.      | Bestätigung der osteogenen Differenzierung im MMS-System auf Gen- und Proteinexpressionsebene .....  | 52        |
| 3.4.2.      | Bestätigung der adipogenen Differenzierung im MMS-System auf Gen- expressionsebene .....   | 53        |
| 3.4.3.      | Bestätigung der chondrogenen Differenzierung im MMS-System auf Gen- und Proteinexpressionsebene .....  | 53        |
| <b>3.5.</b> | <b>Nachweis Matrix-vermittelter Migration von Stamm-/ Progenitorzellen an den Ort eines Gewebedefektes</b> .....                                     | <b>56</b> |
| 3.5.1.      | Isolation humaner Stamm-/ Progenitorzellen aus einer <i>in vivo</i> zur Knorpel- defektheilung verwendeten Kollagen I/III-Matrix .....               | 56        |
| 3.5.2.      | Charakterisierung humaner Stamm-/ Progenitorzellen aus einer <i>in vivo</i> zur Knorpeldefektheilung verwendeten Kollagen I/III-Matrix .....         | 56        |
| <b>4.</b>   | <b>Diskussion</b> .....  | <b>60</b> |
| <b>4.1.</b> | <b>Charakterisierung adulter Stamm-/ Progenitorzellen</b> .....  | <b>60</b> |
| 4.1.1.      | Die Heterogenität des mesenchymalen Stammzellpools erschwert einen standardisierten Vergleich .....  | 60        |
| 4.1.2.      | Die erfolgreiche Etablierung von Stamm-/ Progenitorzellen wird durch exogene Faktoren beeinflusst .....  | 60        |
| 4.1.3.      | Die FACS-Analyse allein genügt nicht zur Identifikation von mesenchymalen Stamm-/ Progenitorzellen .....   | 61        |
| 4.1.4.      | Murine PAT-Isolate mit höherer Differenzierungskapazität zeigen eine Expression von Oct $\frac{3}{4}$ .....  | 62        |
| 4.1.5.      | Die Differenzierung im Monolayer und MMB erfordert eine hohe Anzahl von Stamm-/ Progenitorzellen .....   | 62        |

|             |   |            |
|-------------|---|------------|
| 4.1.6.      | Die Optimierung der Differenzierung von Stamm-/ Progenitorzellen im MMS ermöglicht eine schnellere Charakterisierung mesenchymaler Stamm-/ Progenitorzellen <i>in vitro</i> ..... | 63         |
| <b>4.2.</b> | <b>Matrix-vermittelte Migration mesenchymaler Stamm-/ Progenitorzellen in einen Gewebedefekt .....</b>  | <b>64</b>  |
| 4.2.1.      | Knorpeldefekte zeigen eine limitierte Regenerationskapazität .....  | 64         |
| 4.2.2.      | Die Stamm-/ Progenitorzellen aus einer <i>in vivo</i> zur Knorpeldefektheilung verwendeten Matrix zeigen Charakteristika humaner mesenchymaler Stammzellen .....                  | 64         |
| 4.2.3.      | Die matrix-vermittelte Migration von Stamm-/ Progenitorzellen an den Ort des Gewebedefekts ermöglicht eine direkte Anwendung adulter Stammzellen <i>in vivo</i> .....             | 65         |
| <b>4.3.</b> | <b>Zukünftige Stammzellapplikationen und Anwendungen .....</b>  | <b>66</b>  |
| <b>5.</b>   | <b>Zusammenfassung .....</b>  | <b>68</b>  |
| <b>6.</b>   | <b>Literaturverzeichnis .....</b>   | <b>70</b>  |
| <b>7.</b>   | <b>Anhang .....</b>   | <b>VII</b> |
| <b>7.1.</b> | <b>Eigene Publikationen .....</b>   | <b>VII</b> |
| <b>7.2.</b> | <b>Danksagung.....</b>  | <b>X</b>   |
| <b>7.3.</b> | <b>Curriculum Vitae .....</b>   | <b>XI</b>  |

**Abkürzungsverzeichnis**

|          |   |
|----------|---|
| AB       | Alcianblau  |
| AMIC     | Autologe Matrix-Induzierte Chondrogenese                      |
| AP       | Alkalische Phosphatase  |
| APC      | Allophycocyanin   |
| BSA      | Bovines Serum Albumin   |
| BSP      | Bone Sialoprotein   |
| CD       | Cluster of Differentiation                                    |
| cDNA     | komplementäre Desoxyribonukleinsäure                          |
| C/EBP    | CCAAT-Enhancer Binding Protein                                |
| Cy3      | Indocabocyanin  |
| DAPI     | 4',6-Diamidino-2-phenylindol                                  |
| DIC      | Differential-Interferenz-Kontrast                             |
| DIG      | Digoxigenin   |
| DNA      | Desoxyribonukleinsäure  |
| EDTA     | Ethylendiamintetraessigsäure                                  |
| EB       | Embryoid Body   |
| ELISA    | Enzyme Linked Immunosorbent Assay                             |
| FACS     | Fluorescence Activated Cell Sorting                           |
| FKS      | Fetales Kälber Serum  |
| FABP/aP2 | Fatty Acid-Binding Protein / aP2                              |
| FISH     | Fluoreszenz <i>in situ</i> -Hybridisierung                    |
| FITC     | Fluorescein   |
| IF       | sekundäre Immunfärbung  |
| Ig       | Immunglobulin   |
| mAk      | monoklonaler Antikörper                                       |
| mBM      | murine Bone Marrow (Knochenmark)                              |
| mMST     | murine Mediastinal Stromal Tissue (mediastinales Bindegewebe) |
| mPAT     | murine Perirenal Adipose Tissue (perirenales Fettgewebe)      |
| MMB      | MicroMassBody   |
| MMS      | Mesenchymale MicroSphäre                                      |
| mRNA     | messenger-Ribonukleinsäuren                                   |
| MSC      | Mesenchymale Stamm-/ Progenitorzelle                          |



---

|               |  |
|---------------|--|
| OC            | Osteocalcin  |
| OP            | Osteopontin  |
| PBS           | Phosphate Buffered Saline                            |
| PCR           | Polymerase Chain Reaction                            |
| PE            | Phycoerythrin  |
| PPAR $\gamma$ | Peroxisome Proliferation-Activated Receptor $\gamma$ |
| RT            | Reverse Transkription                                |
| RNA           | Ribonukleinsäuren                                    |
| Sox           | SRY (sex determining region Y)-box                   |
| SSC           | Standard Saline Citrate                              |
| STRO-1        | Stromal Cell Surface Marker 1                        |
| TBE           | TRIS-Borat-EDTA-Puffer                               |
| TGF           | Transforming Growth Factor                           |
| TMB           | 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin                        |
| V-Faktor      | Verdopplungsfaktor                                   |

## 1. Einleitung

### 1.1. Definition und Charakterisierung mesenchymaler Stamm-/ Progenitorzellen

Die biologischen Eigenschaften sowie die mögliche therapeutische Anwendung multipotenter mesenchymaler Stamm-/ Progenitorzellen (MSC) stehen im Fokus biomedizinischer Untersuchungen der regenerativen Medizin (zur Übersicht siehe: (1,2)). Eine sichere klinische Anwendung von MSC erfordert eine genaue Definition und Charakterisierung dieser Zellen (3).

Die Primärfunktion lokaler, adulter Stammzellen besteht in der Aufrechterhaltung der Homöostase des spezifischen Ursprungsgewebes sowie in der Defektheilung bzw. der Zell- und Geweberegeneration nach Trauma, Krankheit oder auf Grund natürlicher Alterungsprozesse (4,5). Es konnten bereits frühzeitig Stammzellen adulter Gewebe identifiziert und charakterisiert werden. Hier sind besonders die Stammzellen des zentralen Nervensystems (6), der Hämatopoese (7), des Endothels (8), des Muskels (9), der Haut (10) und der gastrointestinalen Organe wie Leber, Darm und Pankreas (11,12) zu nennen. Besonders hervorzuheben ist die Beschreibung der Zellen des Knochenmarkstromas als eigenständige Zellpopulation (13-16). Die Stamm-/ Progenitorzellen des Knochenmarks proliferieren *in vitro* (17), bilden einzelne Zellkolonien (colony forming units-fibroblast (18)) und zeigen eine mesodermale Zelldifferenzierung entlang adipogener, osteogener und chondrogener Zelllinien (19). Die Charakterisierung adulter Stammzellen unterschiedlichster Gewebe (20-22) gibt Anlass zu der Hypothese, dass Stammzellen, die in der Lage sind in unterschiedliche Zelltypen zu differenzieren, in nahezu jedem post-natalen Organ zu finden sind (23). Im Gegensatz zu den embryonalen Stammzellen, die aus der inneren Zellmasse der Blastozyste gewonnen werden, kann für adulte Stammzellen jedoch keine Definition *per isolationem* gestellt werden. Ihre exakte Lokalisation *in vivo* bleibt unsicher und ist aktueller Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen (24). Umso wichtiger ist eine genaue und detaillierte Definition und Charakterisierung der isolierten MSC. Aufgrund unterschiedlicher Isolations-, Kultivierungs- und Differenzierungsmethoden sowie fehlender Standardisierung im Umgang mit MSC (25) wird es zunehmend schwieriger die Ergebnisse einzelner Studien miteinander zu vergleichen (26). Eine genaue Nomenklatur (27) sowie Minimalkriterien (3) sollen in Zukunft eine Vergleichbarkeit der isolierten Stamm-/ Progenitorzellen ermöglichen. Dennoch bleiben diese Kriterien zunächst auf die humanen MSC beschränkt und können nicht universell für alle Spezies angewendet werden (3). Zu diesen vorgeschlagenen minimalen Kriterien gehört: Erstens eine

Plastikadhärenz der isolierten MSC, wie sie bereits für die Stromazellen (marrow stromal cells (28)) des Knochenmarks beschrieben wurde. Zweitens eine positive Expression der Oberflächenmarker CD105, CD73 und CD90 sowie eine negative Expression der hämatogenen Oberflächenmarker CD45 und CD34. Zudem sollten weitere Oberflächenmarker wie STRO-1 (29,30) oder CD140 (31) untersucht werden, da sie möglicherweise für eine positive Selektion von MSC genutzt werden können. Ein den MSC ähnliches Oberflächenexpressionsmuster konnte jedoch auch auf humanen Fibroblasten nachgewiesen werden (26). Eine alleinige Charakterisierung von MSC anhand der Expression von Oberflächenmarkermolekülen ist daher nicht ausreichend (26,32). MSC müssen drittens eine erfolgreiche adipogene, osteogene und chondrogene *in vitro*-Differenzierung unter definierten Bedingungen zeigen.

### **1.2. Standardisierung der *in vitro* Differenzierung von Stamm-/ Progenitorzellen**

Die Isolation heterogener Zellpopulationen *via* Plastikadhärenz und uneinheitliche Differenzierungsprotokolle erschweren eine standardisierte MSC-Charakterisierung (26). Es ist anzunehmen, dass die Eigenschaften mesenchymaler Zellpopulationen durch unterschiedliche Isolations- und Kultivierungsbedingungen beeinflusst werden können (25,26). So konnten zum Beispiel multipotente adulte Progenitorzellen (MAPC; (33)) und sogar uneingeschränkte (pluripotente) somatische Stammzellen (USSC; (34)) gewonnen werden. Um MSC-Isolate besser charakterisieren zu können, sind daher standardisierte Kultivierungs- und Differenzierungsbedingungen anzustreben. Klassischerweise erfolgt die adipogene, osteogene und chondrogene Differenzierung von MSC überwiegend in Monolayer- bzw. MicroMassBody-(MMB)-Kulturen (35-38). Werden MSC-Isolate im Monolayer bzw. MMB analysiert, ist eine zeitaufwendige *in vitro*-Kultivierung zur Gewinnung ausreichend hoher Zellzahlen erforderlich. Dies erschwert zum einen die exakte Charakterisierung der Stamm-/ Progenitorzellen *in vitro* und verzögert zum anderen einen möglichen therapeutischen Einsatz der MSC *in vivo*. Ein optimiertes, standardisiertes und reproduzierbares System der *in vitro*-Charakterisierung sollte daher bei geringerer Zellzahl und geringerem Zeitaufwand eine effiziente Differenzierung mesenchymaler Stamm-/ Progenitorzellen ermöglichen.

### 1.3. Nachteile herkömmlicher Knorpelersatztherapien

Das sowohl druck- als auch biegeelastische Knorpelgewebe besitzt als gefäßloses und nervenfreies Stützgewebe nur eingeschränkt die Möglichkeit zur funktionellen Regeneration nach traumatischen Verletzungen. Bleibt die Defektheilung der Knorpel-läsionen eingeschränkt oder insuffizient, folgt meist eine weitere Degeneration und fortschreitende Arthrose des Gelenkes. Eine Behandlung chondrogener Kniegelenks-läsionen durch Debridement und Lavage (39) sowie Transplantation von allogenen und oder autologem Knorpel (40,41) ist nicht ausreichend, um den hyalinen Knorpel vollständig in seiner ursprünglichen Form und Funktion zu regenerieren (42). Die Transplantation von Periost (43) oder Perichondrium (44,45) führt ebenfalls zu keiner physiologischen Reparatur der Knorpeldefekte und birgt darüberhinaus die Gefahr der Degeneration und Verkalkung des eingebrachten Gewebes (46,47). Gelenkknorpelschäden, die die subchondrale Zone überschreiten, zeigen allerdings gewisse intrinsische Regenerationsprozesse (48). Dennoch führt die Technik der Mikrofrakturierung des subchondralen Knochens (49-52) oftmals nur zu einer fibrokartilaginären Defektheilung. Um eine verbesserte Reparatur des Knorpelgewebes zu erreichen, wurde die Anwendung von Kollagen I/III-Membranen in Kombination mit der Implantation von autologen Chondrozyten in der klinischen Anwendung vorgestellt (53-56). Die Gewinnung von autologen Chondrozyten oder Periost zur Geweberegeneration erfordert einen operativen Eingriff und die Exzision von gesundem Gewebe (57). Bei der Expansion von Primärzellen *in vitro* verlieren diese jedoch rasch ihre funktionalen Eigenschaften und zeigen eine zunehmende Dedifferenzierung (58). Es resultiert meist eine limitierte Anzahl transplantierbarer Primärzellen und ein oftmals eingeschränktes Reparaturpotential des Transplantats.

Als alternative Methode wurde die Anwendung von somatischen Stammzellen zur Therapie von Knorpeldefekten beschrieben (19,59-61). Es ist anzunehmen, dass die Aktivierung lokaler Stamm-/ Progenitorzellen des subchondralen Knochens den Re-generationsprozess verbessern kann (42). Um dies zu erreichen, müssen die MSC in das geschädigte Areal geführt werden. Durch eine direkte *in vivo*-Migration von MSC entlang einer Kollagen-Matrix an den Ort des Defektes könnte eine aufwändige und für den Patienten durch zusätzliche operative Eingriffe belastende *in vitro*-Expansion von autologen Primärkulturen vermieden werden.

## 1.4. Zielsetzung der Arbeit

### 1.4.1. Optimierte Charakterisierung von Stamm-/ Progenitorzellen mittels einer standardisierten 3D-Differenzierungsmethode

Die osteogene, adipogene und chondrogene Differenzierung ist für die *in vitro*-Charakterisierung von MSC zwingend notwendig (3). Die Differenzierung von MSC im konventionellen Monolayer- bzw. MMB-System erfordert eine hohe Zellzahl und somit eine zeit- und technisch aufwendige sowie kostenintensive *in vitro*-Kultivierung. Zudem muss ein Großteil der isolierten MSC für diese Charakterisierung verwendet werden, so dass weniger Zellen für eine klinische Anwendung zur Verfügung stehen.

Ziel dieser Arbeit war es daher, eine vereinfachte und standardisierte Differenzierung von MSC zu etablieren, die bei geringerer Zellzahl und gutem Zell-Zell-Kontakt eine optimierte *in vitro*-Differenzierung und Charakterisierung ermöglicht. Hierzu wurden Stamm-/ Progenitorzellen aus murinem Knochenmark (mBM) isoliert und analysiert. Zusätzlich wurde, um der Frage nachzugehen, ob MSC auch in anderen murinen Geweben zu finden sind, die Zellisolation aus neuen Quellen, dem murinem perirenal Fettgewebe (mPAT) und dem murinen mediastinalen Bindegewebe (mMST), etabliert. Nach der Isolation wurden die plastikadhärenten Zellen mittels Durchflusszytometrie (fluorescence activated cell sorting, FACS) hinsichtlich der Expression von Oberflächenmarker-molekülen untersucht. Die Proliferationseigenschaften wurden mittels der Bestimmung des zellulären Verdopplungsfaktors und Analyse der Telomeraseaktivität bestimmt.

In Anlehnung an die in der embryonalen Stammzellforschung erfolgreich angewendete Methode der *embryoid body*-Kultivierung (62,63) erfolgte die Etablierung der *Mesenchymalen MicroSphären*-Kultivierung (MMS) als eine standardisierte Methode der 3D-Differenzierung mesenchymaler Stamm-/ Progenitorzellen. Das MMS-System wurde der klassischen adipogenen und osteogenen Monolayerdifferenzierung sowie der herkömmlichen chondrogenen MMB-Differenzierung gegenüber gestellt. Die Analyse der adipogenen, osteogenen und chondrogenen Gen- und Proteinexpression erfolgte mittels histochemischer Färbungen, sekundärer Immunfluoreszenz, mRNA-Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung (FISH) und semi-quantitativer RT-PCR.

#### 1.4.2. Nachweis Matrix-vermittelter Migration von Stamm-/ Progenitorzellen an den Ort eines Gewebedefektes

Der Regenerationsprozess von Gewebedefekten nach Trauma oder Krankheit wird durch die Aktivierung lokaler Stamm-/ Progenitorzellen unterstützt. Ziel dieser Arbeit war es zu zeigen, dass die an der Reparatur beteiligten Stammzellen entlang einer Kollagen I/III-Matrix nach erfolgter Mikrofrakturierung des subchondralen Knochens aus dem Knochenmark an den Ort der Knorpeldefektheilung geführt werden können. Eine aufwändige *in vitro*-Kultivierung der Zellen vor der therapeutischen Applikation könnte somit entfallen.

Im Verlauf der Behandlung eines Kniegelenkdefektes wurde in den mikrofrakturierten Gewebedefekt eine Kollagen I/III-Matrix eingebracht und gleichmäßig durch das subchondrale Knochenmark infiltriert (Autologe Matrix-Induzierte Chondrogenese, AMIC; (64)). Die plastikadhärenten, aus der überschüssigen Matrix isolierten Stamm-/ Progenitorzellen wurden anhand ihrer Oberflächenexpression charakterisiert und mittels MMS- und MMB-System adipogen, osteogen und chondrogen differenziert. Die Analyse der entsprechenden adipogenen, osteogenen und chondrogenen Gen- und Proteinexpression erfolgte mittels histochemischer Färbungen, sekundärer Immunfluoreszenz und semi-quantitativer RT-PCR.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Materialien und Geräte

|   |                                 |
|---|---------------------------------|
| Autoklav 2540EL                                   | (Systec, Wettenberg, Germany)   |
| Cryostat Reichert & Jung Frigocut 2800            | (Leica, Bensheim, Germany)      |
| Durchflusszytometer Cytomics FC 500               | (B&C, Krefeld, Germany)         |
| Feinwaage 0,5 g - 1500 g                          | (Kern, Balingen, Germany)       |
| Feinwaage Sartorius Micro                         | (Sartorius, Göttingen, Germany) |
| Feinwaage Sartorius 1602 MP8                      | (Sartorius, Göttingen, Germany) |
| Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axioplan 2             | (Zeiss, Oberkochen, Germany)    |
| Fluoreszenzmikroskop Zeiss AxioStar plus          | (Zeiss, Oberkochen, Germany)    |
| Fotographie Sony 3CCD Color Video Camera          | (Sony, Tokyo, Japan)            |
| Fotographie Moticam 1000                          | (Motic, Wetzlar, Germany)       |
| Fotographie Phase CellCam                         | (Phase, Lübeck, Germany)        |
| Gelelektrophorese Biorad Wide Mini Sub Cell GT    | (Biorad, Hercules, USA)         |
| Gelelektrophorese Biorad Power Pac Basic          | (Biorad, Hercules, USA)         |
| Inkubator Nuair IR CO <sub>2</sub> Water-Jacketed | (Nuair, Plymouth, USA)          |
| <i>In situ</i> -Hybridisierung Hybaid Mini10      | (MWG, Ebersberg, Germany)       |
| <i>In situ</i> -Hybridisierung Hybaid Maxi14      | (MWG, Ebersberg, Germany)       |
| Inversionsmikroskop Leica DMIL                    | (Leica, Wetzlar, Germany)       |
| Inversionsmikroskop Leitz Diavert                 | (Leitz, Wetzlar, Germany)       |
| Kryo-Container                                    | (Nalge Ltd, Neerijse, Belgium)  |
| Magnetthermorührer MR2002                         | (Heidolph, Nürnberg, Germany)   |
| Mikrowelle ER 7700                                | (Toshiba, Tokyo, Japan)         |
| PCR-Thermocycler Eppendorf Mastergradient         | (Eppendorf, Hamburg, Germany)   |
| PCR- PTC 200 Thermal Cycler                       | (MJ Inc., Waltham, USA)         |
| PCR-Biorad MyCycler Thermal Cycler                | (Biorad, Hercules, USA)         |
| S2 Safety Cabinets Nuair Biological               | (Nuair, Plymouth, USA)          |
| Software Adobe Photoshop CS                       | (Adobe, Saggart, Ireland)       |
| Software CorelDRAW 10                             | (Corel, Ottawa, Canada)         |
| Software Cytomics CXP                             | (B&C, Krefeld, Germany)         |
| Software Gel-Pro <sup>®</sup> Analyzer            | (MediaCybernetics, MA, USA)     |
| Software ImageJ                                   | (NIH, Bethesda, USA)            |
| Software Motic Image Plus 2.0                     | (Motic, Wetzlar, Germany)       |

|   |                                 |
|---|---------------------------------|
| Software SigmaPlot 2000                                     | (Systat, Erkrath, Germany)      |
| Software Zeiss AxioVision 3.0.6                             | (Zeiss, Oberkochen, Germany)    |
| Spektralphotometer Biomate 3                                | (Thermo, Waltham, USA)          |
| Spektralphotometer Anthos Lucy3                             | (Anthos, Eugendorf, Austria)    |
| Thermoblock 56 x 1,5 ml                                     | (Liebisch, Bielefeld, Germany)  |
| UV-Transluminator   | (UVP, Cambridge, U.K.)          |
| Vortexer Yellow line TTS2                                   | (IKA, Staufen, Germany)         |
| Zellkultur Bakteriologische Petrischalen                    | (GBO, Essen, Germany)           |
| Zellkultur BD Falcon <i>Culture Slides</i>                  | (B&D, Franklin Lakes, USA)      |
| Zellkultur BD Microlance 3 (Ø 0,4 mm, 0,9 mm)               | (B&D, Franklin Lakes, USA)      |
| Zellkultur Cryo Tube Einfrierröhrchen (2 ml)                | (TPP, Trasadingen, Switzerland) |
| Zellkultur Falcons (15 ml, 50 ml)                           | (TPP, Trasadingen, Switzerland) |
| Zellkultur Gewebekulturflaschen (25 - 150 cm <sup>2</sup> ) | (TPP, Trasadingen, Switzerland) |
| Zellkultur Gewebekulturschalen (Ø 6 cm, 10 cm)              | (TPP, Trasadingen, Switzerland) |
| Zellkultur Multi-Well-Zellkulturplatten                     | (TPP, Trasadingen, Switzerland) |
| Zellkultur Präparationsbesteck (steril)                     |                                 |
| Zellkultur THOMA-Zellzählkammer                             |                                 |
| Zentrifuge 5415d  | (Eppendorf, Hamburg, Germany)   |
| Zentrifuge Biofuge pico                                     | (Heraeus, Hanau, Germany)       |
| Zentrifuge Minifuge RF                                      | (Heraeus, Hanau, Germany)       |

## 2.2. Allgemeine Lösungen

### Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) 200 mM, pH 8,0

7,44 g EDTA (Merck, Darmstadt, Germany) wurden in 100 ml *Aqua dest.* gelöst und der pH-Wert mit NaOH (10 M) auf 8,0 eingestellt.

### Phosphate Buffered Saline (PBS) 10 x Lösung (steril), pH 7,2

Folgende Substanzen wurden in deionisiertem Wasser gelöst:

|         |  |                             |
|---------|--|-----------------------------|
| 1,37 M  | NaCl   | (Merck, Darmstadt, Germany) |
| 26,9 mM | KCl  | (Merck, Darmstadt, Germany) |
| 0,1 M   | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O | (Fluka, Buchs, Switzerland) |
| 17,6 mM | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                      | (Merck, Darmstadt, Germany) |

Einzelansätze wurden auf die 1 x Konzentration in deionisiertem Wasser verdünnt und anschließend autoklaviert.



TRIS-Borat-EDTA-Puffer (TBE) 10 x Lösung, pH 8,3

Folgende Substanzen wurden in *Aqua dest.* gelöst:

|        |                 |                             |
|--------|-----------------|-----------------------------|
| 1 M    | TRIS Ultra Pure | (Biomol, Hamburg, Germany)  |
| 864 mM | Borsäure        | (Merck, Darmstadt, Germany) |
| 20 mM  | EDTA            | (Biochrom, Berlin, Germany) |

Einzelansätze wurden auf die 1 x Konzentration in *Aqua dest.* verdünnt.

**2.3. Medien zur Isolation und Kultivierung von Stamm-/ Progenitorzellen**

Für die Isolation und Kultivierung muriner und humaner mesenchymaler Stamm-/ Progenitorzellen wurden folgende Medien eingesetzt:

**2.3.1. Kultivierungsmedium**

Murine und humane Stamm-/ Progenitorzellen wurden mit Dulbeccos Modified Eagles Medium mit 4500 mg/l D-Glucose (DMEM high glucose; Invitrogen, Paisley, U.K.), 10 % Fetalem Kälber Serum (FKS) sowie folgenden Additiven kultiviert:

|        |                                   |                             |
|--------|-----------------------------------|-----------------------------|
| 1 %    | MEM Nicht-essentielle Aminosäuren | (Invitrogen, Paisley, U.K.) |
| 1 %    | L-Glutamin                        | (PAA, Pasching, Austria)    |
| 1 %    | Penicillin / Streptomycin         | (PAA, Pasching, Austria)    |
| 1 %    | Na-Pyruvat                        | (PAA, Pasching, Austria)    |
| 300 µM | Vitamin C (steril)                | (Sigma, München, Germany)   |

**2.3.2. Transfermedium für Knochenmark**

10 ml Kultivierungsmedium (2.3.1.) wurden mit 5000 IE Heparin (Merk, Darmstadt, Germany) versetzt und steril filtriert.

**2.3.3. Isolationsmedium mit Kollagenase**

Kultivierungsmedium (2.3.1.) wurde mit Kollagenase A (Sigma, München, Germany) ergänzt. Die Präparate wurden vor der Isolation gewogen und die Kollagenasemenge (mg) anhand des Probengewichtes bestimmt. Es wurden 1 mg Kollagenase A pro Gramm Gewebe eingesetzt. Abschließend wurde die Kollagenasekonzentration des Isolationsmediums auf 1 mg/ml eingestellt.

**2.4. Medien zur Differenzierung von Stamm-/ Progenitorzellen**

Die adipogene, osteogene und chondrogene Differenzierung der Stamm-/ Progenitorzellen erfolgte durch Induktion mit spezifischen Medien (siehe auch 2.8. und 2.9.). Grundlage für die Differenzierungsmedien war das unter 2.3.1. beschriebene Kultivierungsmedium, da so

eine optimale Proliferation und Differenzierung der Stamm-/ Progenitorzellen erreicht werden konnte. Die Kultivierung und Differenzierung muriner Stamm-/ Progenitorzellen in Serum-freiem Medium war nicht erfolgreich und führte zu einem vollständigen Rückgang der Proliferation. Die Applikation der in dieser Arbeit verwendeten Medien führte bei allen erfolgreich isolierten Stamm-/ Progenitorzellisolaten zu einer osteogenen, adipogenen und chondrogenen Differenzierung.

#### 2.4.1. Medium zur osteogenen Induktion

Kultivierungsmedium (2.3.1.) wurde mit folgenden Additiven ergänzt:

|                   |                          |                            |
|-------------------|--------------------------|----------------------------|
| 0,1 $\mu\text{M}$ | Dexamethason             | (Merk, Darmstadt, Germany) |
| 10 mM             | $\beta$ -Glycerophosphat | (Sigma, München, Germany)  |

#### 2.4.2. Medium zur chondrogenen Induktion

Kultivierungsmedium (2.3.1.) wurde mit folgenden Additiven ergänzt:

|                   |                |                            |
|-------------------|----------------|----------------------------|
| 1 %               | ITS+ Premix    | (B&D, Heidelberg, Germany) |
| 0,1 $\mu\text{M}$ | Dexamethason   | (Merk, Darmstadt, Germany) |
| 1 mM              | L-Prolin       | (Sigma, München, Germany)  |
| 10 ng/ml          | TGF- $\beta_3$ | (R&D, Wiesbaden, Germany)  |

#### 2.4.3. Medium zur adipogenen Induktion

Kultivierungsmedium (2.3.1.) ohne Vitamin C wurde mit folgenden Additiven ergänzt:

|                   |              |                            |
|-------------------|--------------|----------------------------|
| 2 $\mu\text{M}$   | Insulin      | (Sigma, München, Germany)  |
| 500 $\mu\text{M}$ | IBMX         | (Sigma, München, Germany)  |
| 1 $\mu\text{M}$   | Dexamethason | (Merk, Darmstadt, Germany) |
| 200 $\mu\text{M}$ | Indomethacin | (Sigma, München, Germany)  |

#### 2.4.4. Medium zum Erhalt adipogener Differenzierung

Kultivierungsmedium (2.3.1.) ohne Vitamin C wurde mit 2  $\mu\text{M}$  Insulin (Sigma, München, Germany) ergänzt.

### 2.5. **Techniken der Kultivierung von Stamm-/ Progenitorzellen**

Murine und humane Stamm-/ Progenitorzellen wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in einem Zellkulturinkubator kultiviert. Für die Arbeiten wurden autoklavierte oder sterilisierte Materialien und Lösungen verwendet. Alle Arbeiten wurden unter sterilen Werkbänken durchgeführt. Die Kultivierung der Stamm-/ Progenitorzellen erfolgte entweder auf

Gewebekulturplastik- (TPP, Trasadingen, Switzerland) oder Glasoberflächen (BD Falcon *Culture Slides*; B&D, Franklin Lakes, USA).

### 2.5.1. Ablösen, Zentrifugieren und Passagieren von Stamm-/ Progenitorzellen

*Lösungen:*

#### Trypsin / EDTA (steril)

2,5 % Trypsin und 1 % EDTA wurden in PBS zu folgender Endkonzentration verdünnt:

|        |         |                             |
|--------|---------|-----------------------------|
| 0,05 % | Trypsin | (PAA, Pasching Austria)     |
| 0,01 % | EDTA    | (Biochrom, Berlin, Germany) |

#### Trypanblau (0,4 %) Vitalitätsfärbung

0,4 % (w/v) Trypanblau (Sigma, München, Germany) wurde in PBS gelöst und anschließend steril filtriert.

*Durchführung:*

Die Stamm-/ Progenitorzellen wurden bei Erreichen einer 80-90 %-igen Zellkonfluenz in die nächste Passage überführt. Das Medium wurde vorsichtig abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, um Mediumrückstände zu entfernen. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit Trypsin / EDTA für 2 min bei 37 °C. Das Ablösen der Zellen wurde unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Die Zellen wurden unter Verwendung einer 5 ml-Pipette mit 5 ml Kultivierungsmedium von den Schalen gespült, in 10 ml Kultivierungsmedium aufgenommen und anschließend für 5 min bei 250 x g zentrifugiert. Die abzentrifugierten Zellen wurden mit einer 5 ml-Pipette in Kultivierungsmedium resuspendiert und ihre Zellzahl und Vitalität bestimmt. Zu diesem Zweck wurden 10 µl der Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau (0,4 %) gefärbt. 10 µl der gefärbten Zellsuspension wurden mit einer Pipettierhilfe in eine THOMA-Zählkammer gegeben. Im Anschluss an die Bestimmung der Zellvitalität wurde die Zellzahl pro ml mit folgender Formel errechnet:

$$\frac{\text{Zellzahl(vital)}}{\text{ml}} = \frac{\text{Zellzahl(vital)}}{64} \times 10^6$$

Im Anschluss wurden die Zellen entweder kryokonserviert (2.5.2.) oder mittels einer 5 ml-Pipette in 10 ml Kultivierungsmedium resuspendiert und erneut in einer Zelldichte von  $1 \times 10^4$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  auf Gewebekulturflaschen ausplattiert.

### 2.5.2. Kryokonservierung von Stamm-/ Progenitorzellen

*Lösungen:*

#### Medium zur Kryokonservierung

Kultivierungsmedium (2.3.1.) wurde mit 8 % Dimethylsulfoxid (DMSO; Sigma, München, Germany) ergänzt, steril filtriert und anschließend zum Einfrieren der Zellen verwendet.

*Durchführung:*

Die Stamm-/ Progenitorzellen wurden, wie unter 2.5.1. beschrieben, von den Gewebekulturschalen abgelöst, zentrifugiert und in 1,8 ml Medium zur Kryokonservierung unter Verwendung einer 2 ml-Pipette resuspendiert. Die Zellen wurden in ein Einfrierröhrchen (TPP, Trasadingen, Switzerland) gegeben und dieses für 12 Stunden in einem Kryo-Container (Nalge Europe Ltd, Neerijse, Belgium) bei -80 °C gelagert. Abschließend wurde das Einfrierröhrchen zur Langzeitkryokonservierung in flüssigen Stickstoff (-196 °C) überführt. Zur Re-Kultivierung der in Stickstoff gelagerten Zellproben, wurden diese im Wasserbad (37 °C) rasch aufgetaut und die noch kalte Zellsuspension mittels einer 2 ml-Pipette in 10 ml Kultivierungsmedium überführt und für 5 min bei 250 x g zentrifugiert. Der Mediumüberstand wurde abgesaugt und die Zellen in 5 ml Kultivierungsmedium resuspendiert. Ihre Zellzahl und Vitalität wurde wie unter 2.5.1. beschrieben bestimmt. Abschließend wurden die Zellen in einer Dichte von  $1 \times 10^4$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  auf Gewebekulturflaschen ausplattiert.

### 2.6. **Techniken zur Isolation von Stamm-/ Progenitorzellen**

Die Isolation muriner (Aktenzeichen: V742-72241.122-4; Kramer) und humaner (Aktenzeichen: 04-183; Schlenke/Kirchner) mesenchymaler Stamm-/ Progenitorzellen erfolgte unter Beachtung der Anzeigepflicht und der von der Universität zu Lübeck geforderten wissenschaftlichen und ethischen Richtlinien zur Anzeige von Organentnahmen und Gewebematerial zu wissenschaftlichen Zwecken.

#### 2.6.1. Isolation muriner Stamm-/ Progenitorzellen aus dem Knochenmark

Die Präparation von Stamm-/ Progenitorzellen aus dem Knochenmark (Abb. 1A) der langen Röhrenknochen Femur und Tibia von NMRI Mäusen (Charles River Laboratories Inc., Wilmington, USA) erfolgte unter sterilen Bedingungen und unter Beachtung der Anzeigepflicht (siehe 2.6.). Mit Präparationsschere und Pinzette wurde das Hüftgelenk aufgesucht, der Femurkopf dargestellt und aus dem Gelenk luxiert. Femurkondylen und

Tibiaplateau wurden im Kniegelenk separiert, so dass die obere und untere Extremität getrennt vorlagen. Nach Entfernung des Weichteilmantels konnte das Knochenmark durch abheben des proximalen und distalen Femur- bzw. Tibiaplateaus freigelegt werden. Um eine Gerinnung des Knochenmarks zu verhindern, wurde dieses mit heparinisiertem Transfermedium (2.3.2.) unter Verwendung einer Kanüle ( $\varnothing$  0,4 mm) aus den Markhöhlen heraus gespült. Abschließend wurde die Markhöhle mit einer weiteren Kanüle ( $\varnothing$  0,9 mm) geweitet und erneut mit Transfermedium gespült. Das Zellisolat wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei  $250 \times g$  für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Transfermedium abgesaugt und die Zellen in 5 ml Kultivierungsmedium (2.3.1.) mit einer 5 ml-Pipette resuspendiert und auf Gewebekulturflaschen ( $25 \text{ cm}^2$ ) ausplattiert. Die isolierten Zellen wurden für 72 Stunden bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  im Brutschrank inkubiert. Nonadherente Zellen wurden durch Mediumwechsel nach 72 Stunden entfernt. Pro Isolation ( $n=10$ ) konnten jeweils ca.  $1,5 \times 10^5$  mononukleäre Zellen aus dem murinen Knochenmark gewonnen werden.

#### 2.6.2. Isolation muriner Stamm-/ Progenitorzellen aus perirenalem Fettgewebe

Die Präparation muriner Stamm-/ Progenitorzellen aus dem perirenalem Fettgewebe (Abb. 1B) von NMRI Mäusen erfolgte unter sterilen Bedingungen und unter Beachtung der Anzeigepflicht (siehe 2.6.). Die Darstellung des Retroperitoneums erfolgte von abdominal. Das perirenale Fettgewebe wurde steril entnommen, gewogen, in ca. 2-4 mm große Gewebsfragmente zerkleinert und in ein steriles mit Kollagenasemedium (2.3.3.) gefülltes Eppendorfgefäß überführt. Das Präparat wurde für 45-60 min bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  enzymatisch gelöst. Die Zellsuspension wurde anschließend mit 20 ml Kultivierungsmedium versetzt, durch ein steriles Sieb der Porengröße 0,5-1 mm filtriert und für 5 min bei  $250 \times g$  zentrifugiert. Die zentrifugierten Zellen wurden mit einer 5 ml-Pipette in 5 ml Kultivierungsmedium resuspendiert, auf Gewebekulturflaschen ausplattiert und für 72 Stunden bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  im Brutschrank inkubiert. Nonadherente Zellen wurden durch Mediumwechsel nach 72 Stunden entfernt. Pro Isolation ( $n=10$ ) konnten jeweils ca.  $4 \times 10^5$  mononukleäre Zellen aus dem murinen perirenalem Fettgewebe gewonnen werden.

#### 2.6.3. Isolation muriner Stamm-/ Progenitorzellen aus mediastinalem Bindegewebe

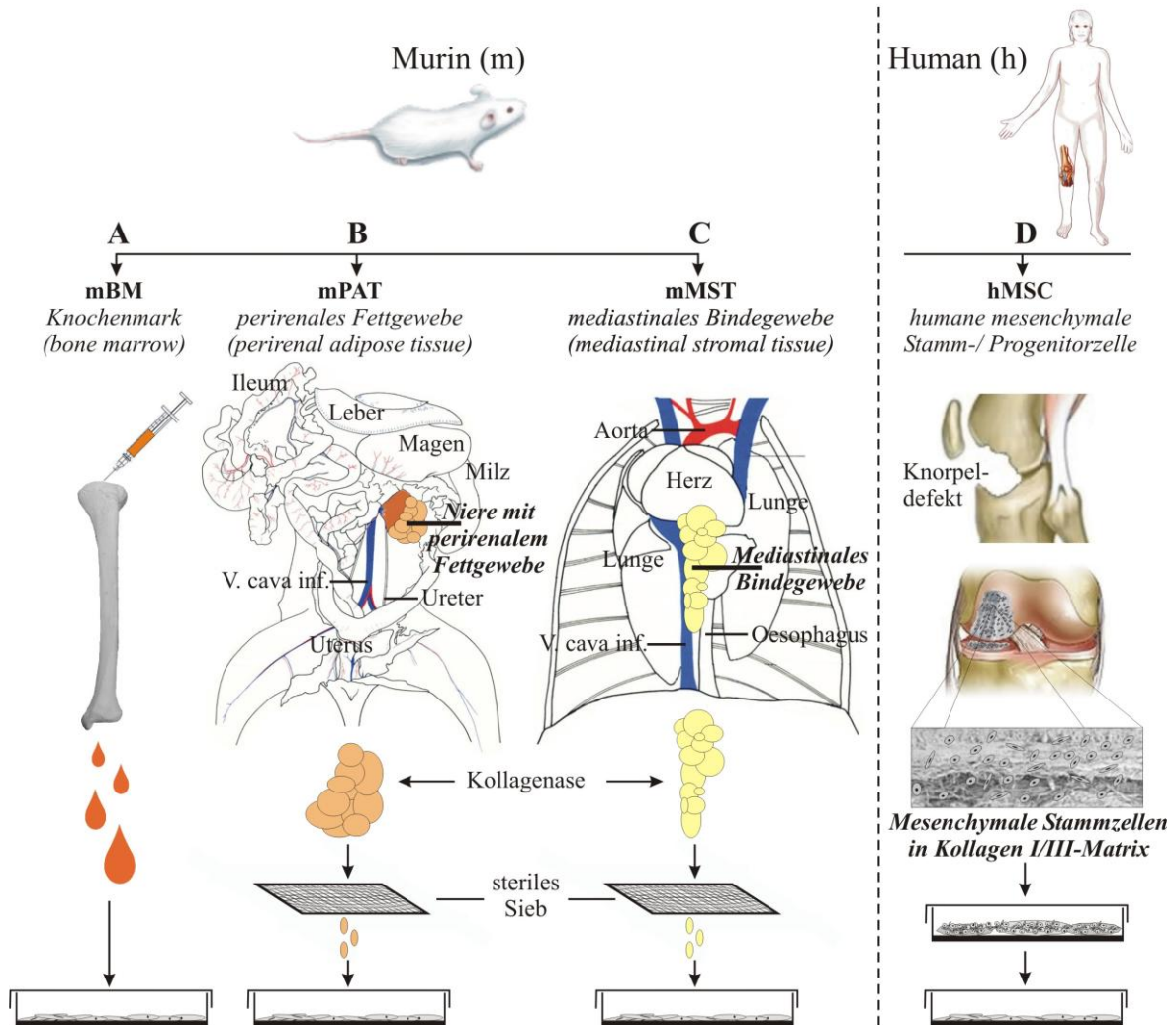
Die Präparation muriner Stamm-/ Progenitorzellen aus dem mediastinalen Bindegewebe (Abb. 1C) von NMRI Mäusen erfolgte unter sterilen Bedingungen und unter Beachtung der Anzeigepflicht (siehe 2.6.). Das Peritoneum wurde mit sterilem Präparationsbesteck

eröffnet und der sternocostale Winkel wurde von abdominal dargestellt. Die Eröffnung des Thorax erfolgte rechts und links entlang der sternocostalen Gelenkverbindungen. Sternum und Rippenbögen wurden nach zervikal und lateral luxiert, das mediastinale Präparat entnommen, gewogen und in ein steriles mit Kollagenasemedium (2.3.3.) gefülltes Eppendorfgesäß überführt. Der weitere Isolationsvorgang entsprach der Isolierung muriner Stamm-/ Progenitorzellen aus perirenalem Fettgewebe (2.6.2.). Pro Isolation (n=10) konnten jeweils ca.  $2,5 \times 10^5$  mononukleäre Zellen aus dem murinen mediastinalen Bindegewebe gewonnen werden.

#### 2.6.4. Isolation humaner Stamm-/ Progenitorzellen aus einer *in vivo* zur Defektheilung verwendeten Kollagen I/III-Matrix

Die Isolation humaner mesenchymaler Stamm-/ Progenitorzellen aus einer *in vivo* zur Defektheilung verwendeten Kollagen I/III-Matrix (Abb. 1D) erfolgte in Zusammenarbeit mit der Klinik für Chirurgie des Stütz- und Bewegungsapparates, Sektion für Orthopädie (Direktor: Prof. Dr. Russlies; Arbeitsgruppe: Prof. Dr. Behrens), unter Beachtung der Genehmigungspflicht (siehe 2.6.). Durch einen minimalinvasiven Zugang wurde im Verlauf der Behandlung eines Kniegelenksdefektes der degenerierte Kniegelenksknorpel entfernt und der subchondrale Knochen im Abstand von 5 mm mittels einer scharfen Kanüle bis zum Erreichen einer Blutung aus dem Knochenmark mikrofrakturiert. In den Defekt wurde für ca. 5 min eine Kollagen I/III-Matrix eingebracht, die gleichmäßig mit Knochenmarksblut gesättigt wurde. Die Matrix wurde entnommen und anhand einer Vorlage an den Knorpeldefekt angepasst. Die überschüssige Matrix wurde in PBS aufgenommen, im Labor unter Verwendung einer sterilen Schere und Pinzette in mehrere Stücke zerkleinert und zur Stammzellisolation in Gewebekulturflaschen mit Kultivierungsmedium überführt. Nonadherente Zellen wurden alle vier Tage durch Mediumwechsel entfernt. Nach zwei Wochen konnten erste Kolonien plastikadhärenter Zellen, die aus der Matrix ausgewachsen waren, detektiert werden. Die dem Knorpeldefekt angepasste Matrix wurde mittels eines autologen Fibrinklebers (Baxter-Immuno, Heidelberg, Germany; gemischt mit autologem Patientenserum) in den Defekt eingebracht. Das Kniegelenk wurde für 5 min in Extension gehalten und anschließend 10 x flektiert, um die Stabilität und Position der Matrix zu überprüfen. Der minimalinvasive Zugang wurde mehrschichtig verschlossen und es wurde eine Drainage (ohne Vakuum) angelegt. Das Kniegelenk wurde für 7 Tage mittels Orthese ruhiggestellt. Es folgte eine sechswöchige passive Bewegungstherapie und im Anschluss eine sechswöchige aktive Bewegungstherapie. Erste

Ergebnisse der 1-Jahr-Follow-Up Untersuchungen an 25 behandelten Patienten zeigten postoperativ eine funktionale Verbesserung der Kniegelenksfunktion sowie keine Ablösung der Matrix in magnetresonanztomographischen Untersuchungen (mündliche Mitteilung Prof. Behrens).



**Abbildung 1:** Isolierung muriner Stamm-/ Progenitorzellen aus Knochenmark (A), perirenalem Fettgewebe (B) und mediastinalem Bindegewebe (C) sowie Gewinnung humaner Stamm-/ Progenitorzellen aus einer Kollagen I/III-Matrix, die *in vivo* zur Defektheilung eines Knorpelschadens im Kniegelenk verwendet wird (D).

## 2.7. Analyse der Proliferations-, Telomerase- und Oberflächencharakteristika von Stamm-/ Progenitorzellen

Die Analyse der Proliferationskapazität von Stamm-/ Progenitorzellen erfolgte durch Bestimmung des täglichen Verdopplungsfaktors (V-Faktor) und Analyse der Telomeraseaktivität der Zellen.

### 2.7.1. Bestimmung des Verdopplungsfaktors

Der tägliche V-Faktor beschreibt die Proliferations- und Wachstumseigenschaften der Stamm-/ Progenitorzellen. Die Berechnung des V-Faktors erfolgte mittels folgender Formel:

$$K_n = K_0 \times (1 + v/100)^n$$

$K_n$  = Zellzahl nach dem Kultivierungszeitraum (n)  
 $K_0$  = Initial plattierte Zellzahl  
n = Kultivierungszeitraum in Tagen  
V-Faktor =  $(1 + v/100)$

Der V-Faktor wurde an verschiedenen Zeitpunkten während der Kultivierung bestimmt (n=6), quantifiziert und statistisch ausgewertet. Er beschreibt die Zunahme der Stamm-/ Progenitorzellpopulation als Verdopplungsfaktor innerhalb von 24 Stunden.

### 2.7.2. Bestimmung der Telomeraseaktivität mittels Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Telomere sind spezialisierte DNA / Protein-Strukturen der chromosomalen Enden eukaryontischer Zellen. Telomerische DNA-Tandemrepeats ermöglichen die Bindung von telomerspezifischen zellulären Proteinen, die End-zu-End-Fusionen, irreguläre Rekombinationen und andere für die Zelle schädliche genomische Alterationen verhindern. Es ist beschrieben, dass Stammzellen eine Möglichkeit der Telomerverlängerung und somit der Genomprotektion besitzen (65). In Stammzellen kompensiert das Enzym Telomerase verloren gegangene Telomerasequenzen durch deren Resynthesierung anhand einer intrinsischen RNA Komponente (66,67). Der Nachweis der zellspezifischen Telomeraseaktivität muriner Stamm-/ Progenitorzellen erfolgte mittels des TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA<sup>PLUS</sup> (Roche, Mannheim, Germany). Alle im Folgenden genannten für die Reaktionen notwendigen Lösungen, Sonden und ELISA-platten waren Teil des Analysekits. Die Reaktionsabfolge gliederte sich in zwei Schritte:

#### 1. Elongation / Amplifikation:

Während eines PCR-Amplifikationsschrittes synthetisierte die zellspezifische Telomerase Telomerasequenzen (TTAGGG) an das 3'-Ende eines biotinmarkierten synthetischen Primers (P1-TS). Vergleichend wurde ein interner Standard von 216 Basenpaaren mitgeführt und in der gleichen Reaktion amplifiziert.



## 2. ELISA:

Die PCR-Produkte wurden denaturiert und mit Telomersequenz-spezifischen Digoxigenin (DIG)-markierten-Sonden hybridisiert. Die hybridisierten PCR-Amplifikate wurden über ihre Biotinmarkierung an eine Streptavidinmikroplatte gebunden, mit Hilfe eines Meerrettichperoxidase konjugierten Anti-DIG-Antikörpers markiert und durch Inkubation mit 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin (TMB) sichtbar gemacht. Anschließend wurde der durch die enzymatische Umsetzung des TMB sichtbare gelbe Farbumschlag mit Hilfe eines Luminometers ausgewertet und anhand der Intensität des Farbumschlags die proportionale Telomeraseaktivität bestimmt.

### 2.7.3. Durchflusszytometrische Analyse von Stamm-/ Progenitorzellen

#### *Lösungen:*

#### FACS (fluorescence activated cell sorting) Puffer (0,25 %)

Folgende Substanzen wurden in PBS gelöst:

|           |                      |                           |
|-----------|----------------------|---------------------------|
| 1 % (w/v) | Bovine Serum Albumin | (Sigma, München, Germany) |
| 0,1 %     | NaN <sub>3</sub>     | (Sigma, München, Germany) |

#### *Durchführung:*

Die durchflusszytometrischen Analysen der Stamm-/ Progenitorzellen erfolgten jeweils in der 4. Passage. Die zu analysierenden Zellen wurden wie unter 2.5.1. beschrieben von den Gewebekulturoberflächen abgelöst und zweimal mit FACS Puffer gewaschen. Anschließend wurde mittels FACS Puffer eine Zellsuspension von  $1 \times 10^5$  Zellen pro ml hergestellt. Im weiteren Verlauf wurden jeweils 100 µl dieser Zellsuspension mit je 10 µl Phycoerythrin (PE) konjugiertem monoklonalem Antikörper (mAk), 10 µl Fluorescein (FITC) konjugiertem mAk, 10 µl Allophycocyanin (APC) konjugiertem mAk oder 10 µl nicht-konjugiertem mAk sowie einem sekundären Ratte-anti-Maus IgG-FITC für 30 min bei 4 °C inkubiert. Um die isolierten Stamm-/ Progenitorzellen von Zellen der hämatopoetischen Linie zu unterscheiden, wurde die Expression der Oberflächenmarker CD34 (*gp105-120*) und CD45 (*leukocyte common antigen*) untersucht. Es wurden folgende Oberflächenantigene in die phänotypische Profilanalyse eingeschlossen: CD29 (*β1 integrin*), CD44 (*hyaluronan receptor*), CD49d (*α4 integrin*), CD54 (*intercellular adhesion molecule-1*), CD73 (*ecto-5'-nucleotidase*), CD81 (*target for anti-proliferative antigen-1*), CD105 (*endoglin*), CD106 (*vascular cell adhesion molecule 1*), CD140b (*platelet-derived growth factor receptor β*), CD166 (*activated leukocyte cell adhesion*

*molecule*) und Oct  $\frac{3}{4}$ . Zu Beginn der FACS Untersuchung wurden alle Proben mittels FACS Puffer auf ein einheitliches Volumen von 500  $\mu$ l aufgefüllt. Die Analyse erfolgte mittels eines Cytomics FC500 Durchflusszytometers und Cytomics CXP Software (Beckman Coulter, Krefeld, Germany). Es wurden mindestens 10.000 Events aufgezeichnet und mittels eines drei-parametrischen Analyseprotokolls ausgewertet (FL1, FL2 und FL4). Zelluläre Aggregate und Zellfragmente wurden durch Anpassen des Messfensters (FSC/SSC dotplot) ausgeschlossen. Die Hintergrundfluoreszenz wurde mittels unspezifischer Isotypkontrollen (IgG1, IgG2a, IgG2b und IgM) bestimmt. Alle Antikörper außer CD105, CD166, Oct  $\frac{3}{4}$  (RDSystems, Abingdon, U.K.) sowie CD34 und CD140b (eBioscience, San Diego, CA, USA) wurden von Becton & Dickinson (Heidelberg, Germany) erworben.

## **2.8. Klassisches Monolayer- und MicroMassBody-System zur Differenzierung von Stamm-/ Progenitorzellen**

### **2.8.1. Osteogene und adipogene Differenzierung im klassischen Monolayer-System**

In den Passagen p5, p9 und p12 erfolgte die osteogene und adipogene *in vitro*-Differenzierung der murinen Stamm-/ Progenitorzellen im klassischen Monolayer. Die osteogene und adipogene Differenzierung wurde in Gegenwart von Serum durchgeführt (19,36,68). Die Stamm-/ Progenitorzellen wurden auf Gewebekulturschalen ( $\emptyset$  6 cm) für RNA-Isolierung und *Culture Slides* für histochemische und immunhistochemische Färbungen ausgebracht. Ab einer Zellkonfluenz von 70-80 % erfolgte die spezifische Induktion der Stamm-/ Progenitorzellen.

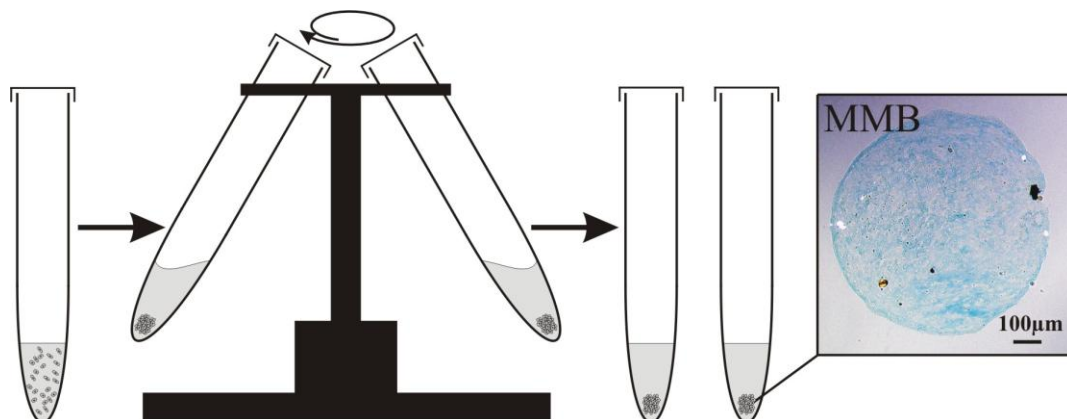
Mit Beginn der osteogenen Induktion wurde das Kultivierungsmedium (2.3.1.) durch das Medium zur osteogenen Induktion (2.4.1.) ersetzt und die Zellen über den Zeitraum von 25 Tagen differenziert. Das osteogene Induktionsmedium wurde alle vier Tage gewechselt und durch frisches Induktionsmedium ersetzt.

Mit Beginn der adipogenen Differenzierung wurde das Kultivierungsmedium (2.3.1.) durch das Medium zur adipogenen Induktion (2.4.3.) ersetzt. Einer 3-tägigen Induktion folgte eine Stabilisierung der adipogenen Differenzierung durch eine 4-tägige Kultivierung mit dem Medium zum Erhalt der adipogenen Differenzierung (2.4.4.). Die Induktionsphase wurde noch zweimal wiederholt, jedesmal gefolgt von einer Stabilisierungsphase. Abschließend erfolgte eine 4-tägige Differenzierung der Stamm-/ Progenitorzellen im Medium zum Erhalt der adipogenen Differenzierung (2.4.4.). Im Rahmen aller Differenzierungsversuche wurden an den Tagen 0, 9, 18 und 25 Proben für histochemische

(siehe 2.12.) und immunhistochemische Färbungen (siehe 2.13.) sowie für Analysen der Genexpression (siehe 2.14.) entnommen.

### 2.8.2. Chondrogene Differenzierung im klassischen MicroMassBody-System

In den Passagen p5, p9 und p12 erfolgte die chondrogene Differenzierung der Stamm-/ Progenitorzellen im klassischen MicroMassBody (MMB (69); Abb. 2). Im humanen System erfolgt die chondrogene Differenzierung meist ohne Serum (19). Im murinen Model hingegen konnte die chondrogene Differenzierung in Gegenwart von FKS und TGF- $\beta$  bestätigt werden (70). Darüberhinaus zeigte sich die *in vitro*-Kultivierung von murinen Stamm-/ Progenitorzellen in Gegenwart von 15-20 % FKS verbessert (71). Aktuelle Publikationen beschreiben eine chondrogene Differenzierung unter dem Einfluss unterschiedlicher FKS Konzentrationen (72). Die chondrogene Differenzierung wurde daher in Gegenwart von 10 % FKS durchgeführt. Undifferenzierte Stammzellen wurden wie in 2.5.1. beschrieben von den Gewebekulturoberflächen abgelöst und in chondrogenem Induktionsmedium (2.4.2.) resuspendiert. Aliquote von 0,5 ml mit je  $2 \times 10^5$  Zellen wurden in konische Gewebekulturröhrchen (15 ml) überführt und für 10 min bei  $65 \times g$  zentrifugiert. Diese wurden im Anschluss bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  im Brutschrank inkubiert. Um einen guten Sauerstoffaustausch zu gewährleisten sowie externe Kontaminationen zu vermeiden, behielten die Röhrchen eine sterile luftdurchlässige Schutzkappe. Innerhalb von 24 Stunden nach Inkubation wurde ein Zellaggregat sichtbar, das im Verlauf der Differenzierung keine Adhärenz zur Wand des Röhrchens zeigte. Im Verlauf des Differenzierungszeitraums von 25 Tagen wurde das chondrogene Induktionsmedium alle vier Tage erneuert und Proben zur Erstellung von histologischen Kryopräparaten (2.11.1.) sowie für Analysen der Genexpression (siehe 2.14.) entnommen.



**Abbildung 2:** Klassische MicroMassBody (MMB)-Kultivierung zur chondrogenen Differenzierung muriner und humaner Stamm-/ Progenitorzellen. Der MMB wurde mittels Alcianblau zur Darstellung knorpeltypischer Proteoglykane gefärbt.

## 2.9. Etablierung einer 3D-Kultivierungsmethode zur adipogenen, osteogenen und chondrogenen Differenzierung mesenchymaler Stamm-/ Progenitorzellen.

Die Charakterisierung von Stamm-/ Progenitorzellen im Monolayer- bzw. MMB-System erfordert hohe Zellzahlen. Um diese zu generieren, ist eine verlängerte *in vitro*-Kultivierung sowie eine wiederholte Passagierung der isolierten Stamm-/ Progenitorzellen erforderlich (siehe 2.10.; Tabelle 1). Ein standardisiertes System der *in vitro*-Charakterisierung sollte daher bei geringerer Zellzahl und geringerem Zeitaufwand eine effizientere Differenzierung mesenchymaler Stamm-/ Progenitorzellen ermöglichen. Die Differenzierung embryonaler Stamm (ES)-zellen in dreidimensionalen Zellaggregaten, sogenannten „Embryoid Bodies“ (EBs) wurde bereits erfolgreich *in vitro* angewandt (62,63). In Anlehnung an diese Methode wurde das System der *in vitro*-Differenzierung adulter Stammzellen in der *Mesenchymalen MicroSphäre* (MMS; Abb. 3) etabliert, auch wenn adulte Stammzellen und ES-Zellen unterschiedliche Eigenschaften zeigen (62). Die Verwendung des MMS-Systems führt zu einer Reduktion der für die Charakterisierung der *in vitro*-Differenzierung nötigen Zellzahl um 70 % im Vergleich zu klassischen Protokollen. Die MMS-Differenzierung der Stamm-/ Progenitorzellen erfolgte in den Passagen p5, p9 und p12. Im Rahmen der Differenzierungsversuche wurden an den Tagen 0, 9, 18 und 25 nach Induktionsbeginn Proben für histochemische (siehe 2.12.) und immunhistochemische Färbungen (siehe 2.13.) sowie für Analysen der Genexpression (siehe 2.14.) entnommen. Am Tag 0 liegt ein undifferenzierter, zumindest nicht durch Applikation von Differenzierungsmedium induzierter Zustand der Stamm-/ Progenitorzellen vor. Die Differenzierung *via* MMS umfasst:

1. Herstellung von MMS im „hängenden Tropfen“ in einem Zeitraum von 6 Tagen (-10d bis -4d)
2. Plattierung der MMS auf Gewebekulturflächen und Kultivierung für 4 Tage (-4d bis 0d)
3. Induktion (0d) und Differenzierung der MMS für bis zu 25 Tage (25d)

### 2.9.1. Herstellung der MMS im „hängenden Tropfen“

Wesentlich für die Vergleichbarkeit der Differenzierung zwischen den einzelnen MMS ist eine einheitliche Größe der Zellaggregate. Für die Herstellung der MMS wurden die Stamm-/ Progenitorzellen wie unter 2.5.1. beschrieben von den Gewebekulturschalen abgelöst. Anschließend wurde mit Kultivierungsmedium (2.3.1.) eine Zellsuspension mit einer Konzentration von 250.000 Zellen pro ml erstellt. Mit Hilfe einer sterilen Pipette

wurden jeweils 5.000 Zellen (20  $\mu$ l) der Zellsuspension entnommen und 70 Tropfen á 20  $\mu$ l auf den Boden einer bakteriologischen Petrischale ( $\varnothing$  10 cm) pipettiert (Abb. 3A). Anschließend wurden die Böden der bakteriologischen Petrischalen um 180° gewendet und auf den Deckel der Petrischale gesetzt (Abb. 3B). Um ein Austrocknen der MMS während der 6-tägigen Aggregation zu verhindern, wurde der Deckel einer Gewebekulturschale ( $\varnothing$  6 cm) in die MMS-Kultivierungskammer gesetzt und mit PBS gefüllt (Abb. 3B und C). Bereits nach zweitägiger Kultivierung im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> zeigten sich im „hängenden Tropfen“ erste Zellaggregate (Abb. 3C). Nach 4 weiteren Tagen waren stabile MMS entstanden.

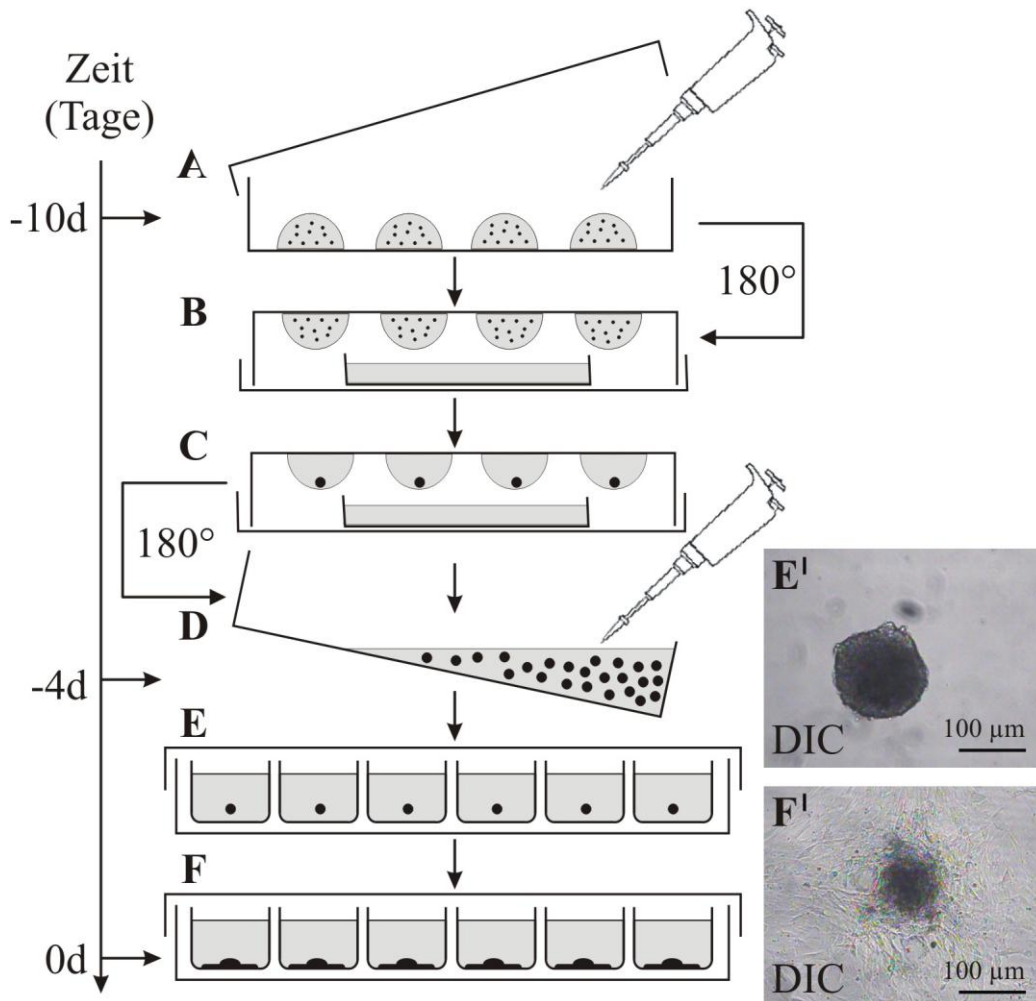
### 2.9.2. Plattieren der MMS auf Gewebekulturflächen

Da mesenchymale Stamm-/ Progenitorzellen zu einer ausgeprägten Plastikadhärenz neigen, wurde im MMS-System auf eine, wie für EBs beschriebene, Suspensionskultur verzichtet. Die MMS wurden nach 6 Tagen umgehend durch Hinzugabe von 10 ml Kultivierungsmedium vorsichtig von den bakteriologischen Petrischalen gespült und mittels einer 100  $\mu$ l Pipettierhilfe auf Gewebekulturschalen und 2-Kammer (*well*)-*Culture Slides* ausplattiert (Abb. 3D und E). Es wurden jeweils 10 MMS pro Kulturschale ( $\varnothing$  6 cm) und 5 MMS pro *Culture Slide*-Kammer ausplattiert. Das Auswachsen der MMS wurde über einen Zeitraum von 4 Tagen lichtmikroskopisch kontrolliert.

### 2.9.3. Induktion und Differenzierung plattierter MMS

Am Tag 0 der Differenzierung wurden die im MMS kultivierten Stamm-/ Progenitorzellen mittels der unter 2.4.1. bis 2.4.4. beschriebenen Differenzierungsmedien induziert (Abb. 3F) und über einen Zeitraum von 25 Tagen differenziert.

Das MMS-System ermöglichte eine erfolgreiche Differenzierung der untersuchten Zellisolate. Die Charakterisierung der Stamm-/ Progenitorzellen erforderte dabei nur 1/7 der für die herkömmliche Monolayer- bzw. MMB-Differenzierung erforderlichen Zellmengen. Eine verlängerte *in vitro*-Kultivierung konnte so vermieden werden. Die für ein Screening der osteogenen, adipogenen und chondrogenen MMS-Differenzierung notwendigen Zellmengen und Passagen sind in Tabelle 2 (siehe 2.10.) beschrieben.



**Abbildung 3:** Kultivierung adulter Stamm-/ Progenitorzellen via *Mesenchymaler Micro-Sphären* (MMS). MMS zeigen initial eine gleichmäßig runde Form (E, E'); nach dem Plattieren wachsen sie auf den Gewebekulturoberflächen aus (MMS *outgrowth*; F, F'). (DIC= Differential-Interferenz-Kontrast)

## 2.10. Screening-Verfahren zur Beschreibung der Differenzierungsfähigkeit von Stamm-/ Progenitorzellen

In Tabelle 1 werden die Stamm-/ Progenitorzellmengen dargestellt, die für einen Nachweis der Differenzierung im klassischen Monolayer- bzw. MMB-System als Screening-Test erforderlich sind. Hierfür wurde angenommen, dass die Differenzierung zumindest an einem Probenstag (z.B. 14d) mittels histochemischer Färbungen (je ein *well* (2 cm<sup>2</sup>) eines 2-Kammer-*Culture Slides* für jeweils die adipogene und osteogene Differenzierung bzw. 1 MMB für die chondrogene Differenzierung) und RT-PCR (je eine 6 cm-Gewebekulturschale (22,1 cm<sup>2</sup>) für jeweils die adipogene und osteogene Differenzierung bzw. 4 MMB für die chondrogene Differenzierung) analysiert wird. Die zur Charakterisierung der Differenzierung erforderlichen Zellzahlen werden durch zeitaufwendiges Passagieren

erreicht. Das Zeitintervall betrug pro Passage ca. 5-7 Tage. Je mehr Passagen benötigt werden, desto größer ist der Zeitverlust. Weiterhin muss beachtet werden, dass die Zellentnahme zur Charakterisierung der Differenzierung (= Populationsanteil) die verbliebene Zellpopulation, die theoretisch zur medizinischen Applikation verbleibt, verkleinert. Dies bedingt, dass diese verbliebene Population wiederum durch Passagieren vermehrt werden muss. Je geringer also die Zellentnahme zur Charakterisierung der Differenzierung ist, desto schneller und erfolgreicher kann eine Applikation mesenchymaler Stamm-/ Progenitorzellen *in vivo* erfolgen.

**Tabelle 1:** Screening der Differenzierungsfähigkeit von mesenchymalen Stamm-/ Progenitorzellen im klassischen **Monolayer-** bzw. **MMB-System**.

| <b>Adipogene &amp; Osteogene</b><br>Differenzierung | Initial erforderliche Zellzahl<br>und Gewebekulturoberfläche<br>(1 x 10 <sup>4</sup> Zellen / cm <sup>2</sup> ) | Passagenzahl zur Generierung der<br>erforderlichen Zellzahl und ihr Anteil an<br>der Gesamtpopulation (%) |
|---|---|---|
| <b>Monolayer</b>                                    |   |   |
| Osteogen  | 241.000 Zellen / 24,1 cm <sup>2</sup>   |   |
| Adipogen  | 241.000 Zellen / 24,1 cm <sup>2</sup>   |   |
| <b>Σ Monolayer</b>                                  | <b>482.000 Zellen / 48,2 cm<sup>2</sup></b>   | <b>Passage 2<br/>Populationsanteil 96,4 %</b>   |
| <b>Chondrogene</b><br>Differenzierung               | Initial erforderliche Zellzahl<br>(200.000 Zellen / MMB)  |   |
| <b>MMB</b>  |   |   |
| Chondrogen  | 1.000.000 Zellen / 5 MMB  |   |
| <b>Σ Monolayer + MMB</b>                            | <b>1.482.000 Zellen</b>   | <b>Passage 4<br/>Populationsanteil 74,1 %</b>   |

In Tabelle 2 werden die Stamm-/ Progenitorzellmengen dargestellt, die für einen Screening-Test der Differenzierung im MMS-System erforderlich sind. Hierfür wurde angenommen, dass die Differenzierung zumindest an einem Probenstag (z.B. 14d) mittels histochemischer Färbungen (je 5 MMS für jeweils die adipogene, osteogene und chondrogene Differenzierung) und RT-PCR (je 10 MMS für jeweils die adipogene, osteogene und chondrogene Differenzierung) analysiert wird. Durch das MMS-Verfahren wird zur erfolgreichen *in vitro*-Charakterisierung der Differenzierungsfähigkeit von Stamm-/ Progenitorzellen eine ca. 7-fach geringere Zellmenge benötigt. Ein zeitaufwendiges Passagieren kann so vermieden werden.

**Tabelle 2:** Screening der Differenzierungsfähigkeit von mesenchymalen Stamm-/ Progenitorzellen im **MMS-System**.

| <b>Adipogene &amp; Osteogene</b><br>Differenzierung | Initial erforderliche Zellzahl<br>(5.000 Zellen / MMS) | Passagenzahl zur Generierung der<br>erforderlichen Zellzahl und ihr Anteil an<br>der Gesamtpopulation (%) |
|---|--|---|
| <b>MMS</b>  |  |   |
| Osteogen  | 75.000 Zellen / 15 MMS                                 |   |
| Adipogen  | 75.000 Zellen / 15 MMS                                 |   |
| <b>Σ</b>  | <b>150.000 Zellen / 30 MMS</b>                         | <b>Passage 1<br/>Populationsanteil 93 %</b>   |
| <b>Chondrogene</b><br>Differenzierung               | Initial erforderliche Zellzahl<br>(5.000 Zellen / MMS) |   |
| <b>MMS</b>  |  |   |
| Chondrogen  | 75.000 Zellen / 15 MMS                                 |   |
| <b>Σ MMS Gesamt</b>                                 | <b>225.000 Zellen / 45 MMS</b>                         | <b>Passage 2<br/>Populationsanteil 45 %</b>   |

### 2.11. Analysemethoden zur Charakterisierung der Differenzierung von Stamm-/ Progenitorzellen

Zum Nachweis der Differenzierung muriner und humaner Stamm-/ Progenitorzellen wurden histochemische und immunhistochemische Färbungen von MMB-Kryopräparaten oder auf *Culture Slides* kultivierten Stamm-/ Progenitorzellen angefertigt und bei der detaillierten Analyse der Differenzierung an den Tagen 0, 9, 18 und 25 ausgewertet.

#### 2.11.1. MMB-Kryopräparate chondrogen differenzierter Stamm-/ Progenitorzellen

Die im MMB (2.8.2.) kultivierten Stamm-/ Progenitorzellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, in Tissue-Tek<sup>®</sup> Cryomold<sup>®</sup> Gefrierschalen (Sakura, Tokyo, Japan) gegeben, mit Tissue-Tek<sup>®</sup> O.C.T<sup>™</sup> Compound (Sakura, Tokyo, Japan) eingedeckt und für mindestens 24 Stunden bei -80 °C gelagert. Anschließend wurden mittels eines Kryotoms (Cryostat, Reichert & Jung Frigocut 2800) Gefrierschnitte in einer Dicke von 10 µm und 20 µm angefertigt und auf Objektträger aufgebracht, die bei -80 °C gelagert wurden. Die Kryoschnitte wurden für weitere Analysen aufgetaut, dreimal mit PBS gewaschen und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.



### 2.11.2. Eindeckmedium für histochemische und immunhistochemische Färbungen sowie Darstellung intranukleärer DNA

Histochemisch oder immunhistochemisch gefärbte Präparate wurden zur längeren Aufbewahrung mit 350 µl VECTASHIELD® Mounting Medium (Vector Inc., Burlingame, USA) eingedeckt. Zur Darstellung intranukleärer DNA wurde 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI; Sigma, München, Germany) 1:1000 in VECTASCHIELD® Mounting Medium verdünnt.

## 2.12. Histochemische Analysemethoden zur Charakterisierung der Differenzierung von Stamm-/ Progenitorzellen

### 2.12.1. Nachweis alkalischer Phosphatase zur Darstellung der osteogenen Differenzierung

Ein Charakteristikum osteogener Differenzierung ist die Expression alkalischer Phosphatase (AP). Der histochemische AP-Nachweis wurde unter Verwendung des Alkalischen Phosphatase-Kits (Sigma, München, Germany) durchgeführt.

*Lösungen:*

#### Citrat-Formaldehyd-Fixierlösung

|        |                  |                             |
|--------|------------------|-----------------------------|
| 2,5 ml | Citrat-Lösung    | (Sigma, München, Germany)   |
| 6,5 ml | Aceton           | (Roth, Karlsruhe, Germany)  |
| 0,8 ml | Formaldehyd 37 % | (Merck, Darmstadt, Germany) |

#### Naphthol-Färbelösung

|         |                               |                           |
|---------|-------------------------------|---------------------------|
| 125 µl  | Natrium-Nitrit-Lösung         | (Sigma, München, Germany) |
| 125 µl  | Alkalische Phosphatase-Lösung | (Sigma, München, Germany) |
| 125 µl  | Naphthol-Lösung               | (Sigma, München, Germany) |
| 5,63 ml | <i>Aqua dest.</i>             |                           |

*Durchführung:*

Zunächst wurden Mediumrückstände entfernt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und 30 sec mit der Citrat-Formaldehyd-Fixierlösung fixiert. Im Anschluss wurde die Fixierlösung durch zweimaliges Spülen mit *Aqua dest.* entfernt. Anschließend wurde die Naphthol-Färbelösung auf die Probe gegeben und das Präparat 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Naphthol-Färbelösung wurde nach der Inkubation abgesaugt und Rückstände gründlich mit *Aqua dest.* entfernt. Abschließend wurden die Präparate mit

Hämatoxylin gefärbt (73), mit H<sub>2</sub>O gewaschen und in VECTASHIELD (2.11.2.) eingedeckt und bei 4 °C gelagert.

#### 2.12.2. Sudan III Färbung zur Darstellung der adipogenen Differenzierung

Sudan III, ein in Kohlenwasserstoffen, Ölen, Fetten und Wachsen löslicher Azofarbstoff, wurde zur Darstellung intrazellulärer Lipidvakuolen verwendet.

*Lösungen:*

##### Sudan III Färbelösung

0,3 % (w/v) Sudan III (Sigma, München, Germany) wurde in 70 % Ethanol gelöst, 15 min auf 60 °C erhitzt und anschließend steril filtriert.

*Durchführung:*

Zunächst wurden Mediumrückstände entfernt, die Präparate zweimal mit PBS gewaschen und anschließend die Färbelösung aufgebracht. Der Färbeprozess konnte unter dem Mikroskop beobachtet werden. Nach 3 min wurde die Färbelösung abgesaugt, Rückstände durch Spülen mit PBS entfernt und das Präparat in VECTASHIELD (2.11.2.) eingedeckt und bei 4 °C gelagert.

#### 2.12.3. Alcianblau Färbung zur Darstellung der chondrogenen Differenzierung

Alcianblau (AB), ein wasserlöslicher Phthalocyaninfarbstoff, wird zur selektiven Darstellung saurer Mukosubstanzen, insbesondere knorpelspezifischer Proteoglykane genutzt.

*Lösungen:*

##### Formaldehyd-Fixierung

3,7 %                      Formaldehyd-Lösung    (Roth, Karlsruhe, Germany)

##### 0,05 % AB-Färbelösung, pH 1,5

Folgende Substanzen wurden in 3 % Essigsäure gelöst:

|              |                |                             |
|--------------|----------------|-----------------------------|
| 154 mM       | NaCl           | (Merck, Darmstadt, Germany) |
| 134,4 mM     | MgCl           | (Merck, Darmstadt, Germany) |
| 0,05 % (w/v) | Alcianblau 8GX | (Sigma, München, Germany)   |

*Durchführung:*

Zunächst wurden Mediumrückstände entfernt und die Präparate zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden diese mit Formaldehyd-Lösung fixiert, und die

Fixierung nach 30 min abgesaugt, die Zellen dreimal mit PBS gespült und über Nacht bei Raumtemperatur mit AB-Färbelösung gefärbt. Am nächsten Morgen wurde die Färbelösung entfernt. Die Präparate wurden mit PBS gespült und anschließend in VECTA-SHIELD (2.11.2.) eingedeckt und bei 4 °C gelagert.

#### 2.12.4. Quantitative Auswertung der histochemischen Färbungen

Die Analyse der adipogenen, osteogenen und chondrogenen Differenzierung der Stamm-/ Progenitorzellisolate erfolgte mit Hilfe der Software ImageJ (NIH, Bethesda, USA) an den Tagen 0, 9, 18 und 25. Um die herkömmliche Monolayer- bzw. MMB-Differenzierung mit der neu etablierten Methode der MMS-Differenzierung vergleichen zu können, wurden die Bereiche differenzierter Zellen vermessen und in Relation zur gesamt-kultivierten Fläche statistisch ausgewertet. Der Anteil differenzierter Zellen wurde in Prozent angegeben.

Die Quantifizierung chondrogener Differenzierung von Stamm-/ Progenitorzellen im MMB erfolgte durch Bestimmung der AB-positiven Fläche von 4 Kryoschnitten pro Probenstag und Versuchsgruppe (n=3). Die AB-positiven Flächen wurden in Relation zu der Gesamtfläche des Kryoschnitts quantifiziert und in Prozent angegeben.

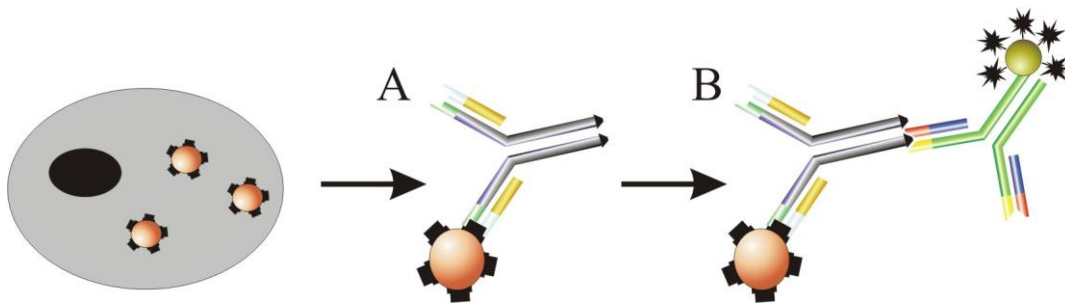
Die Auswertung Sudan III positiv gefärbter Stamm-/ Progenitorzellen umfasste jeweils 10 Flächeneinheiten á 0,235 mm<sup>2</sup> pro Tag und Versuchsgruppe (n=3). AP-positive Stamm-/ Progenitorzellen wurden durch Bestimmung von je 10 Flächen á 0,77 mm<sup>2</sup> pro Tag und Versuchsgruppe (n=3) quantifiziert. Sudan III und AP positive Zellflächen wurden in Relation zur gesamt-kultivierten Fläche der Messungen quantifiziert und in Prozent angegeben.

### 2.13. **Immunhistochemische Analysemethoden zur Charakterisierung der Differenzierung von Stamm-/ Progenitorzellen**

#### 2.13.1. Darstellung zelltypspezifischer Proteinexpression mittels indirekter Immunfluoreszenz

Eine Methode hoher Auflösung zum Nachweis gewebespezifischer Proteinexpression stellt die Immunfärbung (IF) dar (74). Ein primäres Immunglobulin (Ig) markiert ein zellspezifisches Protein (Abb. 4A) und wird seinerseits durch Bindung eines sekundären, fluoreszenzmarkierten Ig sichtbar gemacht (Abb. 4B). Die Anregung der entsprechenden Indocarbocyanin (Cy3)- bzw. Fluorescein (FITC)-Fluoreszenz durch ultraviolettes Licht charakteristischer Wellenlängen führte zur spezifischen Illuminanz des sekundären Antikörpers. Die für die Methoden der IF genutzten Antikörper und ihre Eigenschaften

sind in den Tabellen 3 und 4 genannt. Osteogen differenzierte Stamm-/ Progenitorzellen zeigen einen positiven Nachweis für Osteopontin und Bone Sialoprotein. Die Kollagene Typ II und Typ X konnten im Verlauf der chondrogenen Differenzierung nachgewiesen werden. Der Stromazellmarker STRO-1 wurde zur Charakterisierung humaner Stamm-/ Progenitorzellen aus einer *in vivo* zur Defektheilung verwendeten Kollagen I/III-Matrix genutzt.



**Abbildung 4:** Prinzip der Darstellung zelltypspezifischer Proteinexpression mittels indirekter Immunfluoreszenz

**Tabelle 3:** Monoklonale Primärantikörper zur Verwendung bei der indirekten Immunfluoreszenz. Angegeben sind Antigen, Name des Antikörpers, Spendertier sowie Verdünnungsverhältnis in PBS und eine Literaturangabe. Alle Antikörper wurden von der Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB, Iowa, USA) bezogen.

| Antigen                     | Name; Spendertier      | Verdünnung | Lit. |
|-----------------------------|------------------------|------------|------|
| Osteopontin                 | MPIIB10; Mus musculus  | 1 : 20     | (75) |
| Bone Sialoprotein           | WVID1; Mus musculus    | 1 : 20     | (76) |
| Kollagen Typ II             | II-II6B3; Mus musculus | 1 : 20     | (77) |
| Kollagen Typ X              | X-AC9; Mus musculus    | 1 : 20     | (78) |
| stromal cell surface marker | STRO-1; Mus musculus   | 1 : 50     | (29) |

**Tabelle 4:** Sekundärantikörper zur Verwendung bei der indirekten Immunfluoreszenz. Angegeben sind das Flurochrom-IgG, die Fluoreszenzmarkierung, die Absorption und die Emission sowie das Verdünnungsverhältnis in PBS. Die Anti-Maus-IgG wurden von der Dianova GmbH (Hamburg, Germany), die Anti-DIG-IgG von der Roche GmbH (Mannheim, Germany) erworben.

| Flurochrom-IgG | Fluoreszenz | Absorption | Emission | Verdünnung |
|----------------|-------------|------------|----------|------------|
| Anti-Maus-IgG  | FITC        | 495 nm     | 528 nm   | 1 : 200    |
| Anti-Maus-IgG  | Cy3         | 452 nm     | 565 nm   | 1 : 600    |
| Anti-DIG-IgG   | FITC        | 495 nm     | 528 nm   | 1 : 100    |

*Lösungen:*Methanol / Aceton Fixierung

Folgende Substanzen wurden im Verhältnis 7:10 angesetzt:

|       |          |                             |
|-------|----------|-----------------------------|
| 70 ml | Methanol | (Merck, Darmstadt, Germany) |
| 30 ml | Aceton   | (Roth, Karlsruhe, Germany)  |

7,5 % BSA-Blocking-Reagenz

7,5 % (w/v) Bovines Serum Albumin (Sigma, München, Germany) wurden in PBS gelöst:

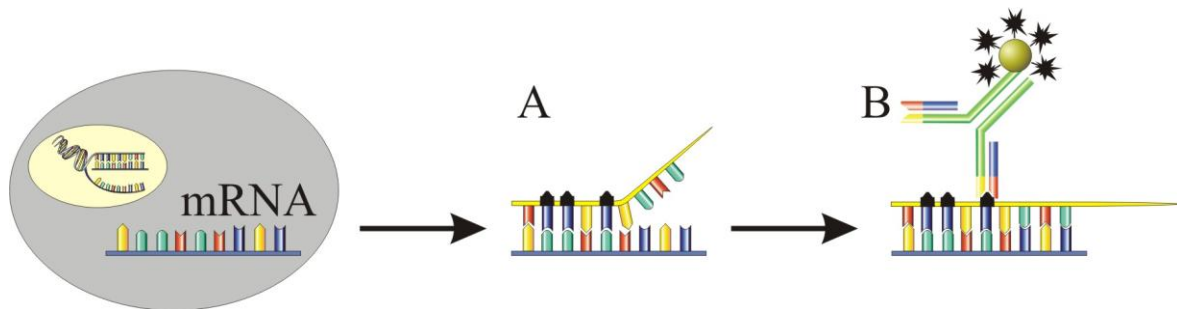
*Durchführung:*

Mit Stamm-/ Progenitorzellen kultivierte *Culture Slides* wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend für 5 min mit eiskaltem (-20 °C) Methanol / Aceton fixiert. Zur Darstellung intranukleärer DNA wurde DAPI im Verdünnungsverhältnis 1:1000 der Methanol / Aceton Fixierung hinzugefügt. Nach der Fixierung wurden Fixanzrückstände durch Spülen mit PBS entfernt. Freie unspezifische Antikörperbindungsstellen wurden mit 7,5 % BSA-Lösung für 30 min geblockt. Alle folgenden Inkubationsschritte wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt. Das BSA-Blocking-Reagenz wurde von den *Culture Slides* abgesaugt und die Proben mit jeweils 300 µl der primären Antikörperverdünnung (Tabelle 3) für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die primäre Antikörperverdünnung von den *Culture Slides* abgesaugt und Antikörperreste durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Danach wurde das Präparat für 1 Stunde bei 37 °C mit 300 µl der sekundären Antikörperverdünnung (Tabelle 4) inkubiert. Abschließend wurden die Objektträger mit PBS gewaschen und mit VECTASHIELD eingedeckt. Die Analyse und Auswertung der Proteinexpression erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie (Zeiss Axioplan 2 und Zeiss AxioStar plus; Zeiss, Oberkochen, Germany).

2.13.2. Darstellung zelltypspezifischer mRNA-Expression mittels Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung

Bei der Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung (FISH) erfolgt der Nachweis der „messenger“-Ribonukleinsäuren (mRNA) durch Hybridisierung des Gentranskripts mit einer spezifischen „Antisense“-mRNA-Sonde (Abb. 5A). Die mRNA-Hybridisierung kann durch einen gegen die Sonde gerichteten fluoreszenzmarkierten Antikörper *in situ* nachgewiesen werden (Abb. 5B). Als Negativkontrolle diente eine „Sense“-mRNA-Sonde mit der Nukleotidsequenz des nachzuweisenden mRNA-Transkripts. Die Kollokalisierung

von Gentranskript und spezifischer Proteinexpression kann durch die Kombination der Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung mit einer indirekten Immunfluoreszenz (2.13.1.) nachgewiesen werden.



**Abbildung 5:** Prinzip der Darstellung zelltypspezifischer mRNA-Expression mittels Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung

### 2.13.3. Herstellung der *in situ*-mRNA-Sonden

Die für die Synthese der mRNA-Sonden speziell klonierten Plasmide wurden mit freundlicher Unterstützung durch Frau Dr. Veronique Lefebvre (Lerner Research Institute, Cleveland, USA) zur Verfügung gestellt. Die Plasmide enthielten expressionsspezifische Sox5 oder Sox6 komplementäre Desoxyribonukleinsäuren (cDNA) sowie Promotoren für DNA-abhängige RNA-Polymerasen. Durch *in vitro*-Transkription der Plasmide konnte eine „Antisense“-mRNA-Sonde von der klonierten cDNA hergestellt werden. „Sense“-mRNA-Sonden wurden vom komplementären cDNA-Strang synthetisiert. Die Markierung der RNA-Sonden erfolgte mittels DIG-11-dUTP (DIG-RNA-Labeling-Kit; Roche, Mannheim, Germany).

*Lösungen:*

#### mRNA-*in vitro*-Transkriptionsreagenz

Folgende Substanzen wurden zur *in vitro*-Transkription in 20 µl (RNase- und DNase-freiem) H<sub>2</sub>O angesetzt:

|      |   |                            |
|------|---|----------------------------|
| 1 µg | linearisierte Sox5- oder Sox6-Plasmid-DNA |                            |
| 2 µl | DIG-RNA-Labeling-Mix                      | (Roche, Mannheim, Germany) |
| 2 µl | 10 x Transkriptionspuffer                 | (Roche, Mannheim, Germany) |
| 2 µl | RNA-Polymerase (SP6 oder T7)              | (NEB, Ipswich, USA)        |

*Durchführung:*

Das mRNA-*in vitro*-Transkriptionsreagenz wurde für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert und die Reaktion anschließend durch Zugabe von 2 µl 200 mM EDTA gestoppt. Die Konzentration der generierten Sonden wurde bei 260 und 280 nm photometrisch bestimmt.

#### 2.13.4. Hybridisierung der mRNA-Sonde

*Lösungen:*

##### In situ-Hybridisierung-Fixierungslösung

Folgende Substanzen wurden in 200 ml PBS gelöst:

|     |                 |                             |
|-----|-----------------|-----------------------------|
| 8 g | Paraformaldehyd | (Fluka, Buchs, Switzerland) |
| 8 g | D (+) – Sucrose | (Fluka, Buchs, Switzerland) |

Die Lösung wurde unter dem Abzug 1 Stunde bei 60 °C erhitzt, so dass sich das Paraformaldehyd vollständig lösen konnte. Anschließend wurde die Fixierungslösung auf 4 °C herunter gekühlt, aliquotiert und zur längeren Aufbewahrung bei -20 °C eingefroren.

##### Standard Saline Citrate (SSC)-Stammlösung 20 x, pH 7,0

Folgende Substanzen wurden in 800 ml *Aqua dest.* gelöst:

|         |                            |                             |
|---------|----------------------------|-----------------------------|
| 175,3 g | NaCl                       | (Merck, Darmstadt, Germany) |
| 88,2 g  | tri-Natriumcitrat-Dihydrat | (Merck, Darmstadt, Germany) |

Unter pH-Kontrolle wurde mit *Aqua dest.* ein Endvolumen von 1000 ml eingestellt und die Lösung anschließend autoklaviert. Durch Verdünnung der SSC-Stammlösung (20 x) mit *Aqua dest.* wurde eine 2 x SSC-, eine 0,2 x SSC- und eine 0,1 x SSC-Lösung hergestellt.

##### In situ-Hybridisierungslösung

Folgende Substanzen wurden in 100 ml *Aqua dest.* gelöst:

|       |                                   |                             |
|-------|-----------------------------------|-----------------------------|
| 25 ml | 20 x SSC-Stammlösung              |                             |
| 10 ml | 10 x Roche Blocking Reagenz       | (Roche, Mannheim, Germany)  |
| 20 µl | 10 % Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) | (Merck, Darmstadt, Germany) |

*Durchführung:*

Die FISH wurde in Anlehnung an ein etabliertes Protokoll zur *in situ*-Hybridisierung von EBs optimiert (79). Die auf *Culture Slides* kultivierten Zellpräparate wurden mit PBS gewaschen und bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer mit 1 ml Fixierungslösung für 20 min fixiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und unspezifische Proteine und Nukleinsäuren durch 15 min Inkubation mit 1 ml 2 x SSC bei 70 °C denaturiert. Die Präparate wurden mit PBS gewaschen und erneut für 5 min bei Raumtemperatur fixiert. Rückstände der Fixierungslösung wurden durch zweimaliges Waschen mit PBS und 2 x SSC entfernt. Im Anschluss wurden die Zellpräparate für jeweils 2 min in aufsteigender Ethanol-Reihe (50 %, 70 %, 95 %, 100 %, 100 %) dehydriert und luftgetrocknet. Die Präparate wurden in Sonden-freier Hybridisierungs-

lösung für 3 Stunden bei 45 °C prähybridisiert. Kurz vor Ablauf der Prähybridisierung wurde die verwendete DIG-RNA-Sonde (Sox5 oder Sox6) für 2 min bei 80 °C denaturiert und 1 µg der Sonde in 1000 µl frischer Hybridisierungslösung aufgenommen. Nach dem Entfernen der Sonden-freien Prähybridisierungslösung wurde die Probe bei 45 °C über Nacht mit der entsprechenden Sonde hybridisiert. Am Folgetag wurden die Präparate in absteigender SSC-Reihe gewaschen (zweifach 2 x SSC, einfach 0,2 x SSC, zweifach 0,1 x SSC) und mit PBS gespült. Zur gleichzeitigen Durchführung einer indirekten Immunfluoreszenz (2.13.1.) wurden die Zellen 1 Stunde bei 37 °C mit 300 µl einer primären Antikörperverdünnung (Tabelle 3) inkubiert. Primärantikörperreste wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Anti-DIG-Antikörper zum selektiven Nachweis der mRNA-Sonde und sekundär Antikörper der indirekten Immunfluoreszenz (Tabelle 4) wurden im Anschluss zeitgleich aufgebracht. Die Darstellung intranukleärer DNA gelang durch Applikation von DAPI (Verdünnung 1:1000) in die Sekundärantikörperverdünnung. Das Präparat wurde abschließend mit PBS gewaschen, mit VECTASHIELD eingedeckt und unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt.

#### **2.14. Darstellung zelltypspezifischer Genexpression zur Charakterisierung der Differenzierung von Stamm-/ Progenitorzellen**

Die Expression gewebespezifischer mRNA während der *in vitro*-Differenzierung der Stamm-/ Progenitorzellen wurde mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) nachgewiesen (80). Die aus den Zellen isolierte RNA wurde aufgereinigt und mittels reverser Transkription (RT) in komplementäre (c) DNA umgeschrieben. Daraufhin erfolgte im Verlauf der PCR nach Anlagerung (Annealing) sequenzspezifischer Primerpaare an die cDNA die Amplifikation des primerspezifischen Genabschnitts. Das PCR-Produkt wurde im Anschluss mit Ethidiumbromid gefärbt, gelelektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Licht sichtbar gemacht. Die spezifische Genexpression wurde semiquantitativ bestimmt und statistisch ausgewertet.



#### 2.14.1. Sequenzspezifisches Primerdesign

Die Sequenzen der zu untersuchenden Gene wurden mit Hilfe der Internetplattform des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI, Bethesda, USA, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; 12.03.2009) sowie der Datenbank des „Ensembl“ Projektes (<http://www.ensembl.org/index.html>; 12.03.2009 (81)) identifiziert. Das Primerdesign erfolgte mit der Software „Primer3“ (<http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm>; 12.03.2009 (82)). Um kontaminierende genomische DNA von spezifischen Amplifikaten unterscheiden zu können, wurden die Primer so gewählt, dass sie um mindestens eine Intronsequenz voneinander getrennt waren. Hergestellt wurden die Primer durch die Firmen Eurogentech (Eurogentech, Seraing, Belgium) und Tib MolBiol (Tib MolBiol, Berlin, Germany). Eine detaillierte Beschreibung der verwendeten Primer und der primerspezifischen Reaktionsbedingungen findet sich in Tabelle 5 (murines System) und Tabelle 6 (humanes System).

**Tabelle 5:** Primer zur Verwendung bei der RT-PCR zum Nachweis zelltypspezifischer Genexpression bei **murinen** Proben. Falls keine Literaturquelle angegeben ist wurden die Primer im Rahmen der vorliegenden Arbeit etabliert.

|                             | Gen           | → Forward Primer (5'-3')<br>← Reverse Primer (5'-3')                   | Annealing<br>Temp. °C | Zyklen | Länge<br>(bp) | Literatur /<br>Genbank Nr. |
|-----------------------------|---------------|--|-----------------------|--------|---------------|----------------------------|
| Adipogene Differenzierung   | aP2           | → ATG CCT TTG TGG<br>GAA CCT<br>← GCT TGT CAC CAT<br>CTC GTT TT        | 58                    | 30     | 333           | NM<br>024406               |
|                             | PPAR $\gamma$ | → GCC TAA GTT TGA<br>GTT TGC TGT G<br>← TGT CAT CTT CTG<br>GAG CAC CTT | 58                    | 36     | 226           | NM<br>011146               |
|                             | Adipsin       | → CTG ACA GCC TTG<br>AGG ACG A<br>← AGA GCC CCA CGT<br>AAC CAC A       | 58                    | 36     | 356           | NM<br>013459               |
| Osteogene Differenzierung   | Osteopontin   | → TCA CTC CAA TCG<br>TCC CTA CA<br>← TGC TCA AGT CTG<br>TGT GTT TCC    | 58                    | 36     | 289           | AF<br>515708               |
|                             | Osteocalcin   | → GCA GGA GGG CAA<br>TAA GGT AG<br>← CAG GGC AGA GAG<br>AGA GGA CA     | 58                    | 36     | 267           | X<br>04142                 |
| Chondrogene Differenzierung | Aggrecan      | → CGC AGG GAT AAA<br>GGA CTG AA<br>← GAT GAA GTA GCA<br>GGG GAT GG     | 58                    | 35     | 220           | (83)                       |
|                             | Kollagen II   | → ACG GTG GCT TCC<br>ACT TCA<br>← TAC ATC ATT GGA<br>GCC CTG GA        | 58                    | 35     | 383           | (84)                       |
| Standard                    | GAPDH         | → GGA AGG GCT CAT<br>GAC CAC A<br>← CCG TTC AGC TCT<br>GGG ATG AC      | 62                    | 40     | 164           | ENSMUST<br>00000073605     |

**Tabelle 6:** Primer zur Verwendung bei der RT-PCR zum Nachweis zelltypspezifischer Genexpression bei **humanen** Proben. Falls keine Literaturquelle angegeben ist wurden die Primer im Rahmen der vorliegenden Arbeit etabliert.

|                             | Gen           | → Forward Primer (5'-3')<br>← Reverse Primer (5'-3')                       | Annealing<br>Temp. °C | Zyklen | Länge<br>(bp) | Literatur /<br>Genbank Nr. |
|-----------------------------|---------------|--|-----------------------|--------|---------------|----------------------------|
| Adipogene Differenzierung   | aP2           | → GCT TTG CCA CCA<br>GGA AAG TG<br>← ATG ACG CAT TCC<br>ACC ACC AG         | 60                    | 35     | 279           | (85)                       |
|                             | PPAR $\gamma$ | → AAA CTC TGG GAG<br>ATT CTC CT<br>← TCT TGT GAA TGG<br>AAT GTC TT         | 56                    | 35     | 247           | (85)                       |
|                             | C/EBP         | → AGA AAG GGG TGG<br>AAA CAT AGG<br>← GAA AGC TGA GGG<br>CAA AGG           | 58                    | 35     | 685           | (85)                       |
| Osteogene Differenzierung   | Osteopontin   | → ACT GAT TTT CCC<br>ACG GAC CT<br>← CAT TCA ACT CCT<br>CGC TTT CC         | 58                    | 40     | 199           | X<br>13694                 |
|                             | Osteocalcin   | → CTC ACA CTC CTC<br>GCC CTA TT<br>← CGC CTG GGT CTC<br>TTC ACT AC         | 58                    | 40     | 143           | NM<br>199173               |
| Chondrogene Differenzierung | Aggrecan      | → GCA GAG ACG CAT<br>CTA GAA ATT G<br>← GGT AAT TGC AGG<br>GAA CAT CAT T   | 55                    | 31     | 504           | (86)                       |
|                             | Kollagen II   | → AGG CTC CCA GAA<br>CAT CAC CT<br>← ACA GTC TTG CCC<br>CAC TTA CC         | 55                    | 31     | 472           | (86)                       |
| Standard                    | GAPDH         | → CCG CAT CTT CTT<br>TTG CGT CGC<br>← GCA ACT GTG AGG<br>AGG GGA GAT TCA G | 55                    | 30     | 1100          | ENSG<br>00000111640        |

### 2.14.2. RNA-Isolierung

Die Isolierung gewebespezifischer RNA erfolgte mit dem NucleoSpin® RNA II Isolation-Kit (M&N, Düren, Germany).

#### *Lösungen:*

NucleoSpin® RNA II Isolations-Kit:

|            |                                    |
|------------|------------------------------------|
| Puffer RA1 | rDNase Reaktionspuffer             |
| Puffer RA2 | rDNase (RNase-frei, lyophilisiert) |
| Puffer RA3 | NucleoSpin® Filter L               |
| Puffer MDB | NucleoSpin® RNA Säulen             |

H<sub>2</sub>O (RNase-, DNase-frei)

(Invitrogen, Paisley, U.K.)

70 % Ethanol a.d.

(Roth, Karlsruhe, Germany)

β-Mercaptoethanol

(Sigma, München, Germany)

#### *Durchführung:*

Die RNA-Aufreinigung erfolgte entsprechend den Empfehlungen des Herstellers (M&N, Düren, Germany). Die für die RNA Isolierung auf 6 cm Gewebekulturschalen differenzierten Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und im Anschluss mit 350 µl Guanidinthiozyanat-haltigem RA1-Puffer sowie 3,5 µl β-Mercaptoethanol, lysiert und die zellulären RNasen denaturiert. Anschließend wurde das Lysat unter Verwendung steriler, RNase-freier Pipettierhilfen in ein Eppendorfgefäß überführt und bei -80 °C eingefroren oder umgehend der RNA-Isolation zugeführt. Zur Aufbereitung für die RNA-Isolierung wurde das Lysat über den NucleoSpin® Filter L dispensiert, mit 350 µl Ethanol a.d. (70 %) versetzt und auf die NucleoSpin® RNA Säulen geladen. Über die Membran der NucleoSpin® RNA Säulen erfolgte die Aufreinigung der RNA-Probe. Verunreinigungen durch an die Membran gebundene DNA wurden durch Inkubation mit RNase-freier rDNase für 15 min entfernt. Die Zugabe von 200 µl RA2-Puffer beendete den rDNase-Verdau. Waschschritte mit 600 µl und 250 µl RA3-Puffer führten zur Aufreinigung der an die Membran gebundenen RNA. Diese wurde abschließend durch Zugabe von 50 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O in ein RNase-freies Eppendorfgefäß eluiert. Die Gesamt-RNA-Konzentration wurde photometrisch bei 260 und 280 nm bestimmt.

### 2.14.3. RT-Reaktion

#### *Lösungen:*

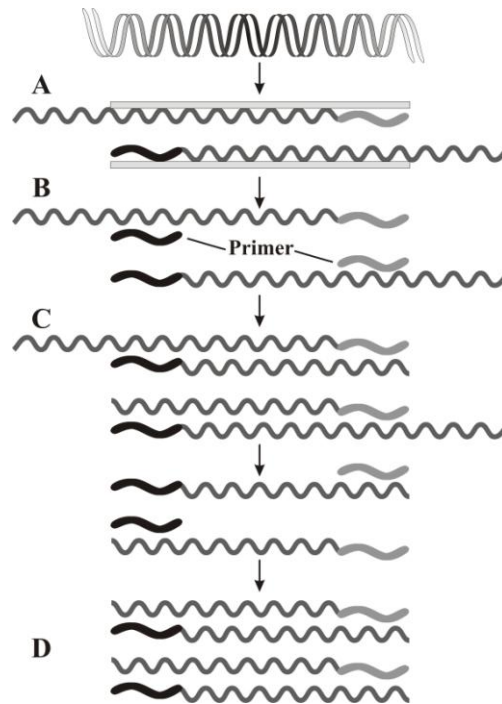
|   |                                |
|---|--------------------------------|
| 10 mM dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP)  | (Fermentas, St. Leon, Germany) |
| Oligo(dT) <sub>12-18</sub> -Primer                | (Invitrogen, Paisley, U.K.)    |
| SuperScript <sup>®</sup> II Reverse Transcriptase | (Invitrogen, Paisley, U.K.)    |
| 5 x First-Strand Buffer                           | (Invitrogen, Paisley, U.K.)    |
| 0,1 M DTT   | (Invitrogen, Paisley, U.K.)    |
| H <sub>2</sub> O (RNase-, DNase-frei)             | (Invitrogen, Paisley, U.K.)    |

#### *Durchführung:*

Es wurden 500 ng der isolierten RNA mit 1 µl Oligo(dT)-Primer versetzt und mit H<sub>2</sub>O (RNase-, DNase-frei) auf ein Endvolumen von 12 µl eingestellt. Die an den Poly-A-Schwanz der mRNA bindenden Primer (Oligo(dT)<sub>12-18</sub>-Primer), ermöglichten es einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (SuperScript<sup>®</sup> II Reverse Transcriptase) einen cDNA-Strang zu synthetisieren. Der Probenansatz wurde für 10 min bei 70 °C inkubiert und anschließend auf Eis gekühlt. Zu jedem RNA-RT-Template wurden 7 µl des RT-Mastermix hinzugegeben. Der RT-Mastermix enthielt je Reaktion 4 µl 5 x First-Strand Buffer, 2 µl 0,1 M DTT und 1 µl 10 mM dNTP Mix. Nach Inkubation bei 42 °C für 2 min wurde die SuperScript<sup>®</sup> II Reverse Transcriptase (1 µl je Reaktion) hinzupipettiert und die RT für 50 min bei 42 °C fortgesetzt. Eine abschließende Inkubation für 5 min bei 95 °C inaktivierte das Enzym und stoppte die Reaktion. Die entstandene cDNA wurde bei -20 °C eingefroren oder direkt anschließend in einer Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) vervielfältigt.

### 2.14.4. PCR-Reaktion

Das Prinzip der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) beruht auf der wiederkehrenden Abfolge von DNA-Denaturierung (Abb. 6A), Anlagerung von sequenzspezifischen Primern an die DNA (Annealing; Abb. 6B) und komplementärer Strangsynthese durch eine thermostabile DNA-Polymerase (Elongation; Abb. 6C). Die wiederholte Abfolge dieses Zyklus führt zur exponentiellen Vervielfältigung eines durch die sequenzspezifischen Primer eingegrenzten Genfragments (Abb. 6D).



**Abbildung 6:** Prinzip der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR). Die Beschreibung der einzelnen Schritte A-D erfolgt im Text.

*Lösungen:*

|  |   |
|--|---|
| 2,5 mM dNTP Mix ( je 10 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP) | (Fermentas, St.Leon, Germany)                               |
| 10 x <i>Taq</i> DNA-Polymerase Puffer              | (Fermentas, St.Leon, Germany)                               |
| <i>Taq</i> DNA-Polymerase                          | (Fermentas, St.Leon, Germany)                               |
| 25 mM MgCl <sub>2</sub>                            | (Fermentas, St.Leon, Germany)                               |
| H <sub>2</sub> O (RNase-, DNase-frei)              | (Invitrogen, Paisley, U.K.)                                 |
| 10 µM (je Sense- und Antisense-Primer)             | (TMB, Berlin, Germany) &<br>(Eurogentech, Seraing, Belgium) |

*Durchführung:*

Die Verarbeitung der Proben erfolgte auf Eis. Es wurden 0,75 µl cDNA in ein Eppendorfgefäß gegeben und der Ansatz durch folgende Lösungen vervollständigt: 13,2 µl H<sub>2</sub>O (RNase-, DNase-frei), 2,5 µl 10 x *Taq* DNA-Polymerase Puffer, 1,8 µl MgCl, 4 µl dNTP Mix, je 1,25 µl Sense- und Antisense-Primer und 0,25 µl *Taq* DNA-Polymerase. Die Proben wurden in den PCR-Thermocycler überführt, für 2 min bei 95 °C erhitzt und entsprechend der optimierten Anzahl von Zyklen (Tabelle 5 und 6) wurden folgende Abschnitte wiederholt durchlaufen:

- 40 sec Denaturierung der Probe bei 95 °C
- 40 sec Annealing der Primer bei optimierter Temperatur
- 40 sec Elongation durch die *Taq* DNA-Polymerase bei 72 °C

Im Anschluss an den letzten Zyklus wurden die Proben 10 min bei 72 °C inkubiert. Nach Abkühlung auf 4 °C wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

### 2.14.5. Agarose-Gelelektrophorese und densitometrische Auswertung

*Lösungen:*

#### Agarose-Gel (2 %)

Folgende Substanzen wurden in 1 x TBE gelöst:

|           |                |                            |
|-----------|----------------|----------------------------|
| 2 % (w/v) | Agarose        | (Roth, Karlsruhe, Germany) |
| 0,7 ng/ml | Ethidiumbromid | (Roth, Karlsruhe, Germany) |

Die Lösung wurde bis zum Auflösen der Agarose in der Mikrowelle erhitzt, anschließend auf 60 °C abgekühlt, mit Ethidiumbromid versetzt und zum Polymerisieren in vorbereitete Gelkammern gegeben. Diese enthielten Kämme für die Aussparung der Probetaschen.

#### DNA Ladepuffer 5 x (steril)

Folgende Substanzen wurden in deionisiertem H<sub>2</sub>O gelöst und anschließend steril filtriert:

|            |                |                             |
|------------|----------------|-----------------------------|
| 15 % (w/v) | Ficoll         | (Sigma, München, Germany)   |
| 1 % (w/v)  | Bromphenolblau | (Merck, Darmstadt, Germany) |
| 4 M        | LiCl           | (Sigma, München, Germany)   |
| 500 mM     | EDTA           | (Biochrom, Berlin, Germany) |

#### DNA-Leiter (1Kb)

20 µl 1 Kb DNA Ladder (Invitrogen, Paisley, U.K.) wurde in 40 µl DNA-Ladepuffer und 140 µl deionisiertem H<sub>2</sub>O gelöst.

*Durchführung:*

Die Darstellung der PCR-Produkte erfolgte mit Hilfe von 2 % Agarose-Gelen im elektrischen Feld. Die Agarose-Gele wurden mit TBE überschichtet. Es wurde je 7,5 µl amplifizierte DNA mit 2,5 µl DNA-Ladepuffer in einem Eppendorfgefäß gemischt und in die Geltaschen gegeben. Ein DNA-Längenstandard (1 Kb DNA-Leiter) wurde zur Darstellung des Molekulargewichtes der DNA-Fragmente in eine separate Geltasche pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 80-100 V in horizontalem Lauf über mindestens 45 min. Durch Einlagerung von Ethidiumbromid in die doppelsträngige DNA konnten die PCR-Produkte unter Anregung mit UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert werden. Die densitometrische Intensitätsvermessung und Auswertung der PCR-Fragmente erfolgte mittels der Software Gel-Pro<sup>®</sup> Analyzer (MediaCybernetics, MA, USA) und ImageJ (NIH, Bethesda, USA). Messwerte der gewebsspezifischen Genexpression wurden in Relation zur Expression des internen Standards GAPDH gesetzt und der jeweils höchste Expressionswert als 100 % gewertet. Alle weiteren Messungen wurden auf diesen

Maximalwert bezogen, um die relative Genexpression darzustellen. *Aqua dest.* ohne RT-Produkt wurde als Negativ-Kontrolle eingeschlossen. Als Positiv-Kontrolle wurde im murinen System ein 17d p.c. alter Maus-Embryo verwendet.

### **2.15. Statistische Auswertung**

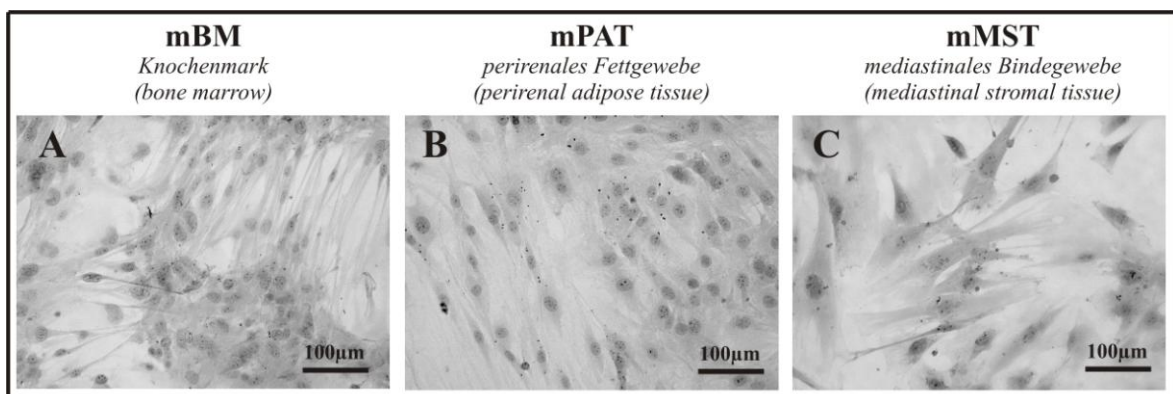
Die Analyse der in dieser Arbeit erhobenen Daten erfolgte aus unabhängig von einander durchgeführten Differenzierungsversuchen. Pro isolierte Zelllinie und Differenzierungsmethode (Monolayer, MMB und MMS) wurden drei Versuche pro Versuchsgruppe (n=3) durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms Sigma Plot 2000 (Systat, Erkrath, Germany). Die Berechnung der statistischen Signifikanzen wurde mit Hilfe des Student's t-Test durchgeführt.



### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Isolation muriner Stamm-/ Progenitorzellen aus verschiedenen Gewebequellen

Die Isolate der murinen Stamm-/ Progenitorzellpopulationen aus Knochenmark (mBM), perirenalem Fettgewebe (mPAT) und aus mediastinalem Bindegewebe (mMST) von NMRI-Mäusen zeigten nach ihrer Überführung in die Zellkultur eine typische spindelförmige Morphologie (Abb. 7A-C). Jedoch zeigten 80 % der mBM-Zellisolate aus Femur und Tibia (n=10) eine reduzierte Fähigkeit zur Adhärenz an Zellkulturoberflächen sowie eine rasch stagnierende Proliferation. Diese mBM-Zellisolate konnten nicht erfolgreich in eine stabile Zellkultur überführt werden. Der in den Vorversuchen verwendete Ficoll-Gradient verringerte diese Zellzahl nochmals, so dass auf eine Anwendung in dieser Arbeit verzichtet wurde. 20 % der mBM-Stammzellpräparationen zeigten allerdings nach zwei Wochen einen stabil proliferierenden, spindelförmigen Zelltyp (Abb. 7A). Demgegenüber demonstrierten mPAT- (n=10) und mMST-Isolate (n=10) durchgehend stabile Zellkultureigenschaften. 100 % der Isolationen waren erfolgreich und es konnten plastikadhärente Zellen gewonnen werden (Abb. 7B und C). Eine optimale Zellkultivierung muriner mBM, mPAT und mMST-Isolate wurde nach mehreren Vorversuchen durch eine standardisierte Plattierdichte von  $1 \times 10^4$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  sowie einer im Verlauf der Vorversuche erfolgten Optimierung der Zellkulturmedien erreicht.

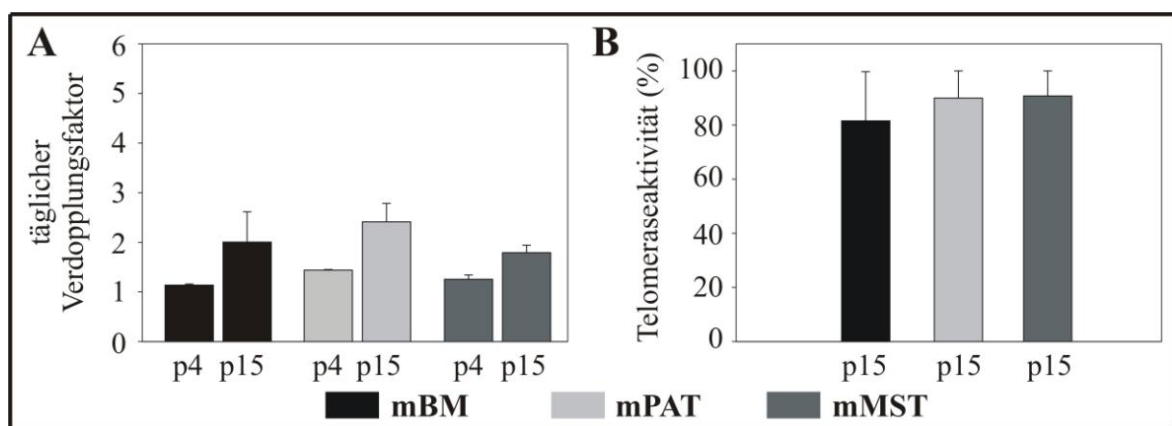


**Abbildung 7:** Murine Stamm-/ Progenitorzellen aus Knochenmark (A, mBM), perirenalem Fettgewebe (B, mPAT) und mediastinalem Bindegewebe (C, mMST) demonstrierten eine Plastikadhärenz und einen spindelförmigen Zelltyp (Färbung: Hämatoxylin (73)).

### 3.2. Charakterisierung muriner Stamm-/ Progenitorzellen aus verschiedenen Gewebequellen.

#### 3.2.1. Stamm-/ Progenitorzellen aus verschiedenen murinen Gewebequellen zeigen vergleichbare Proliferationseigenschaften

Die Zellisolate der verschiedenen murinen Gewebequellen demonstrierten stabile Proliferations- und Verdopplungseigenschaften *in vitro* (Abb. 8A, V-Faktor: mBM 1,5 x / Tag; mPAT 1,9 x / Tag; mMST 1,5 x / Tag; siehe 2.7.1.). Die analysierten Zellisolate wurden bis zu 15 x passagiert und zeigten auch nach Kryokonservierung keine Abnahme der Proliferationseigenschaften. Murine BM, PAT und MST besaßen zudem eine stabile Telomeraseaktivität (Abb. 8B).

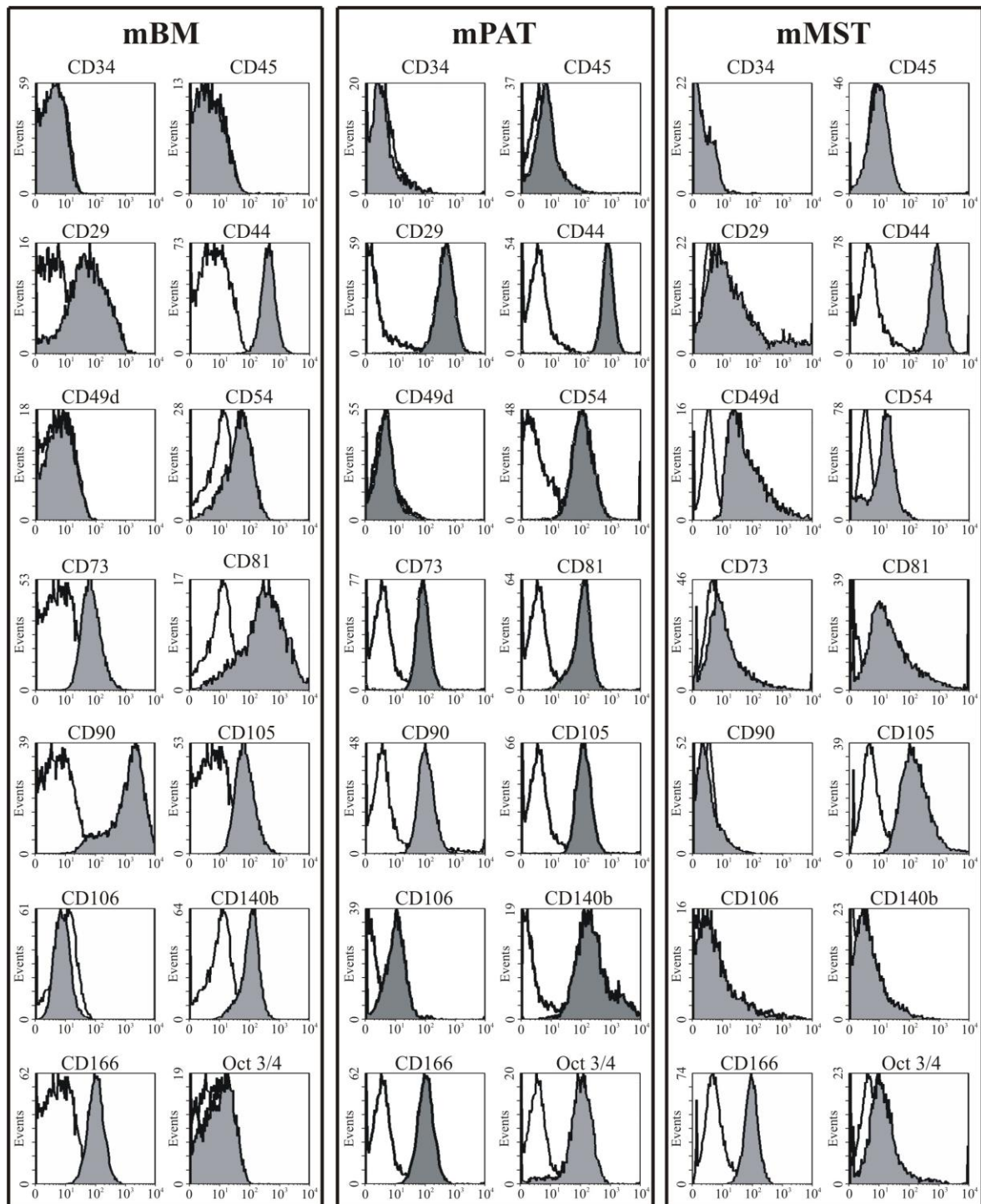


**Abbildung 8:** mBM, mPAT und mMST zeigten stabile und vergleichbare Verdopplungseigenschaften (A). Alle Zellisolate demonstrierten zudem eine stabile Telomeraseaktivität in der 15. Passage (B).

#### 3.2.2. Stamm-/ Progenitorzellen aus verschiedenen murinen Gewebequellen zeigen geringe Unterschiede in der Expression von Oberflächenmolekülen

Die Charakterisierung der Expression von Oberflächenantigenen muriner Stamm-/ Progenitorzellen erfolgte mittels FACS-Analyse (2.7.3.). Die murinen BM-, PAT- und MST-Isolate waren negativ für die hämatopoetischen Marker CD34 und CD45. Die Oberflächenmarkermoleküle CD44, CD54, CD81, CD105 und CD166 wurden auf allen murinen Zellisolaten exprimiert. Es zeigten sich jedoch Unterschiede im Expressionsmuster von CD29 (mMST-niedrig), CD49d (mMST-hoch), CD73 (mPAT-hoch), CD106 (mPAT-hoch), CD140b (mMST-niedrig) und Oct  $\frac{3}{4}$  (mPAT-hoch). Insgesamt ergab die FACS-Analyse für mBM und mPAT das charakteristische Expressionsmuster mesenchymaler Stamm-/ Progenitorzellen. Die murinen mMST-Isolate

zeigten nur eine geringe Expression von CD73 und waren negativ für CD90, jedoch positiv für CD105 (Abb. 9).



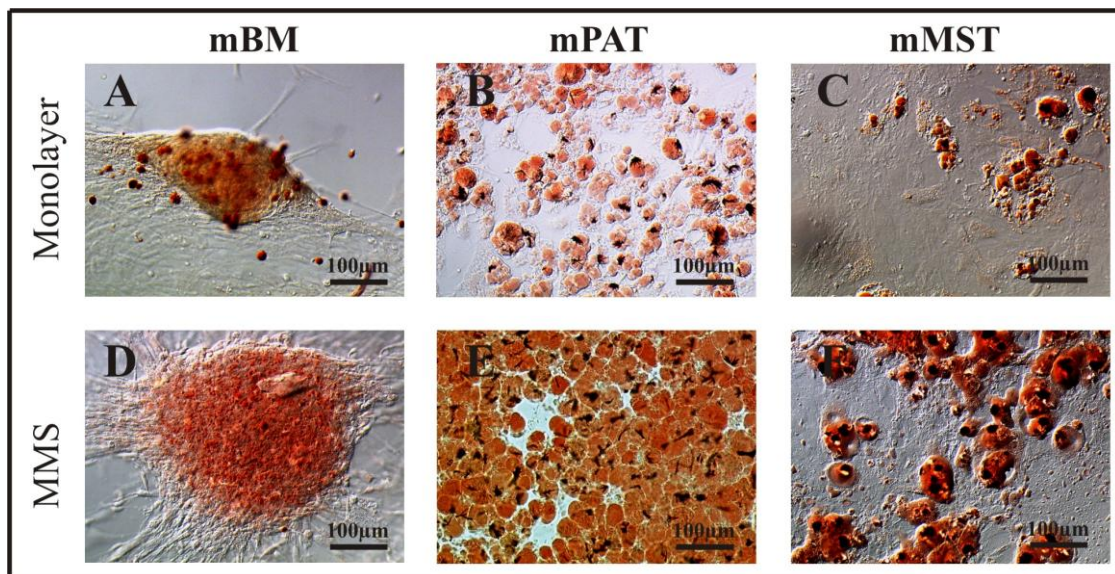
**Abbildung 9:** Oberflächencharakterisierung isolierter Stamm-/ Progenitorzellen mittels Durchflusszytometrie. Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten in der Expression werden im Text beschrieben. (Isotypkontrollen in weiß)

### 3.2.3. Stamm-/ Progenitorzellen aus verschiedenen murinen Gewebequellen zeigen eine erfolgreiche adipogene, osteogene und chondrogene Differenzierung

#### 3.2.3.1. *Etablierung einer standardisierten 3D-Kultivierung von Stamm-/ Progenitorzellen*

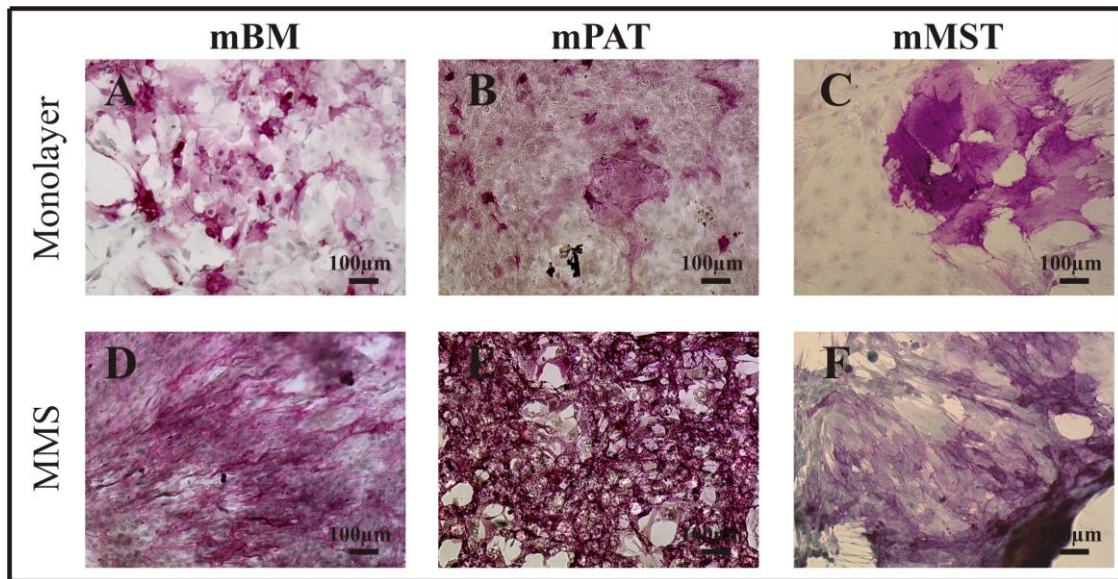
Die klassische adipogene, osteogene und chondrogene Differenzierung adulter Stamm-/ Progenitorzellen erfolgt im Monolayer- (2.8.1.) bzw. MMB-System (2.8.2.). Diese klassischen Differenzierungen erfordern jedoch bereits für einen einfachen Screening-Test der Differenzierung eine große Zellzahl (1.482.000 Zellen; siehe Tabelle 1; Seite 22) und damit eine lange Kultivierungszeit zur Generierung dieser Zellen. Ein Screening adulter Stamm-/ Progenitorzellen im standardisierten MMS-System erfordert hingegen nur 1/7 der im Monolayer und MMB eingesetzten Zellen (225.000 Zellen; siehe Tabelle 2; Seite 23). Die MMS-Differenzierung ermöglicht daher bei geringerer Zellzahl und geringerem Zeitaufwand eine effiziente Charakterisierung mesenchymaler Stamm-/ Progenitorzellen *in vitro*.

Nach der spezifischen Induktion (siehe 2.4.) der Zellisolate konnte für alle charakterisierten Stamm-/ Progenitorzellen eine erfolgreiche adipogene (Abb. 10), osteogene (Abb. 11) und chondrogene (Abb. 12) Differenzierung nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den klassischen Differenzierungssystemen (Abb. 10A-C und Abb. 11A-C) zeigten die im MMS-System differenzierten mBM-, mPAT- und MST-Isolate eine homogenere Differenzierung sowie eine Zunahme der adipogenen (Abb. 10D-F) und osteogenen (Abb. 11D-F) differenzierten Zellen pro Gesichtsfeld.



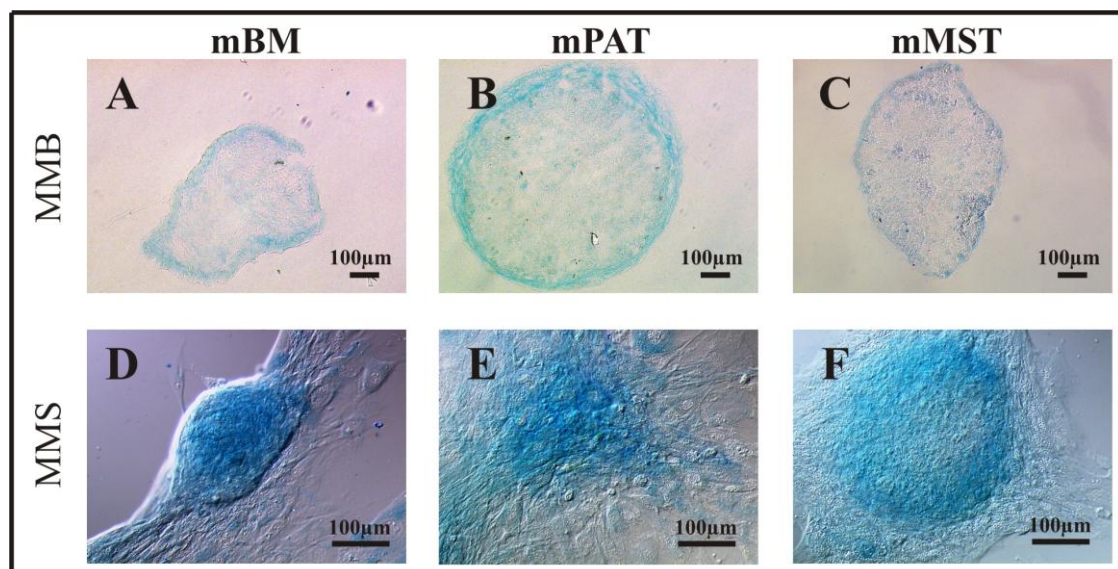
**Abbildung 10:** Sudan III-Färbungen muriner Stamm-/ Progenitorzellen (25d). Die Zellen zeigten nach spezifischer Induktion eine erfolgreiche adipogene Differenzierung im Monolayer- (A-C) und MMS-System (D-F).





**Abbildung 11:** Alkalische Phosphatase-Färbungen muriner Stamm-/ Progenitorzellen (25d). Die Zellen zeigten nach spezifischer Induktion eine erfolgreiche osteogene Differenzierung im Monolayer- (A-C) und MMS-System (D-F).

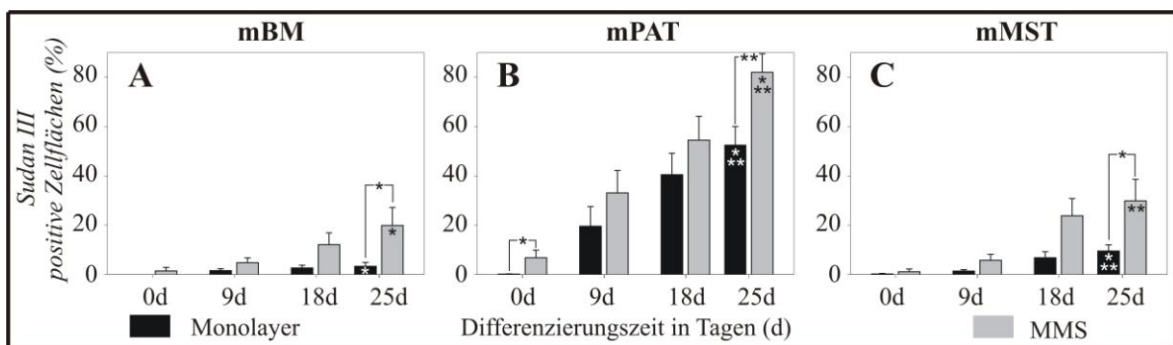
Nach Applikation chondrogener Induktionsmedien zeigten alle im klassischen MMB-System differenzierten Stamm-/ Progenitorzellisolate nach 18 Tagen eine positive Färbung für AB (Abb. 12A-C). Dies bestätigte sich ebenso für die im MMS-System differenzierten Isolate (Abb. 12D-F). Eine chondrogene Differenzierung im Monolayer konnte hingegen nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 12:** Alcianblau-Färbungen muriner Stamm-/ Progenitorzellen (25d). Die Zellen zeigten nach spezifischer Induktion eine erfolgreiche chondrogene Differenzierung im MMB- (A-C) und MMS-System (D-F).

### 3.2.3.2. Die standardisierte 3D-Kultivierung via MMS ermöglicht eine effiziente Differenzierung

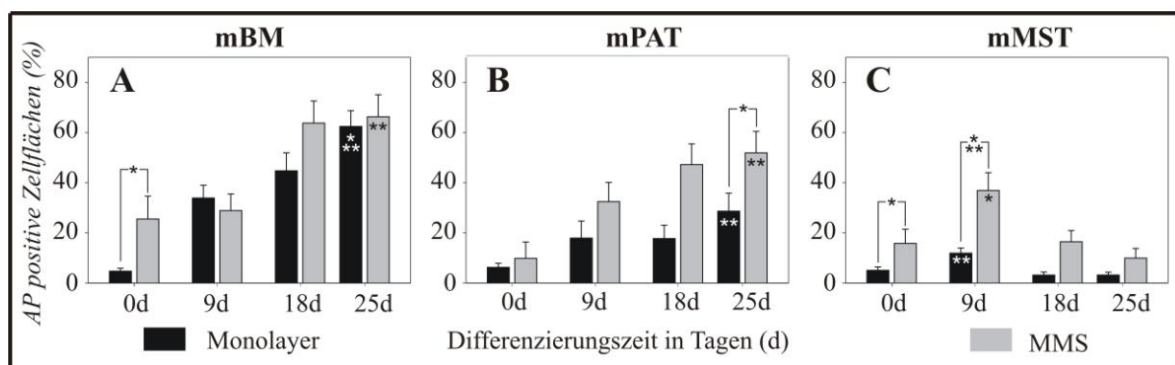
Die adipogene Induktion von mBM-, mPAT- und mMST-Isolaten im klassischen Monolayer-System resultierte in einer über den Zeitverlauf von 25 Tagen zunehmenden Akkumulation von Sudan III positiven Lipidvakuolen (Abb.13 A *mBM*:  $p \leq 0,05$ ; B *mPAT*:  $p \leq 0,001$ ; C *mMST*:  $p \leq 0,001$ ). In allen adipogen differenzierten MMS kam es ebenfalls zu einer signifikanten Zunahme der Lipidspeicherung mit zunehmender Differenzierungszeit (Abb.13 A *mBM*:  $p \leq 0,05$ ; B *mPAT*:  $p \leq 0,001$ ; C *mMST*:  $p \leq 0,01$ ). Im MMS-System konnte zudem eine Verbesserung der adipogenen Differenzierung von mBM-, mMST- und mPAT-Isolaten im Vergleich zur Monolayerdifferenzierung nachgewiesen werden (Abb.13 A *mBM* (25d):  $p \leq 0,05$ ; B *mPAT* (25d):  $p \leq 0,01$ ; C *mMST* (25d):  $p \leq 0,05$ ). Die adipogene MMS-Differenzierung resultierte in einer bis zu zweifach höheren Anzahl lipidspeichernder Zellen im Vergleich zur konventionellen Monolayerdifferenzierung. Im MMS differenzierte mPAT-Isolate demonstrierten annähernd 80 % Sudan III positive Zellen im Gegensatz zu in etwa 50 % positiven Zellen nach Abschluss der mPAT-Monolayerdifferenzierung. Darüberhinaus zeigten im MMS-System differenzierte mPAT-Isolate bereits vor Beginn der Induktion eine erhöhte Anzahl Sudan III positiver Adipozyten (Abb. 13 B *mPAT* (0d):  $p \leq 0,05$ ). Eine vergleichbare Adipogenese ohne Induktion konnte im Monolayer-System nicht beobachtet werden.



**Abbildung 13:** Vergleich der adipogenen Differenzierung im Monolayer- und MMS-System. Die adipogene Induktion von mBM- (A), mPAT- (B) und mMST-Isolaten (C) resultierte in einer Zunahme von Sudan III-positiven Zellen mit Lipidvakuolen.

( $\star = p \leq 0,05$ ;  $\star \star = p \leq 0,01$ ;  $\star \star \star = p \leq 0,001$ )

Die osteogene Induktion von mBM-, mPAT- und mMST-Isolaten im klassischen Monolayer-System resultierte in einer über den Zeitverlauf von 25 Tagen zunehmenden Akkumulation von AP-positiven Zellen (Abb.14 A *mBM*:  $p \leq 0,001$ ; B *mPAT*:  $p \leq 0,01$ ; C *mMST* (9d):  $p \leq 0,01$ ). Im Verlauf der osteogenen MMS-Differenzierung konnte ebenfalls eine signifikante Zunahme der AP-Expression in allen Stamm-/ Progenitorzellen nachgewiesen werden (Abb.14 A *mBM*:  $p \leq 0,01$ ; B *mPAT*:  $p \leq 0,01$ ; C *mMST* (9d):  $p \leq 0,05$ ). Im MMS-System konnte darüberhinaus ein Verbesserung der osteogenen Differenzierung von mPAT- und mMST-Isolaten im Vergleich zur Monolayer-differenzierung nachgewiesen werden (Abb.14 B *mPAT* (25d):  $p \leq 0,05$ ; C *mMST* (9d):  $p \leq 0,001$ ). Die MMS-Kultivierung führte ebenfalls zu einer Verbesserung der osteogenen Differenzierung muriner BM-Isolate, die jedoch nicht signifikant war. Die mBM- und die mMST-Isolate zeigten im MMS-System eine signifikant höhere Anzahl osteogen differenzierter Zellen vor Beginn der osteogenen Induktion (Abb.14: A *mBM* (0d):  $p \leq 0,05$ ; C *mMST* (0d)  $p \leq 0,05$ ). Die mMST-Isolate zeigten sowohl im Monolayer- als auch im MMS-System im Verlauf der osteogenen Differenzierung zunächst eine Zunahme der AP-positiven Zellen, während späterer Differenzierungsstadien allerdings eine Abnahme der spezifischen AP-Färbung.

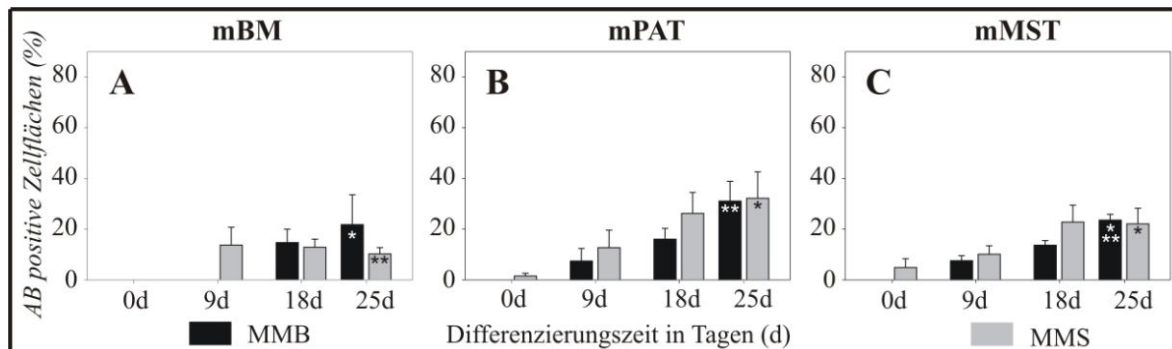


**Abbildung 14:** Vergleich der osteogenen Differenzierung im Monolayer- und MMS-System. Die osteogene Induktion von mBM- (A), mPAT- (B) und mMST-Isolaten (C) resultierte in einer Zunahme alkalischer Phosphatase positiver Zellen.

( $\star = p \leq 0,05$ ;  $\star \star = p \leq 0,01$ ;  $\star \star \star = p \leq 0,001$ )

Die Applikation der chondrogenen Induktionsmedien resultierte sowohl im MMB-System als auch im MMS-System in einer erfolgreichen chondrogenen Differenzierung. Dabei kam es sowohl im MMB-System (Abb.15 A *mBM*:  $p \leq 0,05$ ; B *mPAT*:  $p \leq 0,01$ ; C *mMST*:  $p \leq 0,001$ ) als auch im MMS-System (Abb.15 A *mBM*:  $p \leq 0,01$ ; B *mPAT*:  $p \leq 0,05$ ; C

*mMST*:  $p \leq 0,05$ ) zu einer signifikanten Zunahme AB positiver Zellen über den 25-tägigen Differenzierungsverlauf. Bei der chondrogenen Differenzierung konnte zwischen MMB-Suspensionskultur und MMS-Kultivierung kein signifikanter Unterschied beschrieben werden. Eine eindeutige chondrogene Differenzierung vor Applikation der Induktionsmedien konnte sowohl im 3D-MMB als auch im 3D-MMS nicht nachgewiesen werden. Eine chondrogene Differenzierung im Monolayer wurde nicht nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 15:** Vergleich der chondrogenen Differenzierung im MMB- und MMS-System. Die chondrogene Induktion von mBM- (A), mPAT- (B) und mMST-Isolaten (C) resultierte in einer Zunahme Alcianblau-positiver Zellen.

( $\star = p \leq 0,05$ ;  $\star \star = p \leq 0,01$ ;  $\star \star \star = p \leq 0,001$ )

#### 3.2.4. Stammzellen aus verschiedenen Gewebequellen besitzen Unterschiede in ihrer Differenzierungsfähigkeit

Die osteogene Differenzierung (Abb. 14) war am erfolgreichsten in den mBM-Kulturen. Sie war im Monolayer im Vergleich zu den mPAT- und mMST-Isolaten signifikant erhöht (Monolayer: *mBM* (25d):  $p \leq 0,001$ ). Im MMS-System hingegen bestätigte sich dies nur im Vergleich zu den mMST-Isolaten (MMS: *mBM* (25d):  $p \leq 0,001$ ). Die osteogene Differenzierung der mPAT-Isolate nahm während der Kultivierungszeit im MMS-System zu, so dass am Tag 25 kein signifikanter Unterschied zwischen den mBM- und mPAT-Isolaten hinsichtlich der osteogenen Differenzierung im MMS nachweisbar war.

Die adipogene Differenzierung (Abb. 13) der mPAT-Isolate war um das 2 bis 3-fache ausgeprägter als in den murinen BM- und MST-Isolaten. Murine PAT-Isolate demonstrierten sowohl in der Monolayer- als auch in der MMS-Differenzierung eine signifikant höhere Anzahl an adipogenen Zellen gegenüber den mBM- und mMST-Isolaten (Monolayer: *mPAT* (25d):  $p \leq 0,001$ ; MMS: *mPAT* (25d):  $p \leq 0,001$ ).



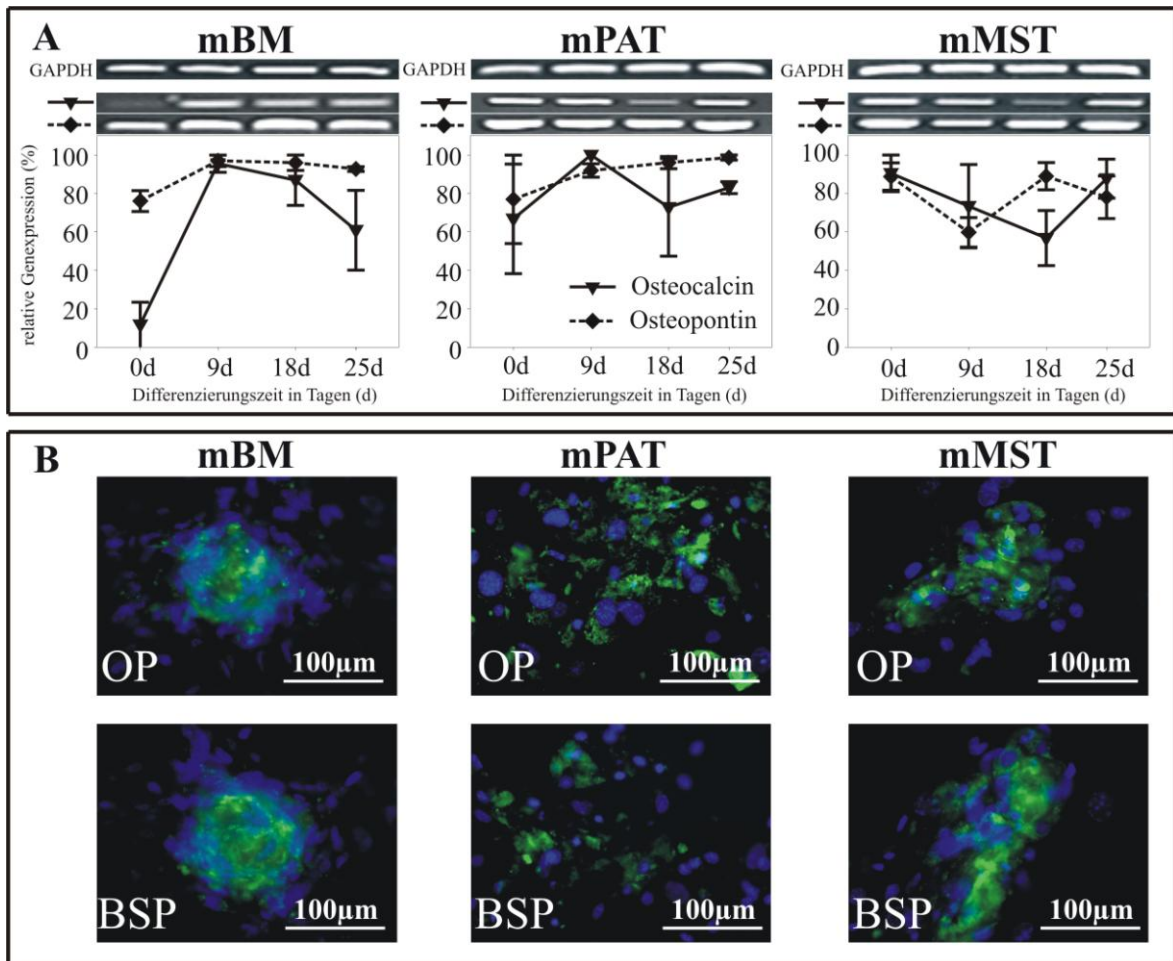
Die murinen PAT-Isolate zeigten insgesamt die umfangreichsten Stamm-/ Progenitorzelleigenschaften. Neben stabilen Isolations- und Proliferationseigenschaften wurde eine sehr gute adipogene, osteogene und chondrogene Differenzierung dieser Zellen aus Fettgewebe nachgewiesen.

Im Verlauf der chondrogenen Differenzierung (Abb. 15) konnten allerdings keine eindeutig signifikanten Unterschiede der Differenzierungsfähigkeit der verschiedenen Stamm-/ Progenitorzellen aus den unterschiedlichen Gewebequellen bestimmt werden.

### **3.3. Gen- und Proteinexpression während der klassischen Monolayer und MMB-Differenzierung**

#### **3.3.1. Bestätigung der osteogenen Differenzierung im Monolayer-System auf Gen- und Proteinexpressionsebene**

Charakteristisch für eine osteogene Differenzierung ist neben dem Nachweis von AP die Expression der Markergene *Osteopontin (OP)* und *Osteocalcin (OC)* (87). Sowohl die Expression von *OP* als auch *OC* konnte im Verlauf der osteogenen Differenzierung im Monolayer-System mittels RT-PCR nachgewiesen werden (Abb. 16A). Eine signifikante Zunahme der *OC*-Expression konnte im Verlauf der osteogenen Differenzierung der mBM-Isolate detektiert werden (Abb. 16A mBM (9d):  $p \leq 0,05$ ). Die Expression des osteogenen Markergens reflektiert dabei eine deutliche Zunahme an AP positiven Zellen in den Kulturen (siehe Abb. 14). Mittels sekundärer Immunfärbungen konnte außerdem die Expression osteogener Markerproteine bestätigt werden. So konnten Bone Sialoprotein (BSP) und OP im Verlauf der osteogenen Differenzierung aller murinen Stamm-/ Progenitorzellisolate dargestellt werden. Der Nachweis beider Proteine gelang erstmalig ab dem 9. Tag und in allen Proben ab dem 18. Tag der osteogenen Differenzierung (Abb. 16B).

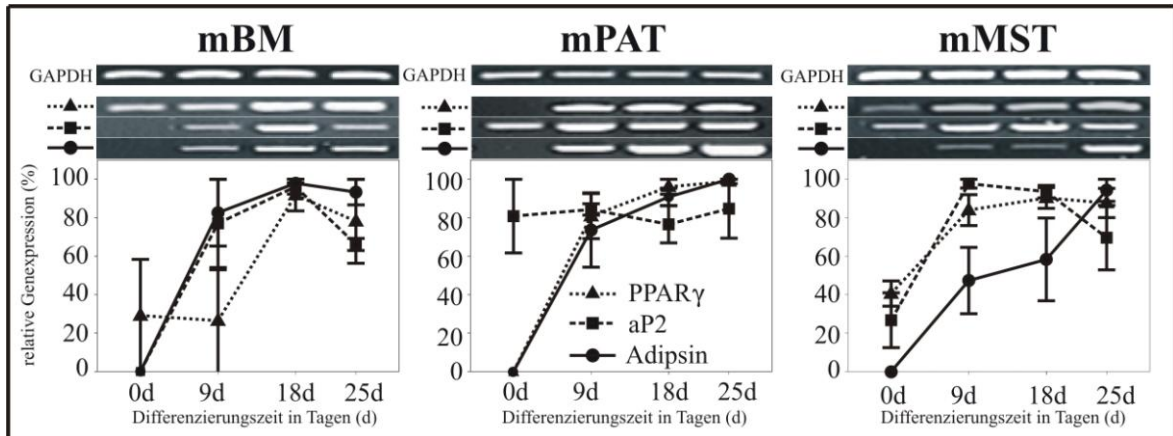


**Abbildung 16:** Gen- und Proteinexpression im Verlauf der klassischen osteogenen Monolayerdifferenzierung. *OP* und *OC* werden in allen Stamm-/ Progenitorzellisolaten exprimiert (A). Immunfärbungen (25d) zeigen die Expression von *BSP* und *OP* in mBM-, mPAT- und mMST-Isolaten (B). Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) dargestellt.

### 3.3.2. Bestätigung der adipogenen Differenzierung im Monolayer-System auf Genexpressionsebene

Die adipogene Differenzierung muriner BM-, PAT-, und MST-Isolate resultierte in der Expression spezifischer adipogener Gene (Abb. 17) wie dem *peroxisome proliferation-activated receptor  $\gamma$*  (*PPAR $\gamma$* ; (88)), *fatty acid-binding protein* (*FABP/aP2*; (89)) sowie *Adipsin* (90). Im Verlauf der adipogenen Monolayer-Differenzierung aller Zellisolate wurde die Expression des Transkriptionsfaktor *PPAR $\gamma$*  hochreguliert (Abb. 17 *mPAT* (9d):  $p \leq 0,05$ ; *mMST* (9d):  $p \leq 0,01$ ). In den mBM-Isolaten war dies jedoch nicht signifikant. Gleichzeitig kam es zu einer vermehrten Expression von *aP2* (Abb. 17 *mBM* (18d):  $p \leq 0,01$ ; *mMST* (9d):  $p \leq 0,05$ ). In den mPAT-Isolaten allerdings wurde *aP2* durchgehend auf hohem Niveau exprimiert. *Adipsin*, charakteristisch für ausdifferenzierte Adipozyten, konnte nach Abschluss der Differenzierung im Monolayer-System in allen Proben der

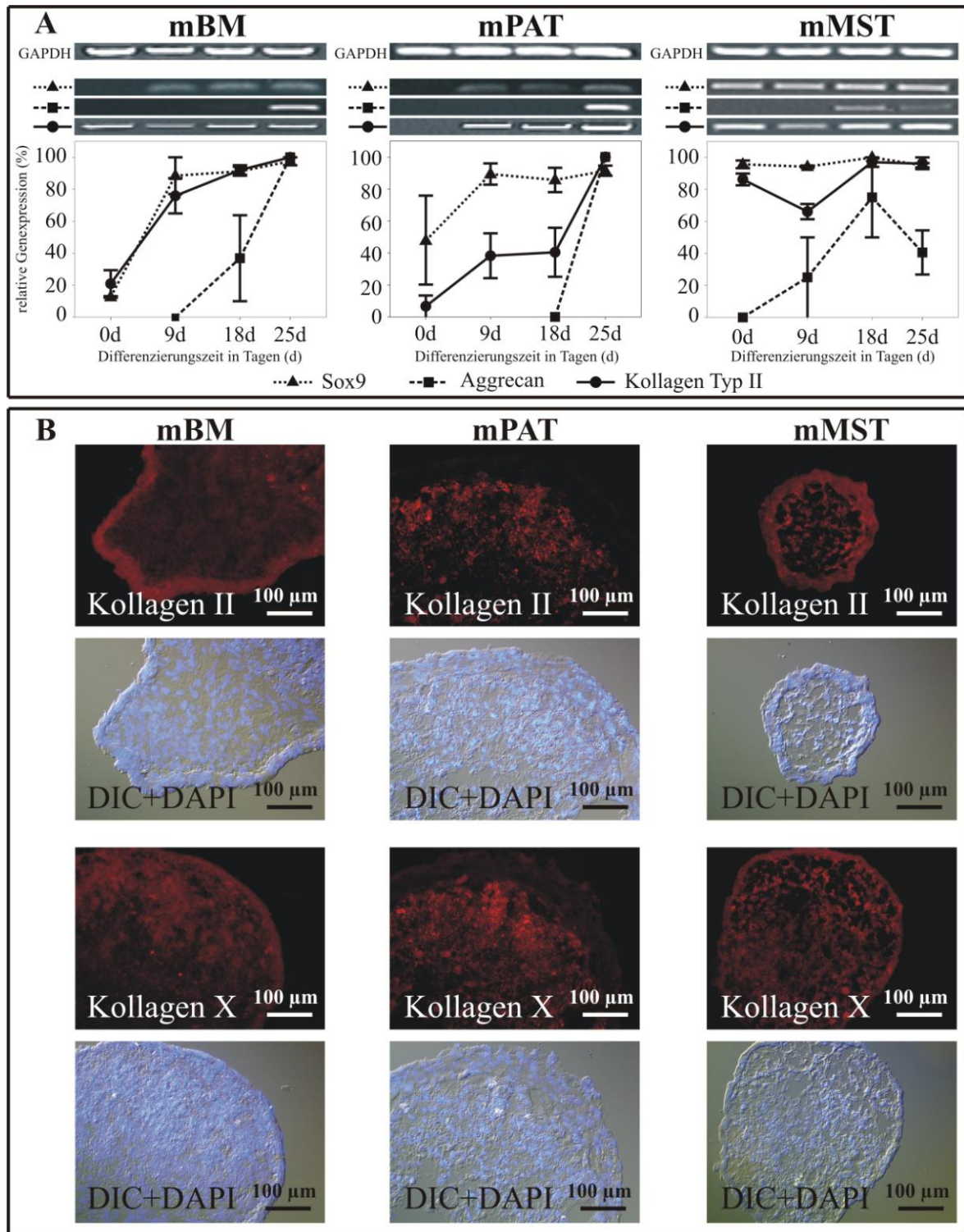
adipogenen Differenzierung nachgewiesen werden (Abb. 17 *mBM* (9d):  $p \leq 0,05$ ; *mPAT* (18d):  $p \leq 0,01$ ; *mMST* (25d):  $p \leq 0,001$ ).



**Abbildung 17:** Differentielle Genexpression im Verlauf der adipogenen Differenzierung im klassischen Monolayer-System.

### 3.3.3. Bestätigung der chondrogenen Differenzierung im MMB-System auf Gen- und Proteinexpressionsebene

Im Verlauf der chondrogenen MMB-Differenzierung konnte mittels RT-PCR-Analyse die Expression der knorpelspezifischen Gene *Aggrecan*, *Kollagen Typ II* sowie des assoziierten Transkriptionsfaktors *Sox9* (91) in allen murinen Stamm-/ Progenitorzellen nachgewiesen werden (Abb. 18A). Die Analyse der *mBM*- und *mPAT*-Isolate demonstrierte eine Hochregulation der Expression von *Kollagen Typ II* (Abb. 18A *mBM* (18d):  $p \leq 0,01$ ; *mPAT* (25d):  $p \leq 0,001$ ) und *Sox9* (Abb. 18A *mBM* (9d):  $p \leq 0,05$ ). Die *mMST*-Isolate exprimierten *Sox9* kontinuierlich während des Differenzierungsverlaufs. Zusammen mit der Expression von *Kollagen Typ II* konnte nach Beginn der chondrogenen Induktion eine Hochregulation der Expression von *Aggrecan* in allen murinen Stamm-/ Progenitorzellen nachgewiesen werden (Abb.18A *mBM* (25d):  $p \leq 0,001$ ; *mPAT* (25d):  $p \leq 0,001$ ; *mMST* (18d):  $p \leq 0,01$ ). Am Ende der 25-tägigen MMB-Differenzierung konnte in allen Kulturen mittels sekundärer Immunfärbung Kollagen Typ II und Kollagen Typ X detektiert werden (Abb. 18B). Die Analyse der Protein- und Genexpression bestätigte somit eine erfolgreiche Chondrogenese der murinen Stamm-/ Progenitorzellisolate im MMB.



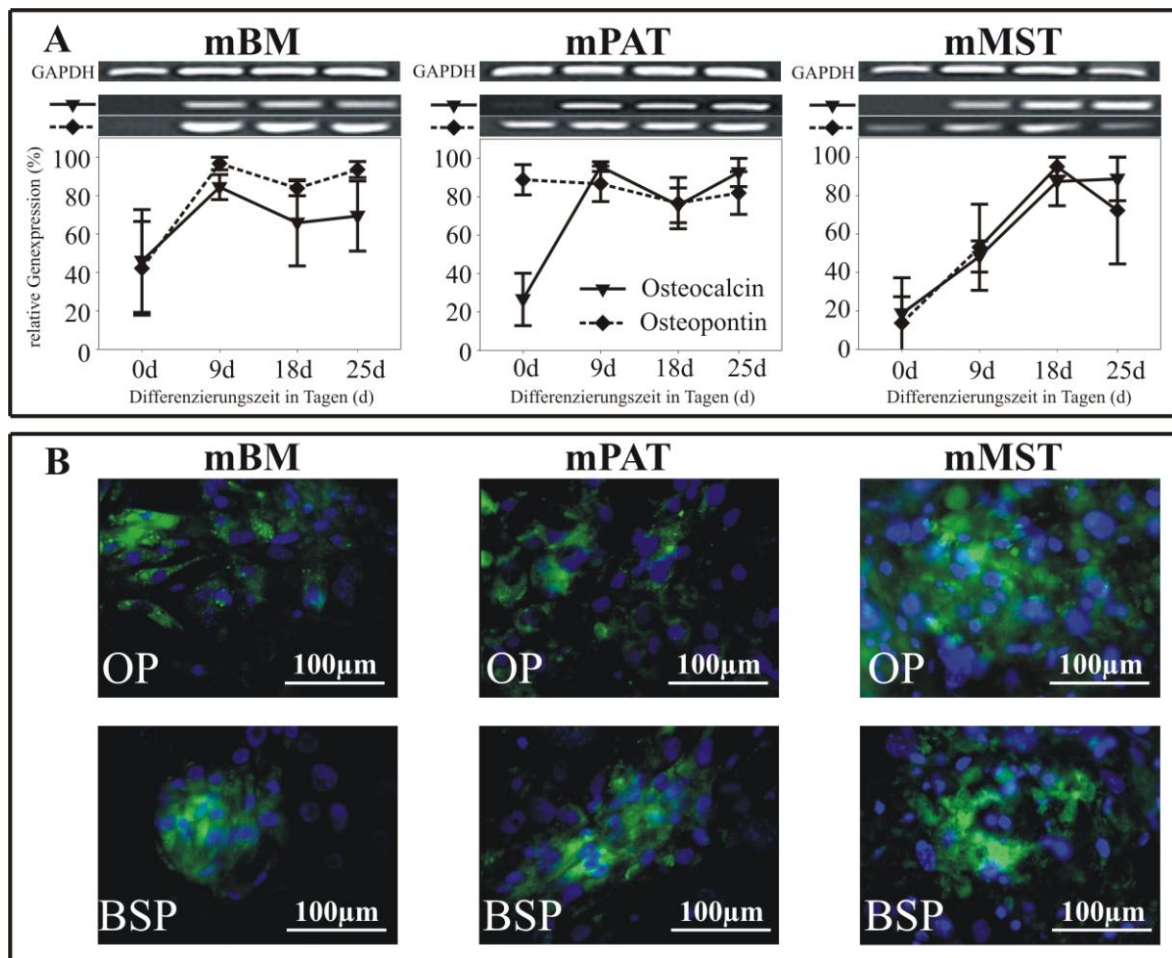
**Abbildung 18:** Gen- und Proteinexpression im Verlauf der klassischen chondrogenen MMB-Differenzierung. In mBM-, mPAT- und mMST-Isolaten werden chondrogene Markergene differentiell exprimiert (A). Mittels sekundärer Immunfärbungen (25d) konnte die Expression von Kollagen Typ II und X nachgewiesen werden (B). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) dargestellt. (DIC= Differential-Interferenz-Kontrast)



### 3.4. Gen- und Proteinexpression während der standardisierten MMS-Kultivierung

#### 3.4.1. Bestätigung der osteogenen Differenzierung im MMS-System auf Gen- und Proteinexpressionsebene

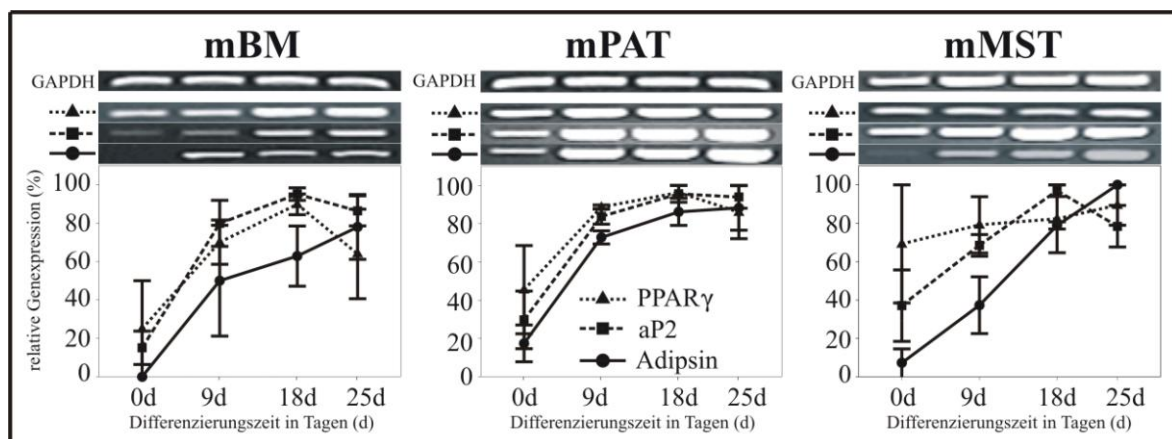
Mittels RT-PCR-Analyse konnte gezeigt werden, dass die osteogenen Markergene *OP* und *OC* während der osteogenen MMS-Differenzierung aller untersuchten Stamm-/ Progenitorzellisolate exprimiert wurden (Abb. 19A). Entsprechend der Zunahme AP positiver Zellen (siehe Abb. 14), kam es in allen Stamm-/ Progenitorzellisolaten zu einer Hochregulation der Expression von *OC* (Abb. 19A *mPAT* (9d):  $p \leq 0,01$ ; *mMST* (18d):  $p \leq 0,05$ ), die jedoch in den mBM-Isolaten nicht signifikant war. Sekundäre Immunfärbungen bestätigten die Expression der osteogenen Markerproteine BSP und OP. BSP und OP konnten ab dem 18. Tag der osteogenen MMS-Differenzierung in allen murinen Stamm-/ Progenitorzellisolaten nachgewiesen werden (Abb. 19B).



**Abbildung 19:** Gen- und Proteinexpression im Verlauf der osteogenen Differenzierung im MMS-System. *OP* und *OC* werden in allen Stamm-/ Progenitorzellisolaten exprimiert (A). Sekundäre Immunfärbungen (25d) zeigen die Expression der Markermoleküle BSP und OP in allen osteogen induzierten MMS (B). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) dargestellt.

### 3.4.2. Bestätigung der adipogenen Differenzierung im MMS-System auf Genexpressionsebene

Die adipogene MMS-Differenzierung führte zu einer spezifischen Expression der adipogenen Gene *PPAR $\gamma$* , *FABP/aP2* und *Adipsin* (Abb. 20). Die Hochregulation der Expression von *PPAR $\gamma$*  in mBM- und mPAT-Isolaten während der Differenzierung wurde begleitet von einer Zunahme der Genexpression von *aP2* (Abb. 20 mBM (9d):  $p \leq 0,01$ ; mPAT (18d):  $p \leq 0,05$ ). Murine MST-Isolate zeigten ebenfalls eine Hochregulation der *aP2*-Expression (Abb. 20 mMST (18d):  $p \leq 0,05$ ) sowie eine kontinuierliche Expression von *PPAR $\gamma$* . Eine Zunahme der Expression von *Adipsin* konnte während der MMS-Differenzierung in allen analysierten murinen Stamm-/ Progenitorzellen nachgewiesen werden (Abb. 20 mBM (18d):  $p \leq 0,01$ ; mPAT (9d):  $p \leq 0,01$ ; mMST (18d):  $p \leq 0,01$ ).

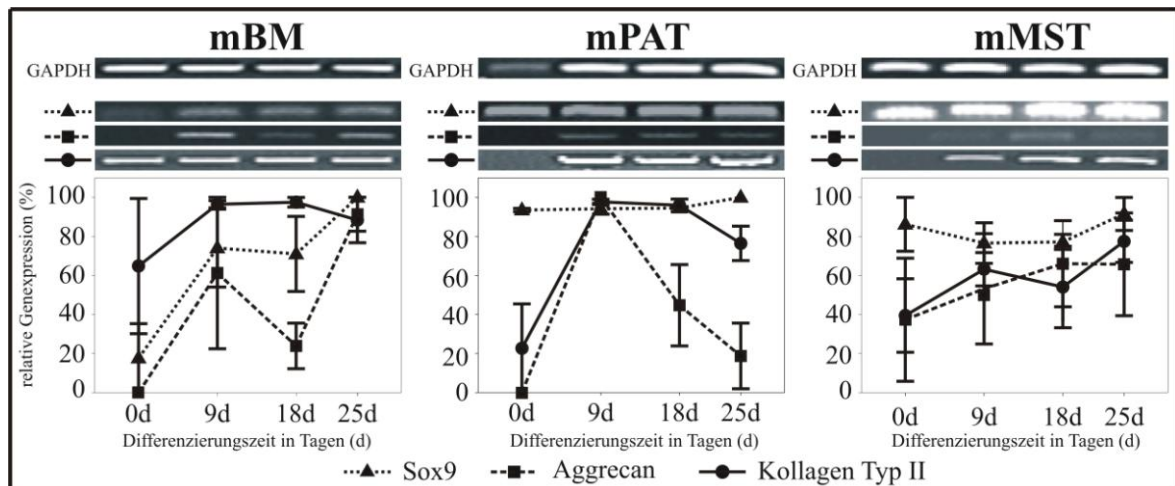


**Abbildung 20:** Differentielle Genexpression im Verlauf der adipogenen Differenzierung im MMS-System.

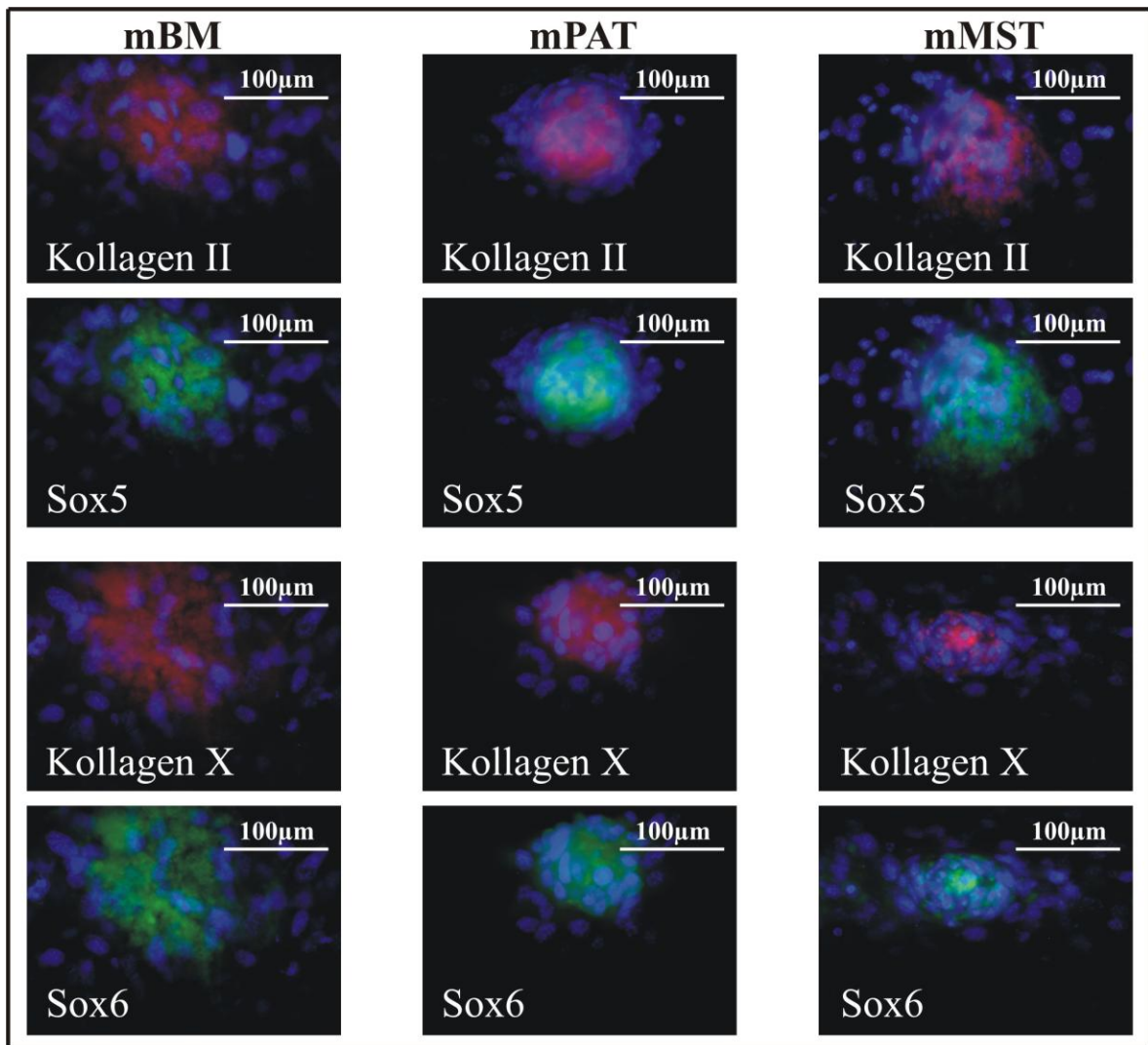
### 3.4.3. Bestätigung der chondrogenen Differenzierung im MMS-System auf Gen- und Proteinexpressionsebene

Entsprechend der Zunahme AB positiver Zellen im Verlauf der chondrogenen Differenzierung im MMS-System (siehe Abb. 15), konnte mittels RT-PCR-Analyse gezeigt werden, dass die chondrogenen Markergene *Kollagen Typ II*, *Aggrecan* und der Transkriptionsfaktor *Sox9* in allen untersuchten Stamm-/ Progenitorzellisolaten exprimiert wurden (Abb. 21). Murine PAT- und MST-Isolate zeigten eine konstant hohe Expression von *Sox9*. In mBM-Isolaten kam es über den Verlauf der chondrogenen Differenzierung zu einer zunehmenden Expression von *Sox9* (Abb. 21 mBM (25d):  $p \leq 0,05$ ) und *Aggrecan* (Abb. 21 mBM (25d):  $p \leq 0,01$ ). In mPAT-Isolaten wurde die Expression von *Kollagen Typ II* ebenso hochreguliert (Abb. 21 mPAT (9d):  $p \leq 0,05$ ) wie die Expression von *Aggrecan*

(Abb. 21 *mPAT* (9d):  $p \leq 0,001$ ). Gegen Ende der chondrogenen Differenzierung muriner PAT-Isolate nahm die Expression von *Aggrecan* und *Kollagen Typ II* wieder ab. Murine MST zeigten eine geringe Zunahme der Expression von *Kollagen Typ II* und *Aggrecan* über den Differenzierungsverlauf, die jedoch nicht signifikant war. Die Analyse der Differenzierung im MMS-System mittels sekundärer Immunfärbung und FISH war nach 25 Tagen in allen murinen Stamm-/ Progenitorzellisolaten positiv für Kollagen Typ II und X sowie für die assoziierten Transkriptionsfaktoren Sox5 und Sox6 (Abb. 22).



**Abbildung 21:** Genexpression im Verlauf der chondrogenen Differenzierung im MMS-System. In mBM-, mPAT- und mMST-Isolaten werden die chondrogenen Markergene *Kollagen Typ II*, *Aggrecan* und *Sox9* differentiell exprimiert.



**Abbildung 22:** Proteinexpression im Verlauf der chondrogenen Differenzierung im MMS-System. Sekundäre Immunfärbungen und die FISH-Analyse demonstrieren die Expression von Kollagen Typ II und X sowie der Knorpelzell-assoziierten Transkriptionsfaktoren Sox5 und Sox6 am 25. Tag nach Induktion der Differenzierung in allen Stamm-/Progenitorzellisolaten. Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) dargestellt.



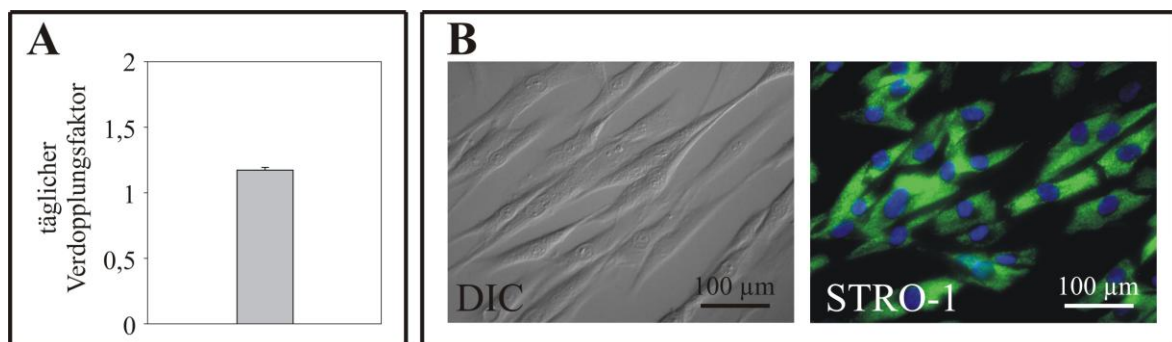
### 3.5. Nachweis Matrix-vermittelter Migration von Stamm-/ Progenitorzellen an den Ort eines Gewebedefektes

#### 3.5.1. Isolation humaner Stamm-/ Progenitorzellen aus einer *in vivo* zur Knorpeldefektheilung verwendeten Kollagen I/III-Matrix

Im Verlauf der Behandlung eines Kniegelenkdefektes wurde der degenerierte Knorpel entfernt und der subchondrale Knochen mikrofrakturiert. In den Defekt wurde eine Kollagen I/III-Matrix eingebracht, die gleichmäßig durch das subchondrale Knochenmarksblut infiltrierte (2.6.4.). Die Matrix wurde wieder entfernt und an die Größe des Defekts angepasst. Die überschüssige Matrix wurde in PBS aufgenommen und zur Stammzellisolation in Gewebekultur mit Kultivierungsmedium überführt. Zwei Wochen nach Kultivierungsbeginn konnten die ersten spindelförmigen, plastikadhärenten Zellen lichtmikroskopisch nachgewiesen werden.

#### 3.5.2. Charakterisierung humaner Stamm-/ Progenitorzellen aus einer *in vivo* zur Knorpeldefektheilung verwendeten Kollagen I/III-Matrix

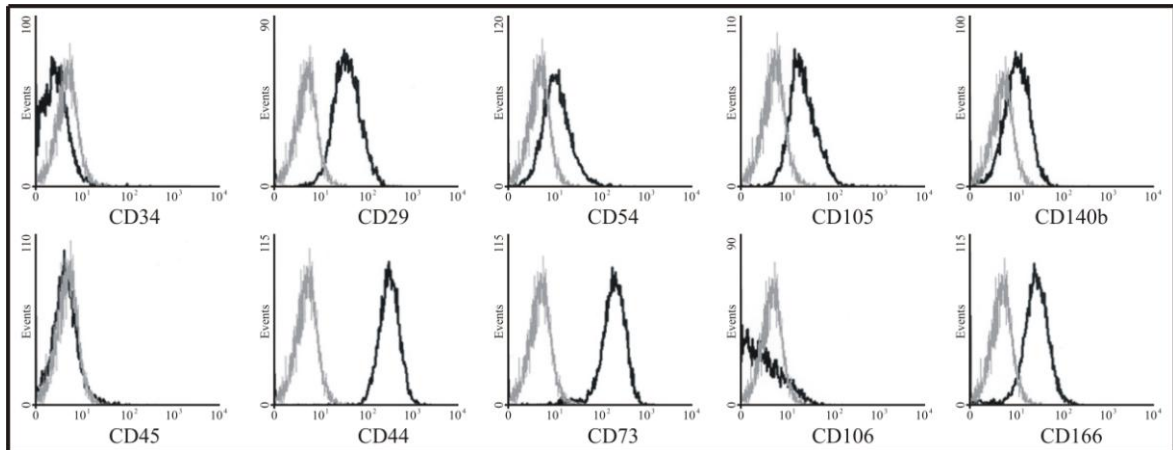
Die isolierten Zellen zeigten ein stabiles Proliferationsverhalten im Verlauf der Kultivierung. Es konnte ein täglicher Verdopplungsfaktor von 1,2 bestimmt werden (Abb. 23A). Mittels sekundärer Immunfärbung konnte die Expression des mesenchymalen Stammzellmarkers STRO-1 durch die spindelförmigen Zellen gezeigt werden (Abb. 23B). Zellen der hämatopoetischen Linien sowie eine spontane Zelldifferenzierung konnten morphologisch nicht beobachtet werden.



**Abbildung 23:** Die humanen Stamm-/ Progenitorzellen demonstrierten ein stabiles Proliferationsverhalten (A). Sie bildeten eine homogene Kultur spindelförmiger Zellen, die positiv für STRO-1 war (B). Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) dargestellt. Modifiziert nach Kramer, Böhrnsen, et al., 2006 (22). (DIC= Differential-Interferenz-Kontrast)

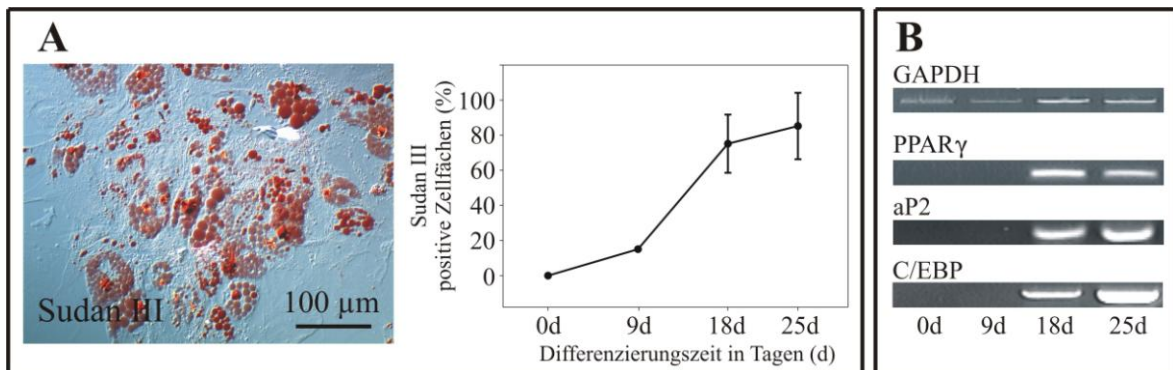
Immunphänotypisch repräsentierten die humanen Stamm-/ Progenitorzellen eine zu über 90 % homogene Zellpopulation, die in der durchflusszytometrischen Charakterisierung

negativ für CD34, CD45, CD106 sowie positiv für CD29, CD44, CD54, CD73, CD105, CD140b und CD166 war (Abb. 24).



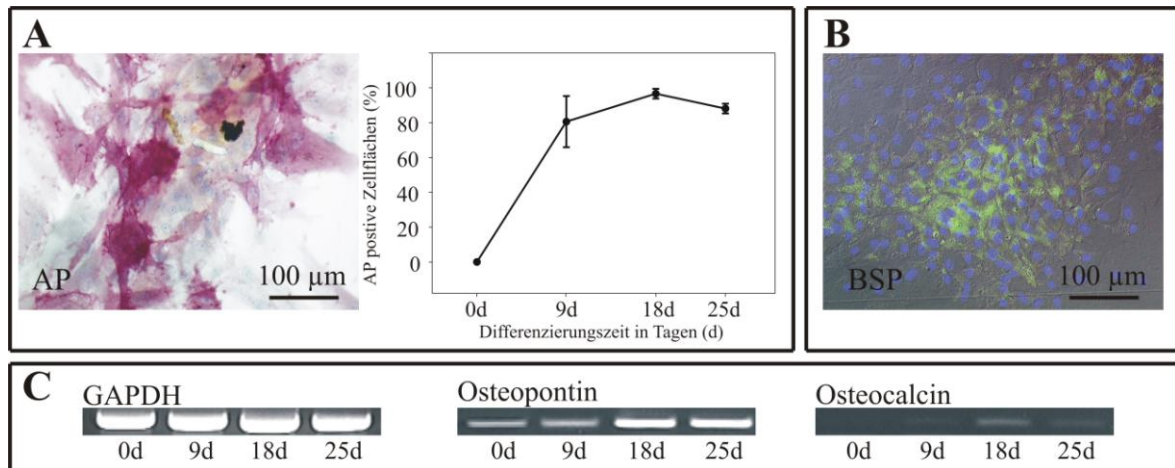
**Abbildung 24:** Immunphänotypische Oberflächencharakterisierung humaner Stamm-/ Progenitorzellen. Eine repräsentative durchflusszytometrische Analyse mehrerer unabhängiger Untersuchungen (n=3) ist dargestellt (Isotypkontrollen in grau). Modifiziert nach Kramer, Böhrnsen, et al., 2006 (22).

Die adipogene und osteogene Differenzierung der humanen Stamm-/ Progenitorzellen erfolgte im MMS-System, die chondroge Differenzierung wurde im MMB-System untersucht. Im undifferenzierten Zustand konnten in den Stamm-/ Progenitorzellisolaten keine AP oder AB positiven Zellen sowie keine Sudan III positive Lipidfärbung nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Nach erfolgter adipogener Induktion konnten die ersten Lipidvakuolen innerhalb von einer Woche durch Sudan III Färbung nachgewiesen werden (Abb. 25A). Die Anzahl Sudan III positiver Zellen nahm im Verlauf der Differenzierung kontinuierlich zu. 18 Tage nach der Behandlung mit adipogenem Induktionsmedium exprimierten die adipogen differenzierten Zellen *PPAR $\gamma$* , *aP2* und *C/EBP*, wie mittels RT-PCR-Analyse gezeigt werden konnte (Abb. 25B).



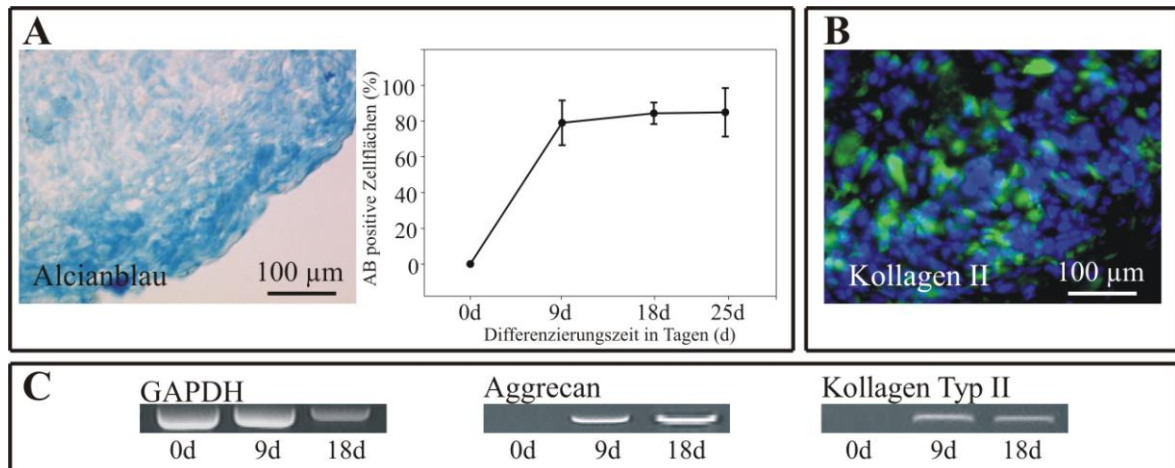
**Abbildung 25:** Adipogen differenzierte humane Stamm-/ Progenitorzellen waren Sudan III positiv (A) und exprimierten die Gene *PPAR $\gamma$* , *aP2* sowie *C/EBP* (B). GAPDH wurde als interner Standard verwendet. Modifiziert nach Kramer, Böhrnsen, et al., 2006 (22).

Im Verlauf der osteogenen Differenzierung konnte mittels histologischer Färbung eine zunehmende AP-Expression nachgewiesen werden (Abb. 26A). Die sekundäre Immunfärbung zeigte nach 25 Tagen eine deutliche Expression von BSP in den mit osteogenem Medium behandelten Kulturen (Abb. 26B). Die RT-PCR-Analyse ergab eine basale Expression von *OP* der humanen Stamm-/ Progenitorzellisolate, die während der Differenzierung zunahm (Abb. 26C). Hingegen konnte im Verlauf der Differenzierung nur während späterer Stadien eine Expression von *OC* nachgewiesen werden (Abb. 26C).



**Abbildung 26:** In osteogen induzierten humanen Stamm-/ Progenitorzellisolaten konnten AP (A) und BSP (B) positive Zellen sowie die Expression der Gene *OP* und *OC* (C) nachgewiesen werden. GAPDH wurde als interner Standard verwendet. Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) dargestellt. Modifiziert nach Kramer, Böhrnsen, et al., 2006 (22).

Die Kultivierung humaner Stamm-/ Progenitorzellen *via* MMB ermöglichte eine chondrogene Differenzierung der Zellisolate. Innerhalb der MMB konnte im Verlauf der Differenzierung eine Zunahme an proteoglykanreicher Matrix durch AB-Färbung nachgewiesen werden (Abb. 27A). Die Expression von Kollagen Typ II konnte mittels sekundärer Immunfärbungen demonstriert werden (Abb. 27B). Die RT-PCR-Analyse bestätigte die Expression von *Kollagen Typ II* und *Aggrecan* in den MMB-Kulturen (Abb. 27C).



**Abbildung 27:** Chondrogen differenzierte humane Stamm-/ Progenitorzellen waren positiv für AB (A) und Kollagen Typ II (B). Die Expression der Gene *Aggrecan* und *Kollagen Typ II* konnte mittels RT-PCR nachgewiesen werden (C). GAPDH wurde als interner Standard verwendet. Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) dargestellt. Modifiziert nach Kramer, Böhrnsen, et al., 2006 (22).

## 4. Diskussion

### 4.1. Charakterisierung adulter Stamm-/ Progenitorzellen

#### 4.1.1. Die Heterogenität des mesenchymalen Stammzellpools erschwert einen standardisierten Vergleich

Die multidirektionalen Differenzierungseigenschaften adulter Stamm-/ Progenitorzellen machen sie zu idealen Kandidaten der stammzellbasierten regenerativen Medizin. Heute legen Forschungsergebnisse nahe, dass solche Zellen ubiquitär in vielen adulten Gewebetypen des Körpers vorkommen (23,33,35,92-94). Die in dieser Arbeit untersuchten murinen Stamm-/ Progenitorzellen aus perirenalem Fettgewebe (mPAT) und mediastinalem Bindegewebe (mMST) beschreiben mögliche neue Quellen adulter Stammzellen.

Isolation, Kultivierung und Differenzierung mesenchymaler Stammzellen verschiedener Spezies unterscheiden sich oftmals signifikant (20,21,36,37) und können zu heterogenen Stammzellpopulation führen. So ist zum Beispiel bereits die Anzahl der „colony forming units fibroblast“ unterschiedlicher Mausarten stark variabel (95). Darüberhinaus ist anzunehmen, dass die Eigenschaften mesenchymaler Zellpopulationen durch die unterschiedlichen Isolations-, Kultivierungs-, und Differenzierungsbedingungen beeinflusst werden können (26). Es ist daher erforderlich eine genaue Nomenklatur sowie minimale Kriterien für den heterogenen Pool der mesenchymalen Stamm-/ Progenitorzellen zu definieren (3,25).

#### 4.1.2. Die erfolgreiche Etablierung von Stamm-/ Progenitorzellen wird durch exogene Faktoren beeinflusst

Die Zellisolation *via* Plastikadhärenz resultiert in einer heterogenen Population adulter Stamm-/ Progenitorzellen (18,95-97). Die Selektion, Qualität und Quantität von Stamm-/ Progenitorzellisolaten ist zudem abhängig von der Spezies (68,95) und dem spezifischen Isolationsgewebe (98-100). Um eine Vergleichbarkeit der untersuchten Zellisolate zu gewährleisten, wurden daher in der vorliegenden Arbeit bei der Etablierung der MMS-Methode nur NMRI-Mäuse zur Stammzellisolation verwendet. Bei der Isolation von MSC aus murinem Knochenmark konnten jedoch nur 20 % der Isolate stabil in Kultur überführt werden. Die Isolation von Zellen aus murinem perirenalem Fettgewebe bzw. mediastinalem Bindegewebe war in 100 % erfolgreich. Die Proliferationseigenschaften von Stamm-/ Progenitorzellisolaten werden zudem durch unterschiedliche Plattierungsdichten von 5-100

Zellen pro  $\text{cm}^2$  (68,101) bis  $2-4 \times 10^6$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  (95) beeinflusst (102,103). In dieser Arbeit wurden daher die Kultivierungsbedingungen optimiert und die Plattierungsdichte auf  $1 \times 10^4$  Zellen/ $\text{cm}^2$  standardisiert. Unter diesen Bedingungen zeigten die Isolate stabile, vergleichbare Proliferations- und Verdopplungseigenschaften, die mittels des V-Faktors bestimmt wurden. Eine Abnahme des zellulären Wachstums durch die zellbiologische Alterung ist bei humanen MSC beschrieben (104-107), konnte jedoch im Verlauf der Kultivierung muriner MSC-Isolate nicht nachgewiesen werden. Eine zeitabhängige Regressionen der Telomeraseaktivität *in vitro* (108) konnte auch nach längerer Kultivierung von mPAT, mMST und mBM (Passage 15) nicht bestätigt werden.

#### 4.1.3. Die FACS-Analyse allein genügt nicht zur Identifikation von mesenchymalen Stamm-/ Progenitorzellen

Die phänotypische Charakterisierung von Stamm-/ Progenitorzellen erfolgt durch die Analyse der Expression spezifischer Oberflächenmarkermoleküle (19,109-112). Im Verlauf der *in vitro*-Kultivierung kann es jedoch zu Abweichungen der Oberflächenexpression kommen (26,109,112). Um eine Vergleichbarkeit zu ermöglichen, wurden in der vorliegenden Arbeit die durchflusszytometrischen Analysen in der 4. Passage durchgeführt. Als Charakteristikum für MSC gilt die positive Expression der Oberflächenmarker CD105, CD73, CD90 sowie eine negative Expression der hämatogenen Oberflächenmarker CD34 und CD45 (3). Die hier analysierten murinen Stamm-/ Progenitorzellisolate waren negativ für die Oberflächenmarkermoleküle CD34 und CD45 und exprimierten keine Oberflächencharakteristika hämatopoetischer Stammzellen. Sie waren weiterhin positiv für CD44, CD54, CD81, CD105, CD166. Es konnten jedoch Unterschiede in der Oberflächenexpression der analysierten murinen Zellisolate festgestellt werden. Die mMST-Isolate zeigten keine Expression der Oberflächenmarker CD29, CD73, CD90 und CD140b, während diese auf mBM- und mPAT-Isolaten nachgewiesen werden konnten. Da die Expression von CD73 und CD90 als Minimalkriterium zur Charakterisierung von MSC gefordert wird (3), ist es phänotypisch nicht möglich die mMST-Isolate eindeutig als MSC zu charakterisieren.

Die uneinheitliche Expression der Markermoleküle CD90, CD49d und CD106 durch unterschiedliche Spezies ist allerdings Gegenstand wissenschaftlicher Diskussionen (19,24,109,111,113,114). Darüberhinaus können die für humane MSC geforderten Minimalkriterien (3) nicht unmittelbar auf andere Spezies übertragen werden. Die heterogene Expression von Oberflächenmarkermolekülen macht deutlich, dass neben der

FACS-Analyse weitere Untersuchungen zur exakten Charakterisierung von MSC notwendig sind (3,26,68,112). Zusätzlich belegen neuere Daten, dass mesenchymale Stamm-/ Progenitorzellen nicht anhand der durchflusszytometrischen Analyse herkömmlicher Oberflächenmarkermoleküle von Fibroblasten unterschieden werden können (26). Daher wurde in den Mindestkriterien zur Identifikation von MSC der Nachweis der osteogenen, adipogenen und chondrogenen Differenzierung gefordert (3). Allerdings wurden in neueren Arbeiten auch funktionelle Gemeinsamkeiten zwischen mesenchymalen Stammzellpopulationen und Kulturen primärer Fibroblasten herausgestellt (115,116). Gemeinsamkeiten der Isolationstechnik *via* Adhärenz der Zellen an Plastikkulturmaterialien bedingen dabei, dass immer Mischpopulationen gewonnen werden. Die unterschiedliche Häufigkeit von Stammzellen in verschiedenen Geweben beeinflusst so die scheinbare Differenzierungsfähigkeit der einzelnen Populationen.

#### 4.1.4. Murine PAT-Isolate mit höherer Differenzierungskapazität zeigen eine Expression von Oct $\frac{3}{4}$

Das regulatorische Gen Oct  $\frac{3}{4}$  wurde nur von mPAT-Isolaten exprimiert. Es spielt im Rahmen der pluripotenten embryonalen Stammzellentwicklung und Differenzierung eine besondere Rolle (117). Aktuelle Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Expression von Oct  $\frac{3}{4}$  nicht ausschließlich pluripotenten Stammzellen vorbehalten ist und zunehmend in adulten Geweben nachgewiesen werden kann (118). Die Expression von Oct  $\frac{3}{4}$  könnte ein Indikator für einen hohen Anteil multipotenter Stamm-/ Progenitorzellen in heterogenen Isolaten mit hoher Differenzierungskapazität darstellen (33). Die mPAT-Isolate exprimieren neben Oct  $\frac{3}{4}$  auch die für MSC charakteristischen Markermoleküle CD29, CD73, CD90 und CD140b und zeigen somit die größte Übereinstimmung mit MSC in der Oberflächencharakterisierung aller in dieser Arbeit untersuchten Stamm-/ Progenitorzellisolate.

#### 4.1.5. Die Differenzierung im Monolayer und MMB erfordert eine hohe Anzahl von Stamm-/ Progenitorzellen

Eine exakte Charakterisierung von MSC *in vitro* ist eine notwendige Voraussetzung für den sicheren therapeutischen Einsatz von MSC *in vivo* (3,26). Wie bereits oben dargelegt, ist hierbei der Nachweis der Differenzierungsfähigkeit das entscheidende Kriterium zur Identifikation von MSC (3). Die adipogene und osteogene Differenzierung von MSC erfolgt überwiegend in Monolayerkulturen (35-38). Eine chondrogene Differenzierung im

Monolayer war nicht erfolgreich (eigene nicht gezeigte Resultate; (60,61)). Johnstone et al. beschrieben die chondrogene Differenzierung von Stamm-/ Progenitorzellen in einem 3D-MMB-Model, das es den Zellen ermöglichte, eine kompakte Struktur zu bilden (69). Möchte man MSC im klassischen Monolayer bzw. MMB exakt charakterisieren, ist jedoch eine lange *in vitro*-Kultivierung zur Gewinnung ausreichend hoher Zellzahlen erforderlich (siehe Tabelle 1; Seite 22). Dies verlängert zum einen den Zeitraum bis zur Differenzierung und Charakterisierung und verzögert zum anderen einen möglichen therapeutischen Einsatz der MSC *in vivo*. Zudem besteht die Möglichkeit, dass sich der Immunphänotyp und das genetische Profil der MSC sowie ihre Differenzierungsfähigkeit bei andauernder *in vitro*-Kultivierung verändern (3,26).

#### 4.1.6. Die Optimierung der Differenzierung von Stamm-/ Progenitorzellen im MMS ermöglicht eine schnellere Charakterisierung mesenchymaler Stamm-/ Progenitorzellen *in vitro*

Eine optimierte Charakterisierung von MSC sollte bei geringerer Zellzahl und damit verkürzter Kultivierungszeit eine zumindest gleichwertige Differenzierung ermöglichen. In dieser Arbeit wurde die *Mesenchymale MicroSphäre* (MMS) als standardisierte Methode der 3D-*in vitro*-Differenzierung etabliert. Das MMS-System ermöglichte eine optimierte Differenzierung und Charakterisierung von MSC unter Verwendung einer bis zu 7-fach geringeren Zellzahl im Vergleich zu klassischen Protokollen (siehe Tabelle 1 und 2; Seite 22 und 23). Die MMS-Kultivierung verbesserte die adipogene Differenzierung muriner PAT-, MST- und BM-Isolate und optimierte außerdem die osteogene Differenzierung der murinen Stamm-/ Progenitorzellen im Vergleich zur klassischen Monolayerdifferenzierung. Darüberhinaus konnte im Verlauf der osteogenen sowie der adipogenen MMS-Differenzierung eine signifikante Differenzierung der mBM-, mPAT- und mMST-Isolate bereits vor Applikation der Induktionsmedien beschrieben werden. Zusammengefasst stellt die Charakterisierung von Stamm-/ Progenitorzellen unter Verwendung des MMS-Modells damit eine standardisierte Alternative zu den herkömmlichen Differenzierungsverfahren dar. Dabei bietet das neu etablierte MMS-System folgende Vorteile:

- Standardisierte Vergleichbarkeit der Differenzierung von MSC unterschiedlicher Gewebequellen
- Effizientere und kostengünstigere Charakterisierung von MSC durch Verwendung geringerer Zellzahlen und damit eine verkürzte *in vitro*-Kultivierung vor potentiell medizinischen Einsatz der Zellen *in vivo*.



## 4.2. Matrix-vermittelte Migration mesenchymaler Stamm-/ Progenitorzellen in einen Gewebedefekt

### 4.2.1. Knorpeldefekte zeigen eine limitierte Regenerationskapazität

Gelenkknorpelverletzungen haben nur eine begrenzte Möglichkeit zur Regeneration. Eine Defektheilung zeigt sich erst bei ausgedehnten Läsionen, die bis in die subchondrale Zone des Knochens reichen. Es kommt zum Ersatz des degenerierten hyalinen Gelenkknorpels durch Faserknorpel. Dieser erfüllt nur eingeschränkt die Belastungsansprüche des Gelenkes und neigt zur Abnutzung und Degeneration (42). Durch die Methode der Mikrofrakturierung wird versucht die subchondrale Zone für den Regenerationsprozess des Knorpels zu nutzen (49,52,119). Die Eigenschaften des so regenerierten Knorpels bleiben jedoch hinter denen des Ursprungsgewebes zurück (120,121). Dennoch gibt es Grund zu der Annahme, dass die Aktivierung von Stamm-/ Progenitorzellen des subchondralen Knochens die Reparatur von Knorpeldefekten verbessern könnte (122). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass humane mesenchymale Stamm-/ Progenitorzellen des Knochenmarks, nach erfolgter Mikrofrakturierung des subchondralen Knochens entlang der Leitstruktur einer Kollagen I/III-Matrix in einen Knorpeldefekt migrieren (22).

### 4.2.2. Die Stamm-/ Progenitorzellen aus einer *in vivo* zur Knorpeldefektheilung verwendeten Matrix zeigen Charakteristika humaner mesenchymaler Stammzellen

Prof. Dr. Behrens (Klinik für Chirurgie des Stütz- und Bewegungsapparates, Sektion für Orthopädie, Leitung: Prof. Dr. Russlies; Universität zu Lübeck) entwickelte eine Methode zur Therapie von Knorpeldefekten (64), bei der das subchondrale Knochenmark durch Mikrofrakturierung eröffnet wird und eine Kollagen I/III-Matrix als Trägermaterial für Knochenmarkszellen dient. Die funktionelle Hypothese dieser als „Autologe Matrix-Induzierte Chondrogenese“ (AMIC) bezeichneten Methode ist, dass mit dem Knochenmarkblut Reparatur-vermittelnde MSC an den Ort der Läsion gelangen. Die Migration der MSC wird dabei zum einen durch die schwammartige Sogwirkung der Matrix und zum anderen durch die Verwendung von autologem Serum begünstigt. Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit konnte ein *Proof-of-concept* dieser Methode auf zellulärer Ebene erarbeitet werden.

Bereits zwei Wochen nach Überführen der Kollagen I/III-Matrix in die Zellkultur, konnten plastikadhärente Kolonien spindelförmiger Zellen *in vitro* nachgewiesen werden. Diese Zellen zeigten eine gute Proliferationskapazität über mehrere Passagen *in vitro* und stellten durchflusszytometrisch eine homogene Zellpopulation dar. Die humanen, aus der Kollagen

I/III-Matrix isolierten Stamm-/ Progenitorzellen waren negativ für die hämatogenen Markermoleküle CD34 und CD45 und exprimierten somit keine Oberflächencharakteristika hämatopoetischer Zellen (3). Sie waren weiterhin positiv für CD29, CD44, CD54, CD73 CD105, CD166 sowie für zwei zur Anreicherung humaner MSC genutzten Oberflächenantigene (STRO-1 (29,30,123) und CD140 (31)). Um eine zeitsparende *in vitro*-Charakterisierung zu ermöglichen, erfolgte die adipogene und osteogene Differenzierung der aus der Matrix isolierten Stamm-/ Progenitorzellen im MMS-System. Die chondrogene Differenzierung erfolgte im klassischen MMB-Modell. Mittels histochemischer Färbungen, sekundärer Immunfluoreszenz und RT-PCR konnte die Fähigkeit zur Differenzierung in Knorpel-, Knochen- und Fettzellen nachgewiesen werden.

#### 4.2.3. Die matrix-vermittelte Migration von Stamm-/ Progenitorzellen an den Ort des Gewebedefekts ermöglicht eine direkte Anwendung adulter Stammzellen in vivo

Die Proliferation und Differenzierung mesenchymaler Stamm-/ Progenitorzellen wird durch extrazelluläre Kollagengerüste beeinflusst (124-127). Kollagen I-Matrices ermöglichen eine verbesserte Migration von Progenitorzellen aus dem subchondralen Knochen in den Knorpeldefekt (128). Die in dieser Arbeit verwendete AMIC-Methode (64) ermöglichte nach Mikrofrakturierung des subchondralen Knochens und Einbringen einer Kollagen I/III-Matrix die Migration von MSC an den Ort eines Knorpeldefektes. Die Kollagen I/III-Matrix wurde mit einem partiell autologen Fibrinkleber fest in den Defekt eingebracht. Eine Traumatisierung des umliegenden Gewebes durch Fixationsnähte, die die Regeneration negativ beeinflussen könnten (129), wurde vermieden. Die AMIC-Methode verursachte keinen Schaden an vitalem Knorpel und konnte in einem Operationsschritt angewendet werden. Sie war dadurch zeitsparender und risikoarmer für den Patienten, da keine wiederholte oder verlängerte Anästhesie notwendig war. Die Gewinnung von autologen Chondrozyten zur Geweberegeneration erfordert hingegen einen ersten operativen Eingriff zur Exzision von gesundem Gewebe (57), das *in vitro* expandiert und in einer zweiten Operation reimplantiert werden muss. Bei der Expansion der Primärzellen *in vitro* verlieren diese jedoch rasch ihre funktionalen Eigenschaften und zeigen eine zunehmende Dedifferenzierung (58). Es resultiert meist eine limitierte Anzahl transplantierbarer Primärzellen und ein oftmals eingeschränktes Regenerationspotential des Implantats. In dieser Arbeit konnte die Hypothese bestätigt werden, dass die Stimulation des Knochenmarks durch Perforation des subchondralen Knochens in Kombination mit

einer Kollagen I/III-Matrix zu einer Migration von mesenchymalen Stammzellen an den Ort eines Knorpelgewebedefektes führen kann. Eine aufwändige und kostenintensive *in vitro*-Expansion von autologen Stamm-/ Progenitorzellen, gefolgt von einer für den Patienten belastenden Reimplantation der Stammzellen, könnte damit in Zukunft nicht länger notwendig sein.

Sollte eine *in vitro*-Kultivierung und Charakterisierung von MSC jedoch unumgänglich sein, ermöglicht das ebenfalls in der vorliegenden Promotionsarbeit etablierte MMS-System eine optimierte und rasche *in vitro*-Charakterisierung der Spenderzellen damit diese ohne Zeitverlust *in vivo* zur Anwendung kommen können.

#### **4.3. Zukünftige Stammzellapplikationen und Anwendungen**

Die Analyse von 3D-Differenzierungsmodellen und die Kombination adulter Stammzelltherapie mit matrix-gerichteter Defektheilung ermöglichen in Zukunft vielleicht neue Stammzellapplikationen auf dem Gebiet der regenerativen Medizin. Das 3D-MMS-Differenzierungsmodell erlaubt eine verbesserte und zeitsparende Differenzierung sowie Charakterisierung mesenchymaler Stamm-/ Progenitorzellen *in vitro*. Die Zellen würden somit schneller für *in vivo*-Studien zur Verfügung stehen. Eine Kultivierung von MSC in einem 3D-Zellverband bietet zudem die Möglichkeit der *in vitro*-Analyse von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen. Es wurden bereits mehrere Faktoren identifiziert, welche die Proliferation und Differenzierung von MSC beeinflussen können. Dazu gehören z.B. N-Cadherin, Integrin- $\alpha$ 1, - $\alpha$ 5 (CD49e), - $\beta$ 1 (CD29), VCAM1 (CD106) und weitere extrazelluläre Matrixproteine ebenso wie Transkriptionsfaktoren (32,130,131). So spielt z.B. der Oberflächenmarker CD44 eine Rolle bei der Interaktion zwischen MSC und hämatopoetischen Stamm-/ Progenitorzellen (130,132). Ein besseres Verständnis dieser Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen unter Verwendung des MMS-Systems könnte es vielleicht in Zukunft ermöglichen, gezielt die Migration von Stamm-/ Progenitorzellen zu verbessern und die Zellen *in vivo* an den Ort eines Gewebedefektes zu leiten. Eine zeitaufwendige *in vitro*-Kultivierung und Differenzierung mesenchymaler Stamm-/ Progenitorzellen könnte auf diese Weise vermieden werden. Die in dieser Arbeit beschriebene AMIC-Methode sowie die Bestätigung der zugrundeliegenden zellulären Hypothese sind ein Beispiel für eine solche direkte stammzellvermittelte Defektheilung.

Aktuell befassen sich mehr als 50 Studien mit der Anwendung mesenchymaler Stamm-/ Progenitorzellen in der regenerativen Medizin (<http://www.clinicaltrials.gov>, 12.03.2009). Dazu gehören unter anderem die Regeneration von Knorpeldefekten (Phase I/II Study of

Chondrogen Delivered by Intra-Articular Injection Following Meniscectomy, UCLA, Los Angeles, CA, USA), die Anwendung von MSC im Bereich der Kardiochirurgie (Prospective Randomized Study of Mesenchymal Stem Cell Therapy in Patients Undergoing Cardiac Surgery (PROMETHEUS), National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI), Johns Hopkins University, MD, USA) sowie der Einsatz von mesenchymalen Stamm-/ Progenitorzellen zur Therapie von GVHD (Mesenchymal Stem Cell Infusion as Prevention for Graft Rejection and Graft-Versus-Host Disease, Universität Liege, Belgien). Die Ergebnisse dieser und zukünftiger klinischer Studien werden zeigen, ob die Hoffnungen, die in stammzellbasierte Therapien gesetzt werden, tatsächlich gerechtfertigt sind.

## 5. Zusammenfassung

Eine sichere Anwendung von mesenchymalen Stamm-/ Progenitorzellen (MSC) in der regenerativen Medizin erfordert zuvor eine genaue Charakterisierung dieser Zellen anhand definierter Kriterien: Erstens (1) die Plastikadhärenz von MSC, zweitens (2) die positive Expression der Oberflächenmarkermoleküle CD105, CD73 und CD90 sowie eine negative Expression der hämatogenen Markermoleküle CD34 und CD45 und drittens (3) die erfolgreiche Differenzierung von MSC in Knorpel-, Knochen- und Fettzellen.

Die klassische osteogene, adipogene und chondrogene *in vitro*-Differenzierung von MSC ist sehr zeit- und kostenintensiv und erfordert eine große Anzahl an Stammzellen. Dadurch können weniger Zellen für eine medizinische Anwendung genutzt werden bzw. vor der Applikation muss eine zeitaufwendige Vermehrung der Zellen *in vitro* durchgeführt werden.

Das in dieser Arbeit etablierte System der Differenzierung von MSC *via Mesenchymale MikroSphären* (MMS) benötigt nur in etwa 1/7 der in den klassischen Differenzierungsprotokollen eingesetzten Zellen. Darüberhinaus wird durch das MMS-System eine standardisierte Differenzierung von MSC *in vitro* ermöglicht. Um die Verwendbarkeit des MMS-Systems zu demonstrieren, wurden plastikadhärente Zellen aus murinem Knochenmark sowie aus neuen Stammzellquellen, dem murinen perirenal Fettgewebe und dem murinen mediastinalen Bindegewebe, isoliert. Diese Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie, Proliferationsanalyse und Differenzierung in Knorpel-, Knochen- und Fettzellen charakterisiert. Hierbei konnte auch im Vergleich zu klassischen Differenzierungsprotokollen eine effiziente Differenzierung im MMS-System nachgewiesen werden.

*In vivo* sind Stammzellen an Reparaturprozessen von Gewebedefekten nach Trauma oder Krankheit beteiligt. Die Vermittlung der direkten Einwanderung dieser Zellen an den Ort einer Läsion im Körper wäre die optimale Lösung, um eine artifizielle und zeitaufwendige *in vitro*-Kultivierung zu vermeiden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass humane MSC des subchondralen Knochenmarkes, entlang einer bei der operativen Mikrofrakturierung verwendeten Kollagen I/III-Matrix, an den Ort der Defektheilung geführt werden. Sie können so zu einer direkten *in vivo*-Reparatur des Gewebedefektes beitragen. Die aus der Matrix isolierten humanen MSC wurden *in vitro* anhand ihrer Proliferationseigenschaften, der Expression von Oberflächenmarkermolekülen und der Differenzierung in Knorpel-, Knochen- und Fettzellen charakterisiert.

Die Analyse der Genexpression mittels Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung und semi-quantitativer RT-PCR sowie der Proteinexpression mittels histochemischer Färbungen und sekundärer Immunfluoreszenz wurde jeweils zum Nachweis einer erfolgreichen Differenzierung verwendet.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Giordano A, Galderisi U, Marino IR: From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 1, 27-35 (2007)
2. Arthur A, Zannettino A, Gronthos S: The therapeutic applications of multipotential mesenchymal/stromal stem cells in skeletal tissue repair. *J Cell Physiol* 2, 237-245 (2009)
3. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E: Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 4, 315-317 (2006)
4. Valtieri M und Sorrentino A: The mesenchymal stromal cell contribution to homeostasis. *J Cell Physiol* 2, 296-300 (2008)
5. Uriel J: Cancer, retrodifferentiation, and the myth of Faust. *Cancer Res* 11 Pt. 2, 4269-4275 (1976)
6. McKay R: Stem cells in the central nervous system. *Science* 5309, 66-71 (1997)
7. Till JE und McCulloch EA: A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 213-222 (1961)
8. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M, Li T, Isner JM, Asahara T: Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 7, 3422-3427 (2000)
9. Seale P und Rudnicki MA: A new look at the origin, function, and "stem-cell" status of muscle satellite cells. *Dev Biol* 2, 115-124 (2000)
10. Ghazizadeh S und Taichman LB: Multiple classes of stem cells in cutaneous epithelium: a lineage analysis of adult mouse skin. *EMBO J* 6, 1215-1222 (2001)
11. Slack JM: Stem cells in epithelial tissues. *Science* 5457, 1431-1433 (2000)
12. Kruse C, Kajahn J, Petschnik AE, Maass A, Klink E, Rapoport DH, Wedel T: Adult pancreatic stem/progenitor cells spontaneously differentiate in vitro into multiple cell lineages and form teratoma-like structures. *Ann Anat* 6, 503-517 (2006)
13. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV: Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 3, 381-390 (1966)

14. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS: The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 4, 393-403 (1970)
15. Owen M und Friedenstein AJ: Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp* 42-60 (1988)
16. Owen M: Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci Suppl* 63-76 (1988)
17. Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE: Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem* 2, 278-294 (1997)
18. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN: Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 5, 267-274 (1976)
19. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 5411, 143-147 (1999)
20. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH: Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 12, 4279-4295 (2002)
21. Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH: Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 5, 1669-1675 (2004)
22. Kramer J, Böhrnsen F, Lindner U, Behrens P, Schlenke P, Rohwedel J: In vivo matrix-guided human mesenchymal stem cells. *Cell Mol Life Sci* 5, 616-626 (2006)
23. da Silva ML, Chagastelles PC, Nardi NB: Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci Pt* 11, 2204-2213 (2006)
24. da Silva ML, Caplan AI, Nardi NB: In Search of the in vivo Identity of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells* (2008)
25. Ho AD, Wagner W, Franke W: Heterogeneity of mesenchymal stromal cell preparations. *Cytotherapy* 4, 320-330 (2008)
26. Wagner W und Ho AD: Mesenchymal stem cell preparations--comparing apples and oranges. *Stem Cell Rev* 4, 239-248 (2007)
27. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A: Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 5, 393-395 (2005)



28. Prockop DJ: Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 5309, 71-74 (1997)
29. Simmons PJ und Torok-Storb B: Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* 1, 55-62 (1991)
30. Dennis JE, Carbillet JP, Caplan AI, Charbord P: The STRO-1+ marrow cell population is multipotential. *Cells Tissues Organs* 2-3, 73-82 (2002)
31. Buhring HJ, Battula VL, Treml S, Schewe B, Kanz L, Vogel W: Novel markers for the prospective isolation of human MSC. *Ann N Y Acad Sci* 262-271 (2007)
32. Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U, Blake J, Schwager C, Eckstein V, Ansorge W, Ho AD: Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol* 11, 1402-1416 (2005)
33. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM: Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 6893, 41-49 (2002)
34. Kogler G, Sensken S, Airey JA, Trapp T, Muschen M, Feldhahn N, Liedtke S, Sorg RV, Fischer J, Rosenbaum C, Greschat S, Knipper A, Bender J, Degistirici O, Gao J, Caplan AI, Colletti EJ, Almeida-Porada G, Muller HW, Zanjani E, Wernet P: A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med* 2, 123-135 (2004)
35. Rotter N, Oder J, Schlenke P, Lindner U, Böhrnsen F, Kramer J, Rohwedel J, Huss R, Brandau S, Wollenberg B, Lang S: Isolation and characterization of adult stem cells from human salivary glands. *Stem Cells Dev* 3, 509-518 (2008)
36. Tropel P, Noel D, Platet N, Legrand P, Benabid AL, Berger F: Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. *Exp Cell Res* 2, 395-406 (2004)
37. Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN: Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells* 1, 105-110 (2003)
38. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, Drago JL, Ashjian P, Thomas B, Benhaim P, Chen I, Fraser J, Hedrick MH: Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs* 3, 101-109 (2003)
39. Baumgaertner MR, Cannon WD, Jr., Vittori JM, Schmidt ES, Maurer RC: Arthroscopic debridement of the arthritic knee. *Clin Orthop Relat Res* 253, 197-202 (1990)

40. Convery FR, Meyers MH, Akeson WH: Fresh osteochondral allografting of the femoral condyle. *Clin Orthop Relat Res* 273, 139-145 (1991)
41. Bobic V: Arthroscopic osteochondral autograft transplantation in anterior cruciate ligament reconstruction: a preliminary clinical study. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 4, 262-264 (1996)
42. Redman SN, Oldfield SF, Archer CW: Current strategies for articular cartilage repair. *Eur Cell Mater* 23-32 (2005)
43. O'Driscoll SW, Keeley FW, Salter RB: Durability of regenerated articular cartilage produced by free autogenous periosteal grafts in major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. A follow-up report at one year. *J Bone Joint Surg Am* 4, 595-606 (1988)
44. Homminga GN, Bulstra SK, Bouwmeester PS, van der Linden AJ: Perichondral grafting for cartilage lesions of the knee. *J Bone Joint Surg Br* 6, 1003-1007 (1990)
45. Bruns J, Behrens P, Silbermann M: [The principle of autogeneic rib perichondrial transplantation in the treatment of deep articular cartilage defects]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 2, 138-144 (1997)
46. Bouwmeester PS, Kuijjer R, Homminga GN, Bulstra SK, Geesink RG: A retrospective analysis of two independent prospective cartilage repair studies: autogenous perichondrial grafting versus subchondral drilling 10 years post-surgery. *J Orthop Res* 2, 267-273 (2002)
47. Bab I, Sela J, Stein H: Transplantation of free perichondrial grafts into rabbit articular cartilage is associated with matrix vesicle calcification. *Acta Anat (Basel)* 1, 53-60 (1982)
48. Khan IM, Gilbert SJ, Singhrao SK, Duance VC, Archer CW: Cartilage integration: evaluation of the reasons for failure of integration during cartilage repair. A review. *Eur Cell Mater* 26-39 (2008)
49. Steadman JR, Rodkey WG, Briggs KK, Rodrigo JJ: [The microfracture technic in the management of complete cartilage defects in the knee joint]. *Orthopade* 1, 26-32 (1999)
50. Steadman JR, Briggs KK, Rodrigo JJ, Kocher MS, Gill TJ, Rodkey WG: Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee: average 11-year follow-up. *Arthroscopy* 5, 477-484 (2003)
51. Steadman JR, Miller BS, Karas SG, Schlegel TF, Briggs KK, Hawkins RJ: The microfracture technique in the treatment of full-thickness chondral lesions of the knee in National Football League players. *J Knee Surg* 2, 83-86 (2003)
52. Miller BS, Steadman JR, Briggs KK, Rodrigo JJ, Rodkey WG: Patient satisfaction and outcome after microfracture of the degenerative knee. *J Knee Surg* 1, 13-17 (2004)

53. Behrens P, Ehlers EM, Kochermann KU, Rohwedel J, Russlies M, Plotz W: [New therapy procedure for localized cartilage defects. Encouraging results with autologous chondrocyte implantation]. *MMW Fortschr Med* 45, 49-51 (1999)
54. Bachmann G, Basad E, Lommel D, Steinmeyer J: [MRI in the follow-up of matrix-supported autologous chondrocyte transplantation (MACI) and microfracture]. *Radiologe* 8, 773-782 (2004)
55. Haddo O, Mahroof S, Higgs D, David L, Pringle J, Bayliss M, Cannon SR, Briggs TW: The use of chondroglide membrane in autologous chondrocyte implantation. *Knee* 1, 51-55 (2004)
56. Ronga M, Grassi FA, Bulgheroni P: Arthroscopic autologous chondrocyte implantation for the treatment of a chondral defect in the tibial plateau of the knee. *Arthroscopy* 1, 79-84 (2004)
57. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L: Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 14, 889-895 (1994)
58. von der Mark K, Gauss V, von der Mark H, Müller P: Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature* 5611, 531-532 (1977)
59. Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, Goldberg VM: Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 4, 579-592 (1994)
60. Yoo JU, Barthel TS, Nishimura K, Solchaga L, Caplan AI, Goldberg VM, Johnstone B: The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am* 12, 1745-1757 (1998)
61. Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO, Pittenger MF: Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng* 4, 415-428 (1998)
62. Kramer J, Böhrnsen F, Schlenke P, Rohwedel J: Stem cell-derived chondrocytes for regenerative medicine. *Transplant Proc* 3, 762-765 (2006)
63. Hegert C, Kramer J, Hargus G, Müller J, Guan K, Wobus AM, Müller PK, Rohwedel J: Differentiation plasticity of chondrocytes derived from mouse embryonic stem cells. *J Cell Sci Pt* 23, 4617-4628 (2002)
64. Behrens P: Matrix-coupled microfracture - a new concept for cartilage defect repair (in German). *Arthroskopie* 193-197 (2005)
65. Harley CB, Futcher AB, Greider CW: Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 6274, 458-460 (1990)

66. Greider CW und Blackburn EH: Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* 2 Pt 1, 405-413 (1985)
67. Morin GB: The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* 3, 521-529 (1989)
68. Meirelles LS und Nardi NB: Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *Br J Haematol* 4, 702-711 (2003)
69. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU: In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 1, 265-272 (1998)
70. Ogawa R, Mizuno H, Watanabe A, Migita M, Shimada T, Hyakusoku H: Osteogenic and chondrogenic differentiation by adipose-derived stem cells harvested from GFP transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 4, 871-877 (2004)
71. Eslaminejad MB, Nikmahzar A, Taghiyar L, Nadri S, Massumi M: Murine mesenchymal stem cells isolated by low density primary culture system. *Dev Growth Differ* 6, 361-370 (2006)
72. Yokoyama M, Miwa H, Maeda S, Wakitani S, Takagi M: Influence of fetal calf serum on differentiation of mesenchymal stem cells to chondrocytes during expansion. *J Biosci Bioeng* 1, 46-50 (2008)
73. Romeis B, Böck P, Denk H, Künzle H, Plenk H, Rüschoff J, Sellner W: *Mikroskopische Technik*. 17. Aufl., 213-233, Urban und Schwarzenberg, Wien (1989)
74. Coons AH: Labelled antigens and antibodies. *Annu Rev Microbiol* 333-352 (1954)
75. Gorski JP, Griffin D, Dudley G, Stanford C, Thomas R, Huang C, Lai E, Karr B, Solursh M: Bone acidic glycoprotein-75 is a major synthetic product of osteoblastic cells and localized as 75- and/or 50-kDa forms in mineralized phases of bone and growth plate and in serum. *J Biol Chem* 25, 14956-14963 (1990)
76. Kasugai S, Nagata T, Sodek J: Temporal studies on the tissue compartmentalization of bone sialoprotein (BSP), osteopontin (OPN), and SPARC protein during bone formation in vitro. *J Cell Physiol* 3, 467-477 (1992)
77. Linsenmayer TF und Hendrix MJ: Monoclonal antibodies to connective tissue macromolecules: type II collagen. *Biochem Biophys Res Commun* 2, 440-446 (1980)
78. Schmid TM und Linsenmayer TF: Immunohistochemical localization of short chain cartilage collagen (type X) in avian tissues. *J Cell Biol* 2, 598-605 (1985)

79. Yamada G, Kioussi C, Schubert FR, Eto Y, Chowdhury K, Pituello F, Gruss P: Regulated expression of Brachyury(T), Nkx1.1 and Pax genes in embryoid bodies. *Biochem Biophys Res Commun* 2, 552-563 (1994)
80. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology* 17-27 (1992)
81. Birney E, Andrews D, Caccamo M, Chen Y, Clarke L, Coates G, Cox T, Cunningham F, Curwen V, Cutts T, Down T, Durbin R, Fernandez-Suarez XM, Flicek P, Graf S, Hammond M, Herrero J, Howe K, Iyer V, Jekosch K, Kahari A, Kasprzyk A, Keefe D, Kokocinski F, Kulesha E, London D, Longden I, Melsopp C, Meidl P, Overduin B, Parker A, Proctor G, Prlic A, Rae M, Rios D, Redmond S, Schuster M, Sealy I, Searle S, Severin J, Slater G, Smedley D, Smith J, Stabenau A, Stalker J, Trevanion S, Ureta-Vidal A, Vogel J, White S, Woodward C, Hubbard TJ: Ensembl 2006. *Nucleic Acids Res Database issue*, D556-D561 (2006)
82. Rozen S und Skaletsky H: Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 365-386 (2000)
83. Walcz E, Deak F, Erhardt P, Coulter SN, Fulop C, Horvath P, Doege KJ, Glant TT: Complete coding sequence, deduced primary structure, chromosomal localization, and structural analysis of murine aggrecan. *Genomics* 2, 364-371 (1994)
84. Metsaranta M, Toman D, de Crombrughe B, Vuorio E: Mouse type II collagen gene. Complete nucleotide sequence, exon structure, and alternative splicing. *J Biol Chem* 25, 16862-16869 (1991)
85. Rodriguez AM, Elabd C, Delteil F, Astier J, Vernochet C, Saint-Marc P, Guesnet J, Guezennec A, Amri EZ, Dani C, Ailhaud G: Adipocyte differentiation of multipotent cells established from human adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 2, 255-263 (2004)
86. Lin Y, Luo E, Chen X, Liu L, Qiao J, Yan Z, Li Z, Tang W, Zheng X, Tian W: Molecular and cellular characterization during chondrogenic differentiation of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and cartilage formation in vivo. *J Cell Mol Med* 4, 929-939 (2005)
87. Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS, Kennedy MB, Pockwinse S, Lian JB, Stein GS: Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol* 3, 420-430 (1990)
88. Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelman BM: mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev* 10, 1224-1234 (1994)

89. Bernlohr DA, Doering TL, Kelly TJ, Jr., Lane MD: Tissue specific expression of p422 protein, a putative lipid carrier, in mouse adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2, 850-855 (1985)
90. Cook KS, Min HY, Johnson D, Chaplinsky RJ, Flier JS, Hunt CR, Spiegelman BM: Adipsin: a circulating serine protease homolog secreted by adipose tissue and sciatic nerve. *Science* 4813, 402-405 (1987)
91. Ng LJ, Wheatley S, Muscat GE, Conway-Campbell J, Bowles J, Wright E, Bell DM, Tam PP, Cheah KS, Koopman P: SOX9 binds DNA, activates transcription, and coexpresses with type II collagen during chondrogenesis in the mouse. *Dev Biol* 1, 108-121 (1997)
92. Young HE, Steele TA, Bray RA, Hudson J, Floyd JA, Hawkins K, Thomas K, Austin T, Edwards C, Cuzzourt J, Duenzl M, Lucas PA, Black AC, Jr.: Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *Anat Rec* 1, 51-62 (2001)
93. Aust L, Devlin B, Foster SJ, Halvorsen YD, Hicok K, du LT, Sen A, Willingmyre GD, Gimble JM: Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. *Cytotherapy* 1, 7-14 (2004)
94. Sahin MB, Schwartz RE, Buckley SM, Heremans Y, Chase L, Hu WS, Verfaillie CM: Isolation and characterization of a novel population of progenitor cells from unmanipulated rat liver. *Liver Transpl* 3, 333-345 (2008)
95. Phinney DG, Kopen G, Isaacson RL, Prockop DJ: Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. *J Cell Biochem* 4, 570-585 (1999)
96. Xu CX, Hendry JH, Testa NG, Allen TD: Stromal colonies from mouse marrow: characterization of cell types, optimization of plating efficiency and its effect on radiosensitivity. *J Cell Sci* 453-466 (1983)
97. Kuznetsov SA, Krebsbach PH, Satomura K, Kerr J, Riminucci M, Benayahu D, Robey PG: Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo. *J Bone Miner Res* 9, 1335-1347 (1997)
98. Phinney DG, Kopen G, Righter W, Webster S, Tremain N, Prockop DJ: Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells. *J Cell Biochem* 3, 424-436 (1999)
99. Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ: Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 14, 7841-7845 (2001)
100. 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* 5, 1294-1301 (2006)

101. Peister A, Mellad JA, Larson BL, Hall BM, Gibson LF, Prockop DJ: Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood* 5, 1662-1668 (2004)
102. Sekiya I, Larson BL, Smith JR, Pochampally R, Cui JG, Prockop DJ: Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. *Stem Cells* 6, 530-541 (2002)
103. Javazon EH, Colter DC, Schwarz EJ, Prockop DJ: Rat marrow stromal cells are more sensitive to plating density and expand more rapidly from single-cell-derived colonies than human marrow stromal cells. *Stem Cells* 3, 219-225 (2001)
104. Digirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R, Prockop DJ: Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol* 2, 275-281 (1999)
105. Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW: Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp Hematol* 5, 414-425 (2004)
106. Fehrer C, Laschober G, Lepperdinger G: Aging of murine mesenchymal stem cells. *Ann N Y Acad Sci* 235-242 (2006)
107. Roobrouck VD, Ulloa-Montoya F, Verfaillie CM: Self-renewal and differentiation capacity of young and aged stem cells. *Exp Cell Res* 9, 1937-1944 (2008)
108. Izadpanah R, Trygg C, Patel B, Kriedt C, Dufour J, Gimble JM, Bunnell BA: Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem* 5, 1285-1297 (2006)
109. Conget PA und Minguell JJ: Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol* 1, 67-73 (1999)
110. Deans RJ und Moseley AB: Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* 8, 875-884 (2000)
111. Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM: Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol* 1, 54-63 (2001)
112. Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortessidis A, Simmons PJ: Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci Pt* 9, 1827-1835 (2003)
113. Minguell JJ, Erices A, Conget P: Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 6, 507-520 (2001)

114. Beyer NN und da Silva ML: Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. *Handb Exp Pharmacol* 174, 249-282 (2006)
115. Haniffa MA, Wang XN, Holtick U, Rae M, Isaacs JD, Dickinson AM, Hilkens CM, Collin MP: Adult human fibroblasts are potent immunoregulatory cells and functionally equivalent to mesenchymal stem cells. *J Immunol* 3, 1595-1604 (2007)
116. Haniffa MA, Collin MP, Buckley CD, Dazzi F: Mesenchymal stem cells: the fibroblasts' new clothes? *Haematologica* (2008)
117. Niwa H: Molecular mechanism to maintain stem cell renewal of ES cells. *Cell Struct Funct* 3, 137-148 (2001)
118. Zangrossi S, Marabese M, Broggin M, Giordano R, D'Erasmus M, Montelatici E, Intini D, Neri A, Pesce M, Rebulli P, Lazzari L: Oct-4 expression in adult human differentiated cells challenges its role as a pure stem cell marker. *Stem Cells* 7, 1675-1680 (2007)
119. Steadman JR, Rodkey WG, Briggs KK: Microfracture to treat full-thickness chondral defects: surgical technique, rehabilitation, and outcomes. *J Knee Surg* 3, 170-176 (2002)
120. Lee HS, Huang GT, Chiang H, Chiou LL, Chen MH, Hsieh CH, Jiang CC: Multipotential mesenchymal stem cells from femoral bone marrow near the site of osteonecrosis. *Stem Cells* 2, 190-199 (2003)
121. Frisbie DD, Oxford JT, Southwood L, Trotter GW, Rodkey WG, Steadman JR, Goodnight JL, McIlwraith CW: Early events in cartilage repair after subchondral bone microfracture. *Clin Orthop Relat Res* 407, 215-227 (2003)
122. Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ: Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 4, 532-553 (1993)
123. Gronthos S, Graves SE, Ohta S, Simmons PJ: The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood* 12, 4164-4173 (1994)
124. Salasznyk RM, Williams WA, Boskey A, Batorsky A, Plopper GE: Adhesion to Vitronectin and Collagen I Promotes Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *J Biomed Biotechnol* 1, 24-34 (2004)
125. Batorsky A, Liao J, Lund AW, Plopper GE, Stegemann JP: Encapsulation of adult human mesenchymal stem cells within collagen-agarose microenvironments. *Biotechnol Bioeng* 4, 492-500 (2005)
126. Mauney JR, Volloch V, Kaplan DL: Matrix-mediated retention of adipogenic differentiation potential by human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells during ex vivo expansion. *Biomaterials* 31, 6167-6175 (2005)



127. Chen CW, Tsai YH, Deng WP, Shih SN, Fang CL, Burch JG, Chen WH, Lai WF: Type I and II collagen regulation of chondrogenic differentiation by mesenchymal progenitor cells. *J Orthop Res* 2, 446-453 (2005)
128. Buma P, Pieper JS, van Tienen T, van Susante JL, van der Kraan PM, Veerkamp JH, van den Berg WB, Veth RP, van Kuppevelt TH: Cross-linked type I and type II collagenous matrices for the repair of full-thickness articular cartilage defects--a study in rabbits. *Biomaterials* 19, 3255-3263 (2003)
129. Dorotka R, Bindreiter U, Macfelda K, Windberger U, Nehrer S: Marrow stimulation and chondrocyte transplantation using a collagen matrix for cartilage repair. *Osteoarthritis Cartilage* 8, 655-664 (2005)
130. Wagner W, Wein F, Roderburg C, Saffrich R, Faber A, Krause U, Schubert M, Benes V, Eckstein V, Maul H, Ho AD: Adhesion of hematopoietic progenitor cells to human mesenchymal stem cells as a model for cell-cell interaction. *Exp Hematol* 2, 314-325 (2007)
131. Gottschling S, Saffrich R, Seckinger A, Krause U, Horsch K, Miesala K, Ho AD: Human mesenchymal stromal cells regulate initial self-renewing divisions of hematopoietic progenitor cells by a beta1-integrin-dependent mechanism. *Stem Cells* 3, 798-806 (2007)
132. Wagner W, Wein F, Roderburg C, Saffrich R, Diehlmann A, Eckstein V, Ho AD: Adhesion of human hematopoietic progenitor cells to mesenchymal stromal cells involves CD44. *Cells Tissues Organs* 1-2, 160-169 (2008)

## 7. Anhang

### 7.1. Eigene Publikationen

#### **Originalarbeiten:**

---

**Böhrnsen F**, Lindner U, Meier M, Gadallah A, Schlenke P, Lehnert H, Rohwedel J, Kramer J: Murine mesenchymal progenitor cells from different tissues differentiated *via* mesenchymal microspheres into the mesodermal direction. *BMC Cell Biol* 92 (2009)

**Böhrnsen F**, Lindner U, Rotter N, Meier M, Rohwedel J, Kramer J: One-step tracheostomy derived human mesenchymal stem cells. (eingereicht 2009)

Lindner U, Kramer J, Behrends J, Driller B, **Böhrnsen F**, Wendler NO, Rohwedel J, Schlenke P: Improved proliferation and differentiation capacity of human mesenchymal stem cells expanded on basement-membrane extracellular matrix proteins. *Tissue Engineering*, (eingereicht 2009)

Rotter N, Oder J, Schlenke P, Lindner U, **Böhrnsen F**, Kramer J, Rohwedel J, Huss R, Brandau S, Wollenberg B, Lang S: Isolation and characterization of adult stem cells from human salivary glands. *Stem Cells Dev* 3, 509-518 (2008)

Kramer J, **Böhrnsen F**, Lindner U, Behrens P, Schlenke P, Rohwedel J: In vivo matrix-guided human mesenchymal stem cells. *Cell Mol Life Sci* 5, 616-626 (2006)

Kramer J, **Böhrnsen F**, Schlenke P, Rohwedel J: Stem cell-derived chondrocytes for regenerative medicine. *Transplant Proc* 3, 762-765 (2006)

#### **Wissenschaftliche Zusammenfassungen:**

---

Kramer J, **Böhrnsen F**, Rohwedel J: Stem cell-derived chondrocytes for regenerative medicine. *Transplantmedizin supp.* 57, (2005).

Lindner U, Driller B, Behrens P, **Böhrnsen F**, Kramer J, Rohwedel J, Kirchner H, Schlenke P: Optimized Proliferation and Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells Cultured Upon Extracellular Matrix Proteins. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 33, 25 (2006)

Lindner U, Driller B, Behrens P, **Böhrnsen F**, Kramer J, Rohwedel J, Kirchner H, Schlenke P: Influences of Extracellular Matrix Proteins on Proliferation and Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Experimental Hematology* 34, 78 (2006)

**Poster:**

**Böhrnsen F**, Lindner U, Meier M, Lehnert H, Rohwedel J, Kramer J: A cell saving screening test for stem/ progenitor cell differentiation. 135. Jahrestagung der DGIM Wiesbaden (2009)

**Böhrnsen F**, Gadallah A, Lindner U, Schlenke P, Rotter N, Meier M, Rohwedel J, Kramer J: Einfluss einer 3D-Kultur auf die Differenzierung adulter Stammzellen. Doktorandentag 2008 der Universität zu Lübeck (2008)

**Böhrnsen F**, Gadallah A, Lindner U, Schlenke P, Rotter N, Meier M, Rohwedel J, Kramer J: Influence of standardized 3D-cell culture on multilineage differentiation of human adipose tissue derived stem cells. 2<sup>nd</sup> Congress of the German society for Stem Cell Research, 04.10. - 07.10. Würzburg (2007)

**Böhrnsen F**, Kramer J, Lindner U, Schlenke P, Rotter N, Rohwedel J: Adipose tissue derived stem cells - Comparison of mouse and human sources. 1<sup>st</sup> Congress of the German society for Stem Cell Research, 03.11. - 04.11. Köln (2006)

**Böhrnsen F**, Kramer J, Schlenke P, Rotter N, Rohwedel J: Murine tissue-derived stromal cells show progenitor cell plasticity. 3<sup>rd</sup> International Meeting of the Stem Cell Network NRW, 15.05. - 16.05. Münster (2006)

Kramer J, **Böhrnsen F**, Lindner U, Meier M, Schlenke P, Rohwedel J: Comparison of stem/progenitor cells from different murine tissues. ISEH - Society for Hematology and Stem Cells 36<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting, 28.09. - 30.09. Hamburg (2007)

Kramer J, **Böhrnsen F**, Lindner U, Behrens P, Schlenke P, Rohwedel J: In vivo matrix-guided human mesenchymal stem cells. Elsa-Braendstroem Conference Center, 13.05. - 17.05. Hamburg (2007)

Kramer J, **Böhrnsen F**, Lindner U, Behrens P, Schlenke P, Rohwedel J: In vivo matrix-guided human mesenchymal stem cells. 1<sup>st</sup> Congress of the German society for Stem Cell Research, 03.11. - 04.11. Köln (2006)

Lindner U, Driller B, Behrens P, **Böhrnsen F**, Kramer J, Rohwedel J, Kirchner H, Schlenke P: Influences of Extracellular Matrix Proteins on Proliferation and Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. 35<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting of the International Society for Experimental Hematology, 27.09. - 30.09. Minneapolis USA (2006)

Lindner U, Driller B, Behrens P, **Böhrnsen F**, Kramer J, Rohwedel J, Kirchner H, Schlenke P: Optimized Proliferation and Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells Cultured Upon Extracellular Matrix Proteins. 39<sup>th</sup> Annual Congress of the German Society for Transfusion Medicine and Immunhematology, 19.09. - 22.09. Frankfurt am Main (2006)

Lindner U, Driller B, Behnke B, Behrens P, **Böhrnsen F**, Kramer J, Rohwedel J, Kirchner H, Schlenke P: Proliferation and Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells Seeded on Extracellular Matrix Proteins. 1<sup>st</sup> Congress of the German society for Stem Cell Research, 03.11. - 04.11. Köln (2006)

**Vorträge:**

---

**Böhrnsen F:** Grundlagen der Isolation und Charakterisierung mesenchymaler Stammzellen. Nephrologisches Doktorandenseminar UK-SH Campus Lübeck, 09.01. (2008)

**Böhrnsen F:** Stammzellen in der Regenerativen Medizin. Klinik für Kiefer- und Gesichtschirurgie UK-SH Campus Lübeck, 30.10. (2007)

**Böhrnsen F:** Isolierung, Charakterisierung und Differenzierung adulter Stammzellen unterschiedlicher Gewebetypen. Institut für Medizinische Molekularbiologie Universität zu Lübeck, 15.08. (2006)

## 7.2. Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Hendrik Lehnert, Herrn Prof. Dr. Peter Karl Müller, Herrn Prof. Dr. Norbert Tautz, Herrn Prof. Dr. Jürgen Rohwedel und Privat-Dozent Dr. Jan Kramer für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die interessante Themenstellung und die gute Einarbeitung in zell- und molekularbiologische Arbeitstechniken bedanken. Mein besonderer Dank gilt Ihnen aber vor allem für Ihre ständige Gesprächsbereitschaft.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Mitarbeitern der „Interdisziplinären Arbeitsgruppe Stammzellbiologie der Medizinischen Klinik I und des Instituts für Medizinische Molekularbiologie“, bei Barbara Andresen, Alexandra Eirich und Marius Dose für die nette und persönliche Arbeitsatmosphäre.

Ebenfalls danken möchte ich allen Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Molekularbiologie der Universität zu Lübeck für das freundliche Arbeitsklima und für Ihre Hilfsbereitschaft.

Mein ganz persönlicher Dank gilt meinen Eltern und Privat-Dozent Dr. Jan Kramer für die Unterstützung und Everlin Piccinini für die Kraft und den Rückhalt aus Nah und Fern.

### 7.3. Curriculum Vitae

|             |                                       |  |         |
|-------------|---------------------------------------|--|---------|
| Name:       | Böhrnsen                              | Staatsangehörigkeit:   | Deutsch |
| Vorname:    | Björn Florian                         |  |         |
| Geburtstag: | 23. September 1979                    |  |         |
| Geburtsort: | Hamburg                               |  |         |
| Anschrift:  | Friedländer Weg 73<br>37085 Göttingen |  |         |
| E-Mail:     | b.f.boehrsen@gmail.com                |  |         |

### Hochschulausbildung

|                    |   |
|--------------------|---|
| 2001 - 2008:       | Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck |
| Oktober 2003:      | 1. Staatsprüfung (Note: 1,66)                         |
| Mai 2008:          | 2. Staatsprüfung (Note: 1,5)                          |
| Seit Oktober 2008: | Studium der Zahnmedizin an der Universität Göttingen  |

### Praktisches Jahr

|                |  |
|----------------|--|
| Februar 2007   | Intensivmedizin<br>UK-SH Campus Lübeck<br>(PD Dr. Perras; Direktor: Prof. Dr. Lehnert)                               |
| April 2007     | Transplantationszentrum und Nephrologie<br>UK-SH Campus Lübeck<br>(Prof. Dr. Steinhoff; Direktor: Prof. Dr. Lehnert) |
| Juni 2007      | Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie<br>Universität Basel, Schweiz<br>(Direktor: Prof. Dr. Dr. Zeilhofer) |
| August 2007    | Klinik für Visceral- und Gefäßchirurgie<br>Universität Basel, Schweiz<br>(Direktor: Prof. Dr. Oertli)                |
| September 2007 | Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie<br>Universität Basel, Schweiz<br>(Direktor: Prof. Dr. Eckstein)                 |
| Oktober 2007   | Klinik für Kiefer- und Gesichtschirurgie<br>UK-SH Campus Lübeck<br>(Direktor: Prof. Dr. Dr. Sieg)                    |

### **Berufliche Weiterbildung**

---

|                  |   |
|------------------|---|
| Juli – Okt. 2008 | Medical Fellowship<br>Bloco Cirúrgico, Hospital Geral,<br>Universidade de Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brasilien |
|                  | Oral-, Gesichts- und Halschirurgie<br>(Dr. Bertotto, Dr. Lucas)   |
|                  | Kinderchirurgie<br>(Direktor: Prof. Dr. Freitas)  |

### **Auszeichnungen und Forschungsaktivitäten**

---

|                              |   |
|------------------------------|---|
| Seit 1998:                   | Selected member of the “Rhode Island Honor Society” for outstanding scholarship, service and leadership   |
| 1999:                        | Förderpreis des GKSS-Forschungszentrums für herausragende Leistungen auf naturwissenschaftlichem Gebiet   |
| 1999:                        | Awarded extremely well qualified for English language proficiency “Advanced Placement Int. English Language” (APIEL) (The College Board, New York, NJ)  |
| Seit 2003                    | Mitglied und Stipendiat der „Studienstiftung des Deutschen Volkes“  |
| Seit 2005                    | Doktorand der „Interdisziplinären AG Stammzellbiologie der Medizinischen Klinik I (PD Dr. Kramer, Direktor: Prof. Dr. Lehnert) und des Instituts für Medizinische Molekularbiologie (Prof. Dr. Rohwedel, Direktor: Prof. Dr. Tautz)“, Universität zu Lübeck |
| Januar 2005 bis Januar 2007: | Praktischer Teil der Promotion  |
| Februar 2007 bis Juni 2008:  | Praktisches Jahr und Abschlussexamen des Studiums der Humanmedizin  |
| Juli 2008 bis März 2009      | Schriftlicher Teil der Promotion  |

### **Mitgliedschaften in Fachgesellschaften und Gremien**

---

|           |   |
|-----------|---|
| Seit 2007 | Mitglied der „Deutschen Gesellschaft für Stammzellforschung“  |
| Seit 2009 | Mitglied der med. Studienkommission der Universität Göttingen |

### **Schulbildung**

---

|              |                                  |                       |
|--------------|----------------------------------|-----------------------|
| 1986 – 1990: | Oberstadtgrundschule, Geesthacht |                       |
| 1990 – 1997: | Otto-Hahn Gymnasium, Geesthacht  |                       |
| 1997 – 1998: | Barrington High School, RI, USA  | Diplom: GPA 4.09, 96% |
| 1998 – 2000: | Otto-Hahn Gymnasium, Geesthacht: | Abitur: Note: 1,3     |

### **Zivildienst**

---

|              |  |
|--------------|--|
| 2000 – 2001: | Sonderpädagogische Einrichtungen „Adelby“, Flensburg |
|--------------|--|