

Mesenchymale Stammzellen: Analyse der  
Auswirkungen des Einsatzes von humanem Serum  
in der Langzeitkultur sowie des  
Entwicklungspotentials im Blastozystenmodell



**Dissertation zur Erlangung  
des naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayrischen Julius-Maximilians-Universität  
Würzburg**

vorgelegt von  
**Nikos Alexander Brousos**  
geboren in Karlsruhe

Würzburg 2011

Eingereicht am: .....

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Wolfgang Rössler

Gutachter: Prof. Dr. Albrecht Müller

Gutachter: Prof. Dr. Ricardo Benavente.

Tag des Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

# Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| <b>ZUSAMMENFASSUNG</b>   | <b>7</b>  |
| <b>SUMMARY</b>   | <b>9</b>  |
| <b>ABKÜRZUNGEN</b>   | <b>11</b> |
| <b>1. EINLEITUNG</b>   | <b>13</b> |
| <b>1.1. STAMMZELLEN</b>  | <b>13</b> |
| 1.1.1. DAS ENTWICKLUNGSPOTENTIAL VON STAMMZELLEN   | 13        |
| 1.1.2. DIE BLASTOZYSTENINJEKTION ALS MODELLSYSTEM ZUR ANALYSE DES ENTWICKLUNGS-POTENTIALS<br>VON STAMMZELLEN                 | 16        |
| <b>1.2. MESENCHYMALE STAMMZELLEN</b>   | <b>18</b> |
| 1.2.1. DEFINITION UND CHARAKTERISIERUNG VON MSCs   | 19        |
| 1.2.2. STAMMZELLNISCHE UND IN VIVO FUNKTION VON MSCs   | 20        |
| 1.2.3. DAS ENTWICKLUNGSPOTENTIAL VON MSCs  | 21        |
| 1.2.4. POTENTIELLE ANWENDUNGEN FÜR MSCs IN DER REGENERATIVEN MEDIZIN   | 23        |
| 1.2.5. IN VITRO EXPANSION VON MSCs   | 25        |
| 1.2.6. ZELLULÄRE SENESZENZ   | 28        |
| <b>1.3. ZIELSETZUNG DER ARBEIT</b>   | <b>30</b> |
| <b>2. ERGEBNISSE</b>   | <b>31</b> |
| <b>2.1. MORPHOLOGIE UND MULTI-LINIEN-DIFFERENZIERUNGSPOTENTIAL VON HUMANEN MSCs AUS BM,<br/>  CB UND AT <i>IN VITRO</i></b>  | <b>31</b> |
| 2.1.1. IN VITRO PHÄNOTYP HUMANER MSCs  | 31        |
| 2.1.2. DAS IN VITRO MULTI-LINIEN-DIFFERENZIERUNGSPOTENTIAL HUMANER MSCs  | 33        |
| <b>2.2. AUSWIRKUNGEN LÄNGERER <i>IN VITRO</i> KULTUR AUF AT-MSCs IN HS- ODER FCS-<br/>  SUPPLEMENTIERTEM WACHSTUMSMEDIUM</b> | <b>34</b> |
| 2.2.1. WACHSTUMSKINETIK DER AT-MSCs WÄHREND DER LANGZEITKULTUR IN HS- ODER FCS-<br>SUPPLEMENTIERTEM MEDIUM                   | 35        |
| 2.2.2. MORPHOLOGIE UND ZELLGRÖÖSE WÄHREND DER LANGZEITKULTIVIERUNG VON AT-MSCs   | 38        |
| 2.2.3. DAS ADIPOGENE DIFFERENZIERUNGSPOTENTIAL IN VITRO GEALTERTER AT-MSCs   | 40        |
| 2.2.4. BRDU-INKORPORATION DER AT-MSCs NACH KURZER, MITTLERER UND LANGER KULTUR IN MEDIUM<br>MIT HS- BZW. FCS-SUPPLEMENT      | 42        |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.2.5. PROTEINEXPRESSION DES PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN IN KURZ- UND LANGZEITKULTIVIERTEN AT-MSCS                | 45        |
| 2.2.6. ZELLYKLUSVERTEILUNG WÄHREND DER LANGZEITKULTUR MIT HS- ODER FCS-SUPPLEMENT  | 46        |
| 2.2.7. TELOMERLÄNGE IN KURZ-, MITTEL- UND LANGZEITKULTIVIERTEN AT-MSCS   | 50        |
| <b>2.3. BESIEDLUNG MURINER E16.5 EMBRYONEN NACH MIKROINJEKTION VON MSCs AUS BM, AT UND CB IN MURINE BLASTOZYSTEN</b>     | <b>54</b> |
| 2.3.1. DONORKONTRIBUTION IN E16.5 EMBRYONEN NACH INJEKTION VON BM-MSCs   | 55        |
| 2.3.2. DONORKONTRIBUTION IN E16.5 EMBRYONEN NACH INJEKTION VON CD271-POSITIVEN KNOCHENMARKSZELLEN                        | 56        |
| 2.3.3. DONORKONTRIBUTION IN E16.5 EMBRYONEN NACH INJEKTION VON CB-MSCs   | 58        |
| 2.3.4. HUMANE DONORANTEILE IN E16.5 EMBRYONEN NACH INJEKTION VON AT-MSCs   | 59        |
| 2.3.5. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE DER PCR-ANALYSE  | 61        |
| 2.3.6. ANALYSE DER GEWEBE MIT HUMANEN DONORANTEILEN DURCH HUMANSPEZIFISCHE FLUORESCENZ IN SITU HYBRIDISIERUNG            | 64        |
| <b>3. DISKUSSION</b>   | <b>67</b> |
| <b>3.1. DAS ENTWICKLUNGSPOTENTIAL HUMANER MSCs AUS BM, AT UND CB</b>   | <b>67</b> |
| 3.1.1. DIE BLASTOZYSTENINJEKTION ALS MODELLSYTEM ZUR ANALYSE DES ENTWICKLUNGSPOTENTIALS VON MSCs UND ANDEREN STAMMZELLEN | 67        |
| 3.1.2. DAS ENTWICKLUNGSPOTENTIAL VON MSCs AUS BM, AT UND CB  | 69        |
| 3.1.3. DIE VERTEILUNG DER HUMANEN DONORSIGNALE NACH MIKROINJEKTION VON HUMANEN MSCs IN MURINE BLASTOZYSTEN               | 71        |
| <b>3.2. AUSWIRKUNGEN VON HS UND FCS AUF AT-MSCs</b>  | <b>72</b> |
| 3.2.1. PROLIFERATION DER AT-MSCs IN HS-SUPPLEMENT  | 72        |
| 3.2.2. DAS ADIPOGENE DIFFERENZIERUNGSPOTENTIAL VON AT-MSCs IN HS- UND FCS-KULTUR   | 73        |
| 3.2.3. UNTERSCHIEDE IN GEHALT UND ZUSAMMENSETZUNG VON WACHSTUMSFAKTOREN IN HS UND FCS                                    | 74        |
| <b>3.3. AUSWIRKUNGEN DER LANGZEITKULTUR AUF AT-MSCs</b>  | <b>76</b> |
| 3.3.1. AUSWIRKUNGEN DER LANGZEITKULTUR AUF DIE PROLIFERATION   | 76        |
| 3.3.2. DER VERLUST DES ADIPOGENEN DIFFERENZIERUNGSPOTENTIALS   | 77        |
| 3.3.3. AUSWIRKUNGEN AUF DIE EXPANSIONSFÄHIGKEIT  | 79        |
| 3.3.4. EINFLUSS DER TELOMERVERKÜRZUNG AUF DAS EXPANSIONSPOTENTIAL  | 79        |
| 3.3.5. EINFLUSS DES SERUMS AUF DIE EXPANSIONSFÄHIGKEIT DER AT-MSCs   | 81        |
| <b>3.4. ABWÄGUNG DER SEREN FÜR DIE <i>IN VITRO</i> KULTIVIERUNG VON AT-MSCs</b>  | <b>82</b> |
| <b>4. MATERIAL UND METHODEN</b>  | <b>84</b> |
| <b>4.1. MATERIAL</b>   | <b>84</b> |

|             |  |            |
|-------------|--|------------|
| 4.1.1.      | MÄUSE  | 84         |
| 4.1.2.      | HUMANE MSCs  | 84         |
| <b>4.2.</b> | <b>ZELLKULTUR UND DIFFERENZIERUNGSMEDIEN</b>                                 | <b>85</b>  |
| 4.2.1.      | ANTIKÖRPER   | 86         |
| <b>4.3.</b> | <b>CHEMIKALIEN</b>   | <b>87</b>  |
| 4.3.1.      | PUFFER UND LÖSUNGEN  | 87         |
| 4.3.2.      | CHEMIKALIEN  | 87         |
| 4.3.3.      | ENZYME, KITS UND REAGENZIEN  | 89         |
| 4.3.4.      | NUKLEOTIDE UND NUKLEOTIDANALOGONE  | 89         |
| 4.3.5.      | VERBRAUCHSMATERIALIEN  | 91         |
| 4.3.6.      | INSTRUMENTE  | 92         |
| 4.3.7.      | VERWENDETE SOFTWARE:   | 92         |
| <b>5.</b>   | <b>METHODEN</b>  | <b>93</b>  |
| <b>5.1.</b> | <b>ISOLATION VON HUMANEN MSCs</b>  | <b>93</b>  |
| 5.1.1.      | MSC-KULTUR   | 94         |
| 5.1.2.      | TRYPSINISIERUNG  | 94         |
| 5.1.3.      | BESTIMMUNG DER LEBENDZELLZAHL IN DER NEUBAUER-ZÄHLKAMMER                     | 95         |
| 5.1.4.      | BESTIMMUNG DER KUMULATIVEN POPULATIONSVERDOPPLUNGSRATE                       | 95         |
| 5.1.5.      | EINFRIEREN VON MSCs  | 96         |
| 5.1.6.      | AUFTAUEN VON MSCs  | 96         |
| 5.1.7.      | BROMDESOXYURIDIN (BrdU) EINBAU   | 96         |
| 5.1.8.      | IN VITRO DIFFERENZIERUNG   | 97         |
| <b>5.2.</b> | <b>HISTOLOGISCHE FÄRBUNGEN</b>   | <b>98</b>  |
| 5.2.1.      | ÖL-ROT-FÄRBUNG   | 98         |
| 5.2.2.      | NACHWEIS AKALISCHER PHOSPHATASE (AP)   | 99         |
| 5.2.3.      | SAFRANIN FÄRBUNG   | 99         |
| <b>5.3.</b> | <b>INJEKTION VON HUMANEN MSC UND REIMPLANTATION IN AMMENTIERE</b>            | <b>99</b>  |
| <b>5.4.</b> | <b>IMMUNOHISTOCHEMIE</b>   | <b>100</b> |
| 5.4.1.      | VORBEREITUNG DER PROBEN  | 100        |
| 5.4.2.      | KOMBINIERTER FISH/IMMUNFÄRBUNG   | 101        |
| <b>5.5.</b> | <b>DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSEN</b>                                      | <b>102</b> |
| 5.5.1.      | ETHANOLFIXIERUNG   | 102        |
| 5.5.2.      | ANALYSE DES DNA GEHALTS (ZELLZYKLUSANALYSE)                                  | 102        |
| 5.5.3.      | IMMUNFÄRBUNG ZUM NACHWEIS VON ZELLEN MIT EINGEBAUTEM BROMDESOXYURIDIN (BrdU) | 103        |
| 5.5.4.      | ISOLATION VON RINDERTHYMUSZELLEN   | 104        |

|             |   |            |
|-------------|---|------------|
| 5.5.5.      | TELOMERLÄNGENBESTIMMUNG MITTELS NUCLEAR FLOW FISH               | 104        |
| <b>5.6.</b> | <b>MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN</b>                            | <b>105</b> |
| 5.6.1.      | ISOLIERUNG GENOMISCHER DNA AUS GEWEBEPROBEN                     | 105        |
| 5.6.2.      | QPCR ZUR ANALYSE DES DONORCHIMÄRISMUS                           | 105        |
| 5.6.3.      | QUANTIFIZIERUNG DER DONORSIGNALE MITTELS DELTA-DELTA CT-METHODE | 108        |
| 5.6.4.      | WESTERN BLOT  | 109        |
| <b>6.</b>   | <b>LITERATURVERZEICHNIS</b>                                     | <b>110</b> |
| <b>7.</b>   | <b>DANKSAGUNG</b>   | <b>125</b> |
| <b>8.</b>   | <b>PUBLIKATIONEN</b>  | <b>127</b> |
| <b>9.</b>   | <b>ERKLÄRUNG</b>  | <b>128</b> |

## Zusammenfassung

Mesenchymale Stammzellen (MSCs) sind multipotente adulte Stammzellen. Sie können aus einer Vielzahl verschiedener Gewebe isoliert werden, z.B. aus Knochenmark (BM), Fettgewebe (AT) und Nabelschnurblut (CB). Besondere Bedeutung haben MSCs als mögliche Zellquelle für neuartige klinische Stammzelltherapien, da sie relativ einfach aus adulten Patienten isoliert und *in vitro* expandiert werden können. Grundlage für die erforschten Therapieansätze ist häufig das Entwicklungspotential der MSCs. Es umfasst mesenchymale Zelltypen wie Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten, aber auch nicht-mesenchymale Zelltypen wie z.B. Hepatozyten oder Nervenzellen. Das Entwicklungspotential von MSCs zu nicht-mesenchymalen Zelltypen ist jedoch umstritten und viele Differenzierungswege sind bisher nur *in vitro* gezeigt. Außerdem ist unklar, ob MSCs aus verschiedenen Ursprungsgeweben dasselbe Entwicklungspotential besitzen.

Ein Ziel dieser Arbeit war deshalb das *in vivo* Differenzierungspotential von CB-, AT- und BM-MSCs vergleichend zu untersuchen. Dazu wurden die MSCs in murine Tag-3-Blastozysten injiziert. Diese wurden dann in Foster-Mäuse transferiert und die daraus entstandenen Embryonen am Tag 16 der Embryonalentwicklung (E16.5) analysiert. Dazu wurde gDNA aus verschiedenen embryonalen Geweben isoliert und mittels humanspezifischer quantitativer real-time PCR (qPCR) die Verteilung sowie das Ausmaß der humanen Donorkontribution bestimmt. Außerdem sollte der Differenzierungsstatus der humanen Zellen mittels *in situ* Hybridisierung und Antikörperfärbung analysiert werden.

Nach der Injektion von MSCs aller drei Ursprungsgewebe sowie von CD271-positiven Knochenmarkszellen konnten Donorsignale in den Geweben der E16.5 Embryonen nachgewiesen werden. Der Donorchimärismus war relativ niedrig und lag meist zwischen 0,02 und 0,2 %. Die Häufigkeit, mit der donorpositive Embryonen erzeugt wurden, war nach Injektion von CD 271-positiven Knochenmarkszellen am niedrigsten. Insgesamt waren die Donorsignale breit verteilt und kein Organ wurde ausschließlich von Nachfahren der MSCs eines bestimmten Ursprungsgewebes besiedelt. Die Quantifizierung der Donorsignale durch qPCR weist jedoch daraufhin, dass die injizierten Zellen proliferiert haben. Es gelang allerdings mit der in dieser Arbeit durchgeführten *in situ* Hybridisierung nicht, die Donorzellen direkt in den Geweben nachzuweisen. Somit

konnte das Entwicklungspotential der MSCs nicht gezeigt werden. Aufgrund der Tatsache, dass jedoch Donorsignale mit PCR gefunden wurden, scheint die Injektion in murine Blastozysten aber eine geeignete Methode zu sein das Entwicklungspotential von humanen MSCs zu untersuchen.

MSCs kommen in ihren Ursprungsgeweben nur in geringer Frequenz vor. Daher ist es sowohl in der Grundlagenforschung als auch bei möglichen klinischen Anwendungen notwendig MSCs *in vitro* zu vermehren. Für die Expansion von MSCs wurden bisher in der Regel Kulturmedien eingesetzt, die mit fötalem Kälberserum (FCS) supplementiert sind. Insbesondere im Hinblick auf potentielle klinische Anwendungen ist diese Art der Kultivierung jedoch nicht zu empfehlen, da dies zur Übertragung von xenogenem Material in den Patienten führen könnte. Eine mögliche Alternative ist die Verwendung von humanen Supplementen für die Expansion von MSCs. Grundsätzlich lassen sich MSCs gut in Kultur vermehren. Ihr Expansionsvermögen ist allerdings begrenzt. Während der *in vitro* Kultur kommt es bei MSCs zu einem Verlust der Telomerenden. Dies führt zur Ausbildung von Seneszenz. Studien haben jedoch gezeigt, dass Seneszenz auch durch äußere Faktoren, wie z.B. die Bedingungen, unter denen die *in vitro* Kultur stattfindet, beeinflusst wird.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war daher die Eignung eines allogenen humanen Serums (HS) für die Langzeitkultur von AT-MSCs zu prüfen. Dazu wurden AT-MSCs mit HS und einem kommerziellen FCS-Supplement parallel kultiviert und das Expansionsvermögen sowie das Auftreten seneszenztypischer Veränderungen während der Langzeitkultur analysiert. Hierbei zeigte sich, dass AT-MSCs unter beiden Kulturbedingungen seneszent werden und ein Verlust der Telomerenden stattfindet. Es zeigten sich jedoch deutliche Vorteile der HS-Kultur gegenüber der Kultur mit FCS-Supplement, da HS eine schnellere Proliferation der AT-MSCs auslöste und daneben auch insgesamt ein höheres Expansionspotential ermöglichte. Die Daten legen also HS als gute Alternative zu FCS für die Expansion von AT-MSCs nahe.



## Summary

Mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent adult stem cells. They can be isolated from a multitude of tissues including bone marrow (BM), adipose tissue (AT) and cord blood (CB). MSCs gained special importance as potential cell source for novel stem cell-based therapies, because their isolation is relatively easy from patients and they can be expanded *in vitro*. Current attempts to use MSCs as therapeutic are based on their developmental potential, which includes mesenchymal cell types, for example adipocytes, chondrocytes and osteoblasts as well as the non-mesenchymal cell types like hepatocytes and neural cell types. The developmental potential of MSCs towards non-mesenchymal cell types is controversial and so far often only showed *in vitro*. Further, it is not clear whether MSCs from different tissue origins have the same developmental potential.

Hence the aim of this thesis was to evaluate and compare the *in vivo* differentiation potential of human MSCs from CB, BM and AT. Therefore MSCs were injected in murine embryonic day 3.5 blastocysts. Then the blastocysts were transferred into foster mice and the developing E 16.5 embryos were analyzed. For this analysis gDNA from a variety of embryonic tissues was isolated. Distribution and degree of human donor contribution was determined by quantification of the human gDNA sequences in the samples with human specific quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR). In addition it was planned to analyze the differentiation status of the human cells by immunohistochemistry and *in situ* hybridization.

Progeny of injected CD271+ BM cells, BM-MSCs, CB-MSCs and AT-MSCs were detected by human specific realtime PCR. Positive tissues showed low-level donor cell engraftment, generally between 0.02 and 0.2% of the cells. Further CD271+ BM cells were observed to generate less frequent engraftment compared to hMSCs derived from CB, BM or AT. Hence, the donor signals were widely distributed and none of the tissues was populated by the progeny of only one type of cells. The quantification of donor signals by qPCR indicated that the injected cells underwent proliferation. However, the developmental potential of MSCs could not be shown directly, because the cells were not identified in tissue sections with the *in situ* hybridization. Nevertheless, based on the

fact that donor signals could be found by human specific qPCR, it could be concluded that blastocyst injection is an appropriate method to analyze the developmental potential of human MSCs.

In their tissue of origin MSCs are found only at low frequency. Thus, for both fundamental research and potential clinical application, it is necessary to expand the cells *in vitro*. Up to now, MSCs are generally expanded in media supplemented with fetal calf serum (FCS). With respect to the potential use of MSCs in therapeutics, this kind of expansion is not recommended, because it could lead to transfer of animal derived material into the patient. An alternative is to use human supplements for MSC expansion.

In principal, MSCs can easily be expanded in cell culture but the expansion potential of MSCs is limited. During *in vitro* expansion MSCs suffer from a constant loss of telomere ends, as a consequence MSCs become senescent. Studies revealed that the senescence phenotype could also be influenced by external factors like culture conditions.

Hence, another aim of this study was to evaluate the suitability of allogenic human serum (HS) for the long-term culture of AT-MSCs. For this purpose AT-MSCs were expanded either in FCS or HS supplemented media and the expansion potential as well as the senescence-associated changes during the long-term culture were analyzed. The data revealed that under both culture conditions AT-MSCs became senescent and suffered from telomere attrition. However, the results also revealed advantages of HS compared to FCS, as HS elicits a faster proliferation along with an overall higher expansion potential. Thus, the data indicate that HS is a good alternative to FCS for AT-MSC expansion and can possibly replace FCS for the AT-MSC culture.

---

## Abkürzungen

|       |   |
|-------|---|
| AML   | akute myeloische Leukämie   |
| AT    | adipose tissue (engl.), Fettgewebe  |
| BSA   | Bovines Serumalbumin  |
| BM    | bone marrow (engl.), Knochenmark  |
| BrdU  | Bromdesoxyuridin  |
| CB    | cord blood (engl.), Nabelschnurblut   |
| CD    | cluster of differentiation (engl.),   |
| CFU-F | colony forming unit fibroblast(engl.), koloniebildende fibroblastoide Einheit |
| CPD   | cumulative population doublings (engl.), kumulative Populationsverdopplungen  |
| DAPI  | 4',6-Diamidin-2-phenylindol   |
| DMSO  | Dimethylsulfoxid  |
| DMEM  | Dulbecco's modified Eagle's medium  |
| EDTA  | Ethylendiamintetraessigsäure  |
| ESCs  | Embryonic stem cells (engl.), embryonale Stammzellen                          |
| EGF   | epidermal growth factor (engl.), epidermaler Wachstumsfaktor                  |
| FCS   | fetal calf serum (engl.), fötales Kälberserum                                 |
| FGF   | fibroblast growth factor (engl.), fibroblasten Wachstumsfaktor                |
| FisH  | fluoreszenz in situ Hybridisierung  |
| FITC  | Fluoresceinisothiocyanat  |
| GMP   | Good Manufacturing Practice (engl.), Gute Herstellungspraxis                  |
| GvHD  | Graft versus Host disease (engl.), Transplant gegen Empfänger Krankheit       |
| gDNA  | genomic deoxyribonucleic acid (engl.), genomische Desoxyribonukleinsäure      |
| hCG   | humanes Choriogonadotropin  |
| HLA   | humanes Leukozyten Antigen  |
| HRP   | horseradish peroxidase (engl.), Merrettichperoxidase                          |

|          |   |
|----------|---|
| HS       | allogenes humanes Serum   |
| HSCs     | hematopoetic stem cells (engl.), Hämatopoetische Stammzellen  |
| hIDPSCs  | hu immature dental pulp stem cells (engl.),   |
| ICM      | inner cell mass (engl.), innere Zellmasse   |
| IPScells | Induziert pluripotente Stammzelle   |
| MAPCs    | multipotent adult progenitor cells (engl.),   |
| MSCs     | mesenchymal stem cells (engl.), mesenchymale Stammzellen  |
| MSCs     | mesenchymal stromal cells (engl.), mesenchymale Stromazellen  |
| OI       | Osteogenesis imperfecta   |
| PBS      | phosphat buffered saline (engl.), phosphat gepufferte Saline  |
| PCNA     | Proliferating Cell Nuclear Antigen  |
| PD       | population doublings (engl.), Populationsverdopplung  |
| PDGF     | platelet-derived growth factor (engl.), Blutplättchen Wachstumsfaktor                                     |
| PFA      | Paraformaldehyd   |
| PI       | Propidium Iodide (engl.), Propidiumjodid  |
| PMSG     | Pregnant mare serum gonadotropin (engl.), Stutenserumgonadotropin   |
| PNA      | peptide nucleic acid (engl.), Peptid-Nukleinsäure q   |
| qPCR     | quantitative real-time polymerase chain reaction (engl), quantitativer Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion |
| RNA      | ribonucleic acid (engl.), Ribonukleinsäure  |
| TGF      | transforming growth factor (engl.), Transformierender Wachstumsfaktor                                     |

# 1. Einleitung

Stammzellen besitzen einzigartige Eigenschaften, die sie als potentielles Therapeutikum in der regenerativen Medizin wertvoll machen. Ihre Rolle bei der Ontogenese des werdenden, aber auch ihre Funktion bei der Homöostase und der Reparatur verletzten Gewebes im adulten Organismus weckt die Hoffnung, Stammzellen für die Gewebsregeneration im Patienten einsetzen zu können. Zukünftig soll durch den Einsatz von Stammzellen ein Teil der Organtransplantationen überflüssig werden und damit auch die Anzahl der erforderlichen Spenderorgane deutlich reduziert werden. Einige Stammzelltherapien sind heute schon klinischer Alltag, andere werden derzeit intensiv erforscht.

## 1.1. Stammzellen

Eine Stammzelle ist definiert als eine undifferenzierte Zelle, die die Fähigkeit besitzt sich selbst zu erneuern und differenzierte funktionelle Nachfahren zu bilden (Potten & Loeffler, 1990; Lakshmipathy & Verfaillie, 2005). Klassifiziert werden sie nach ihrer Ursprungsspezies, dem Gewebe, aus dem sie stammen und aufgrund ihres Entwicklungspotentials. Gewebe, die Stammzellpopulationen beherbergen, finden sich sowohl im Embryo als auch im adulten Organismus.

### *1.1.1. Das Entwicklungspotential von Stammzellen*

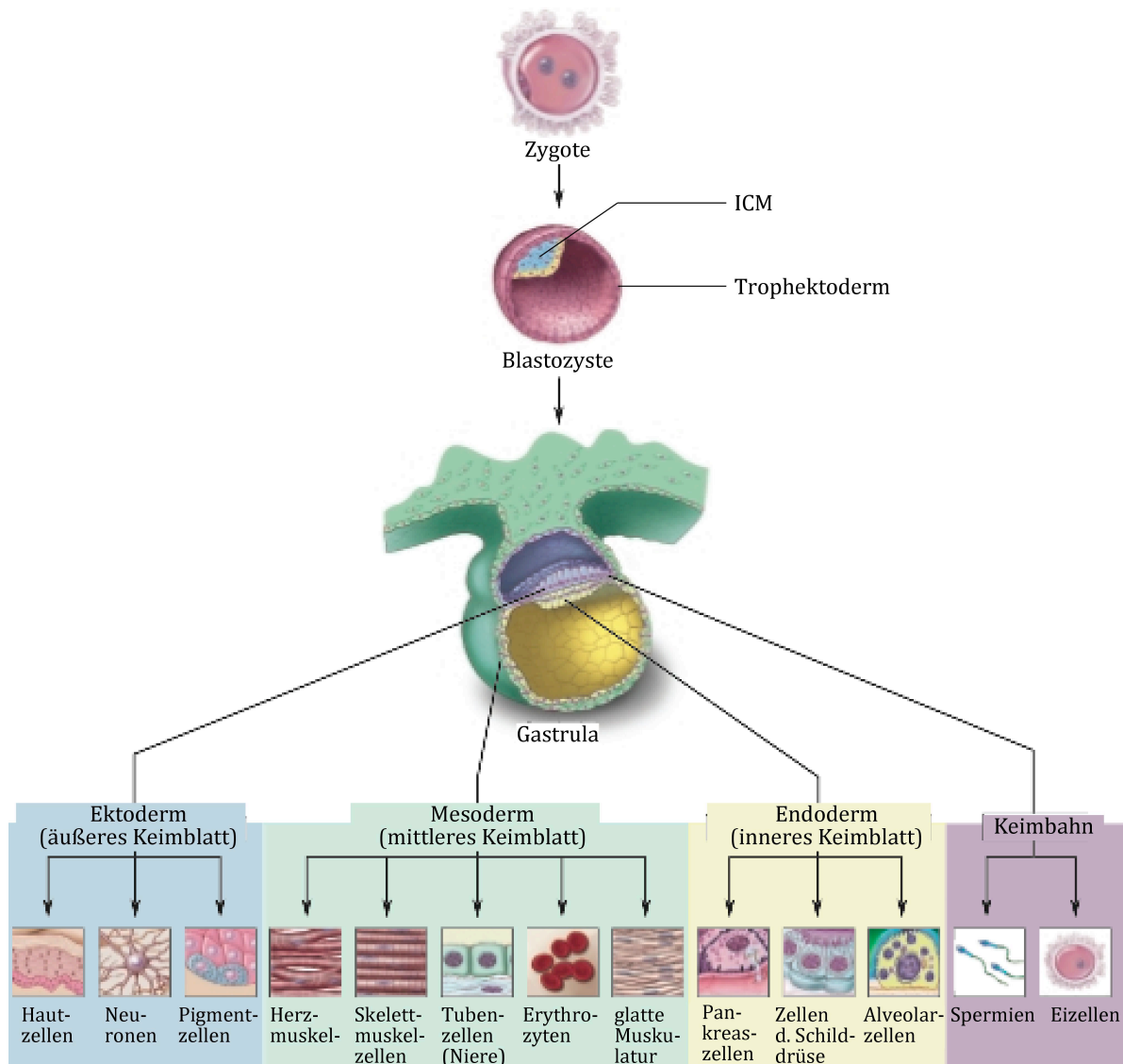
Während der Embryonalentwicklung kommt es zur zunehmenden Spezialisierung der Zelltypen des Embryos und das Schicksal der Zellen ist zunehmend determiniert. So entsteht ausgehend von einer einzelnen, durch die Verschmelzung von Eizelle und Spermium entstandenen Zygote ein Organismus, der aus ca. 200 verschiedenen Zelltypen besteht.

Die Zygote, die am Anfang der Embryonalentwicklung steht, ist omnipotent, da ihre Nachfahren alle Zelltypen des entstehenden Organismus, aber auch alle extraembryo-

nalen Gewebe bilden. Sie weist somit das höchste Entwicklungspotential auf. Die Zellen der inneren Zellmasse (*inner cell mass*, ICM) der Blastozyste zeigen bereits erste Einschränkungen im Entwicklungspotential, da sie zwar alle Zelltypen des Organismus, nicht jedoch die extraembryonalen Gewebe wie z.B. Plazenta bilden (Rossant, 2001). ICM-Zellen und embryonale Stammzellen (ESCs), die aus der ICM gewonnen werden, bezeichnet man daher als pluripotent (Evans & Kaufman, 1981; Martin, 1981; Bradley et al., 1984; Beddington & Robertson, 1989). Pluripotente Stammzellen können jedoch nicht nur aus der ICM gewonnen, sondern auch künstlich erzeugt werden. Zu diesen Zellen zählen u.a. induziert pluripotente Zellen (*induced pluripotent stem cells*, IPS-Zellen) (Takahashi & Yamanaka, 2006).

In der weiteren Entwicklung kommt es während der Gastrulation zur Ausbildung der drei Keimblätter Ektoderm, Mesoderm und Endoderm. Die Ausbildung der Keimblätter ist ebenfalls Ausdruck der zunehmenden Spezialisierung der Zellen während der Embryonalentwicklung, da sich die einzelnen Keimblätter zu unterschiedlichen Gewebetypen und Organen entwickeln (Abb. 1). Im weiteren Verlauf der Ontogenese schreiten die Spezialisierung der Zellen und der Verlust des Entwicklungspotentials weiter voran. Mit der Ausbildung der Organe ist ein Großteil der Zellen spezialisiert und in seinem Entwicklungspotential stark beschränkt. Dennoch sind selbst noch im Körper adulter Organismen Zellen mit einem höheren Entwicklungspotential vorhanden. Diese Zellen bezeichnet man als somatische (gr. *soma* = Körper) Stammzellen oder adulte Stammzellen. Diese Stammzellen haben allerdings in der Regel nur noch ein Differenzierungspotential, das es ihnen erlaubt, die Zelltypen des Gewebes zu bilden, in dem sie sich befinden. Es wird angenommen, dass adulte Stammzellen im Körper in bestimmten Mikroumgebungen vorkommen, die als Stammzellnische bezeichnet werden (Schofield, 1978; Jones & Wagers, 2008). Die Stammzellnische ist an der Regulation des Stammzellverhaltens beteiligt und sorgt damit für den Erhalt der Stammzellpopulation sowie für die Regulation der Differenzierung. Beispiele für Stammzellnischen sind das Knochenmark, in dem sich hämatopoetische Stammzellen (HSCs) befinden, die Blutzellen und Zellen des Immunsystems bilden (Adams & Scadden, 2006), die subventrikuläre Zone, in der sich ein Teil der neuralen Stammzellen (NSCs) befindet (Tavazoie et al., 2008) und Darmkrypten, in denen sich Stammzellen des Darms befinden (Barker et al., 2007). Die Funktion adulter Stammzellen besteht jedoch nicht mehr in der Neuausbildung von Organen und Geweben, sondern im Erhalt des

Organismus. Dies erfordert die Fähigkeit Verletzungen zu heilen, sowie Gewebe konstant zu erneuern.



**Abb. 1 Spezialisierung der Zelltypen während der Embryonalentwicklung**

Die durch die Befruchtung entstandene omnipotente Zygote entwickelt sich weiter bis zur Blastozyste. Die Blastozyste besteht aus Zellen des Trophektoderm und den pluripotenten *inner cell mass* (ICM)-Zellen. Aus diesen ICM-Zellen bilden sich während der Gastrulation im Zuge der weiteren Spezialisierung die Zellen der drei Keimblätter Ektoderm, Mesoderm und Endoderm sowie die Zellen der Keimbahn. Gezeigt sind auch Beispiele der weiteren Spezialisierung der ektodermalen, mesodermalen und endodermalen Keimblattzellen während der Ontogenese und die Spezialisierung der Keimbahnzellen in Ei und Spermium. (Adaptiert aus „Stem Cells: Scientific Progress and Future directions“, NIH, 2001, © 2001 Terese Winslow, Caitlin Duckwall)

---

### **1.1.2. Die Blastozysteninjektion als Modellsystem zur Analyse des Entwicklungspotentials von Stammzellen**

Die Mikroinjektion von Stammzellen in murine Blastozysten ist eine Methode, mit der Mäuse mit chimären Geweben erzeugt werden können (Gardner, 1968). Daneben ist sie auch eine Strategie in der Stammzellforschung, um das Entwicklungspotential von Stammzellen, insbesondere von pluripotenten Stammzellen, zu untersuchen, da nur die Injektion pluripotenter Zelltypen, wie ESCs und IPS-Zellen in die Blastozyste zu Embryonen führt, die in allen Geweben einschließlich der Keimbahn chimär sind (Beddington & Robertson, 1989; Okita et al., 2007). Durch die Analyse der zellulären Identität der Donorzellen in den Geweben kann also Pluripotenz festgestellt werden.

Die Blastozysteninjektion kann jedoch auch für die Analyse des Entwicklungspotentials multipotenter adulter Stammzellen verwendet werden. So sind die Nachfahren injizierter muriner NSCs in adulten Mäusen bevorzugt in neuralen, murine HSCs bevorzugt in hämatopoetischen Geweben zu finden (Harder et al., 2002b; Kirchhof et al., 2002). Die Blastozysteninjektion liefert zudem auch Hinweise auf unerwartete Entwicklungspotentiale. So fanden Harder et al. Nachkommen muriner NSCs nach der Blastozysteninjektion in embryonalen hämatopoetischen Geweben und diese trugen zudem hämatopoetische Marker. Sie zeigten also Anzeichen einer Differenzierung hin zu hämatopoetischen Zelltypen (Harder et al., 2004). Andere somatische Stammzellen offenbarten nach der Blastozysteninjektion sogar ein Entwicklungspotential, das dem von ESCs sehr nahe kommt. Die Injektion einzelner muriner multipotenter Vorläuferzellen (*murine multipotent progenitor cells*, mMAPCs) in murine Blastozysten führte zu Donorzellchimärismus in Zelltypen aller drei Keimblätter und eine Differenzierung wurde durch die Analyse gewebstypischer Marker gezeigt (Jiang et al., 2002). Auch die Multipotenz muriner epidermaler Stammzellen wurde durch Blastozysteninjektion gezeigt (Liang & Bickenbach, 2002).

Das Entwicklungspotential humaner Stammzellen kann ebenso durch die Mikroinjektion in murine Blastozysten untersucht werden, da verschiedene Studien gezeigt haben, dass eine Biokompatibilität zwischen der murinen Wirtsumgebung und den humanen Zellen besteht. Allerdings ist diese Biokompatibilität limitiert, da humane Donoranteile die Entwicklung der murinen Embryonen auch behindern können. So war zwar nach der Injektion von humanen ESCs eine gute Integration in die frühe



Embryonalentwicklung der Maus festgestellt worden, nach dem Transfer der injizierten Blastozysten zeigten Embryonen mit humanem Donoranteil aber häufig eine abnorme Morphologie, während Embryonen mit normaler Morphologie keinen oder nur wenig Chimärismus aufwiesen (James et al., 2006). James et al. vermuteten daher, dass die Erzeugung lebensfähiger chimärer Tiere durch die Injektion pluripotenter humaner ESCs in murine Blastozysten aufgrund evolutionärer Unterschiede im Entwicklungsprogramm von Mensch und Maus nicht möglich ist.

Trotzdem kann durch die Blastozysteninjektion das Entwicklungspotential von humanen Zelltypen untersucht werden. So führte die Injektion von unreifen humanen Zahnpulpastammzellen (*human immature dental pulp stem cells*, hIDPSCs) mehrheitlich zu einem normalen Phänotyp der Embryonen. Nach der Injektion von hIDPSCs waren Donorsignale in einer Reihe von Organen wie Gehirn, Leber, Darm und Herz zu finden und eine Differenzierung in muskuläre und epitheliale Zelltypen wurde gezeigt (Siqueira da Fonseca et al., 2009). Die Injektion humaner HSCs aus der Nabelschnur führte zu Embryonen, die in den Geweben der embryonalen Hämatopoese sowie im Blut chimär waren und eine erythroide Differenzierung wurde festgestellt (Harder et al., 2002a). Humane hämatopoetische Vorläuferzellen zeigten zudem nach der Blastozysteninjektion eine Differenzierung zu einem hepatozyten Phänotyp (Turrini et al., 2004). Selbst die Injektion humaner akuter myeloider leukämischer Zellen erzeugten einen Chimärismus und eine erythroide Differenzierung der humanen Zellen war möglich (Dürr et al., 2003).

Eine gewebstypische Differenzierung humaner Zellen in verschiedenen murinen Geweben ist also möglich und das Entwicklungspotential humaner Zelltypen kann daher nach der Injektion in murine Blastozysten untersucht werden.

## 1.2. Mesenchymale Stammzellen

Verschiedene frühe Arbeiten deuteten bereits daraufhin, dass das Knochenmark neben den HSCs auch nicht-hämatopoetische Stammzellen beherbergt (Tavassoli & Crosby, 1968). In diesen Studien wurde gezeigt, dass es nach der Transplantation von Knochenmark in heterotropische anatomische Stellen zur *de novo* Bildung von Knochen und Knochenmark an diesen Stellen kommt. Es ist also im Knochenmark ein osteogenes Differenzierungspotential vorhanden. Versuche von Friedenstein et al. konnten später zeigen, dass dieses osteogene Differenzierungspotential mit einem bestimmten Teil der Knochenmarkszellen assoziiert ist (Friedenstein et al., 1974). Diese Knochenmarkszellen unterschieden sich deutlich von hämatopoetischen Zellen, da sie in den Zellkulturgefäßen adhärent wuchsen und eine fibroblastoide Morphologie annahmen. In anderen Experimenten konnten Friedenstein et al. zeigen, dass diese Zellen von Einzelzellen ausgehende Kolonien bildeten, wenn sie dünn genug ausgesät wurden (Friedenstein et al., 1970). Diese Knochenmarkszellen wurden deshalb als koloniebildende fibroblastoide Einheit (*colony forming unit fibroblastic*, CFU-F.) bezeichnet. *In vivo* Transplantationsversuche zeigten dann die Differenzierungsfähigkeit einzelner dieser Zellen zu Knochen, Knorpel, Fettgewebe und fasrigem Bindegewebe (Friedenstein et al., 1974; Owen & Friedenstein, 1988). Owen und Friedenstein verwendeten darauf hin den Begriff osteogene (Friedenstein et al., 1987) bzw. Stroma-Stammzellen (Owen & Friedenstein, 1988), da alle Zelltypen, die gefunden wurden, auch Teil des Stromas des Knochenmarks waren.

Der Begriff mesenchymale Stammzellen (MSCs) wurde erst später von Caplan et al. eingeführt (Caplan, 1991), als gezeigt wurde, dass diese Zellen verschiedene Zelltypen bilden können, die sich aus dem Mesenchym, einem großteils aus dem Mesoderm stammenden embryonalen Bindegewebe, entwickeln. Daneben wird häufig auch die Bezeichnung mesenchymale Stromazellen verwendet, da MSC-Präparationen heterogen zusammengesetzt sind und nicht alle Zellen Stammzelleigenschaften haben. So zeigt beispielsweise nur jede dritte CFU-F aus dem Knochenmark ein trilineares Differenzierungspotential, d.h. die Fähigkeit adipogen, chondrogen und osteogen zu differenzieren (Pittenger et al., 1999; Muraglia et al., 2000). Daher macht die eigentliche Stammzellpopulation möglicherweise nur einen Teil der Zellpräparation aus. In der aktuellen Literatur werden der Begriff mesenchymale Stammzellen (Caplan & Correa,

2011) und mesenchymale Stromazellen (Auletta et al., 2011; Cholewa et al., 2011) parallel verwendet. Eine einheitliche Begrifflichkeit besteht nicht. Die Abkürzung MSCs wird für beide Begriffe verwendet und beschreibt auch die gleiche Zellpräparation, da bisher keine Marker existieren um die eigentlichen mesenchymalen Stammzellen zu isolieren (Kolf et al., 2007). Auch in der vorliegenden Arbeit wird die Abkürzung MSCs verwendet, wenn es um diese heterogen zusammengesetzten Zellpräparationen geht.

### **1.2.1. Definition und Charakterisierung von MSCs**

Aufgrund der Vielzahl und Verschiedenheit der beschriebenen mesenchymalen Vorläuferzellen veröffentlichte die International Society for Cellular Therapy eine Minimaldefinition für MSCs. Darin werden MSCs über ihre *in vitro* Eigenschaften funktionell definiert:

*“First, MSC must be plastic-adherent when maintained in standard culture conditions. Second, MSC must express CD105, CD73 and CD90, and lack expression of CD45, CD34, CD14 or CD11b, CD79 or CD19 and HLA-DR surface molecules. Third, MSC must differentiate to osteoblasts, adipocytes and chondroblasts in vitro.”* (Dominici et al., 2006)

MSCs zeigen also *in vitro* ein adhärentes Wachstum und eine fibroblastoide Morphologie. Sowohl adhärentes Wachstum als auch die fibroblastoide Morphologie sind jedoch Merkmale, die auch bei anderen Zelltypen, wie z.B. Fibroblasten, beobachtet werden können. Daher werden MSCs auch über die Expression von Oberflächenantigenen und über ihr Differenzierungspotential definiert. MSCs exprimieren CD105, CD73 und CD90. Dagegen zeigen sie keine Expression von CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 und CD19. Des Weiteren sind sie negativ für den Haupthistokompatibilitätskomplex II (*major histocompatibility complex class II*, MHC II oder HLA-DR). Das *in vitro* Differenzierungspotential muss adipogene, chondrogene und osteogene Differenzierung umfassen (Dominici et al., 2006).

Wurden MSCs anfangs nur als Stammzelltyp des Knochenmarks gesehen, zeigen neuere Arbeiten, dass sich MSCs oder MSC-artige Zellen aus einer Vielzahl von Geweben isolieren lassen (da Silva Meirelles et al., 2006), darunter auch Nabelschnurblut (Lee et al., 2004) und Fettgewebe (Zuk et al., 2002)

Der Anteil der CFU-F in den Geweben ist relativ niedrig und unterscheidet sich je nach Gewebe. So wurde gezeigt, dass pro  $10^6$  mononukleären Zellen aus dem Knochenmark durchschnittlich 80, aus Fettgewebe 560 und aus Nabelschnurblut nur 0,002 der Zellen CFU-F sind (Kern et al., 2006). Der Anteil der CFU-F, die aus dem Ausgangsmaterial gewonnen werden können, kann jedoch durch vorherige Selektion auf bestimmte Oberflächenmarker, wie z.B. STRO-1 (Simmons & Torok-Storb, 1991; Gronthos et al., 1994), SSEA-4 (Gang et al., 2007), CD146 und CD271 (Quirici et al., 2002; Sorrentino et al., 2008; Tormin et al., 2011) gesteigert werden. Besonders vielversprechend scheint die Selektion auf den Marker CD271 (*low-affinity nerve growth factor receptor*, LNGFR) zu sein. Die positive Selektion von Knochenmarkszellen auf CD271 führt zu einem 40-fach höheren Anteil an CFU-F gegenüber den nur über Adhärenz isolierten MSCs. Außerdem enthält die CD271-positive Fraktion Zellen mit Koloniebildungsfähigkeit und Differenzierungspotential, die in der CD271-negativen Fraktion nicht mehr gefunden werden konnten (Quirici et al., 2002). Die auf diese Weise selektierten Zellen sind jedoch immer noch heterogen, da CD271 kein Oberflächenmarker ist, der exklusiv nur auf MSCs exprimiert wird.

### **1.2.2. Stammzellnische und *in vivo* Funktion von MSCs**

Über die *in vivo* Biologie von MSCs ist nur wenig bekannt, da ein Großteil der Arbeiten sich mit der Charakterisierung der *in vitro* expandierten MSCs befasst. Auch die vorhandene Definition von MSCs beschreibt nur den *in vitro* Phänotyp der MSCs, nicht jedoch ihre *in vivo* Identität (Dominici et al., 2006). Daher sind auch die Stammzellnische der MSCs und ihre biologische Rolle bisher wenig untersucht.

Neuere Arbeiten geben jedoch Hinweise auf die Stammzellnische der MSCs. Sie legen nahe, dass MSCs in fast allen Geweben in einer perivaskulären Nische vorkommen, wo sie eng mit Blutgefäßen assoziiert sind (Shi & Gronthos, 2003; da Silva Meirelles et al., 2006; Crisan et al., 2008). MSCs zeigen Gemeinsamkeiten mit Perizyten, einer Population von Zellen, die in der Nachbarschaft von endothelialen Zellen an Blutgefäßen vorkommen. So ist auch für Perizyten eine MSC-typische chondrogene, osteogene und adipogene Differenzierung beschrieben (Doherty et al., 1998; Farrington-Rock et al., 2004). Auch hinsichtlich der Expression von Oberflächenmarkern konnten Ähnlich-

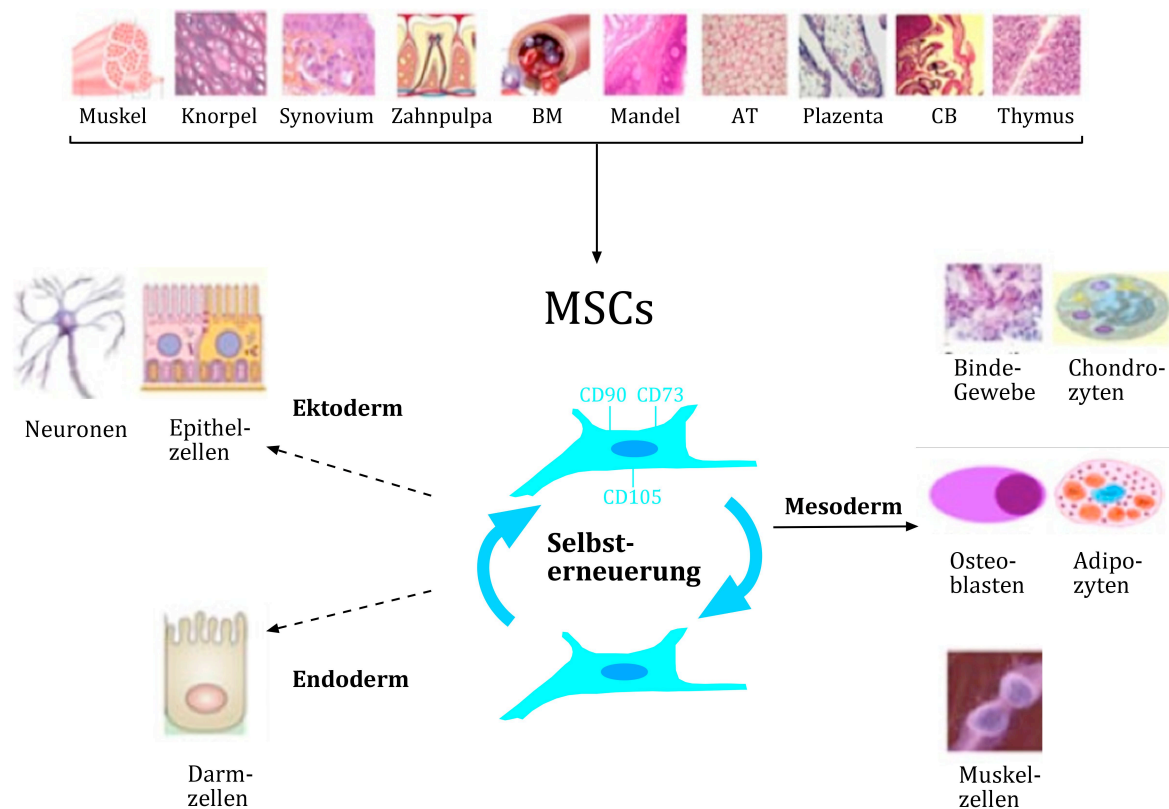
keiten zwischen MSCs und Perizyten gefunden werden (Shi & Gronthos, 2003). Daher wurde vermutet, dass es sich bei MSCs um eine Art Perizyten handeln könnte (Crisan et al., 2008). Eine perivaskuläre Lokalisation der MSCs würde auch die Vielzahl an Ursprungsgeweben erklären, da MSCs dort in Assoziation mit Blutgefäßen vorkommen könnten. Neben dem Knochenmark können sie unter anderem auch aus Nabelschnurblut, Zahnpulpa, Muskeln, Knorpel, Synovium, Thymus, Plazenta und der stromavaskulären Fraktion des Fettgewebes isoliert werden (da Silva Meirelles et al., 2006; Kuhn & Tuan, 2010) (Abb. 2).

Die perivaskuläre Lokalisation führte zusammen mit den bisher charakterisierten Eigenschaften der MSCs zur Entwicklung eines Modells für die *in vivo* Funktion von MSCs. Es wird vermutet, dass MSCs in der perivaskulären Nische unter normalen Umständen an der Homeostase des umliegenden Gewebes beteiligt sind. Ausgelöst durch Gewebsverletzungen kommt es zur Migration der MSCs in die Verletzungsstelle, wo die MSCs proliferieren und an den Wundheilungsprozessen mitwirken. Möglicherweise kommt es dann – abhängig vom Gewebe – zur Differenzierung oder zum Absterben der eingewanderten MSCs (da Silva Meirelles et al., 2008).

### **1.2.3. Das Entwicklungspotential von MSCs**

Das Entwicklungspotential von MSCs aus dem Knochenmark (*bone marrow*; BM-MSCs) ist bisher am umfassendsten charakterisiert. BM-MSCs zeigen ein Differenzierungspotential zu Zelltypen des Knochenmarkstroma, darunter Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten. Dies wurde durch Arbeiten von Friedenstein und einer Vielzahl nachfolgender Studien *in vivo* und *in vitro* gezeigt (Friedenstein et al., 1974; Caplan, 1991; Pittenger et al., 1999). Weitere Arbeiten zeigten eine Differenzierung von BM-MSCs auch zu anderen mesenchymalen Zelltypen, wie Myoblasten und Kardiomyozyten (Toma et al., 2002; Dezawa et al., 2005).

Auch MSCs aus anderen Ursprungsgeweben, darunter MSCs aus Fettgewebe (*adipose tissue*; AT-MSCs) und aus Nabelschnurblut (*cord blood*; CB-MSCs) zeigen eine osteogene, chondrogene und adipogene Differenzierungsfähigkeit (Zuk et al., 2002; Lee et al., 2004).



### Abb. 2 Herkunftsgewebe und Differenzierungspotential von MSCs

Die Abbildung zeigt, dass MSCs aus einer Vielzahl von Geweben isoliert werden können. MSCs tragen eine charakteristische Kombination von Oberflächenmarkern (CD73, CD90 und CD105) und haben die Fähigkeit sich selbst zu erneuern. Sie haben ein Multi-Linien-Differenzierungspotential zu vielen mesodermalen Zelltypen, u.a. Bindegewebe, Chondrozyten, Osteoblasten, Adipozyten und Muskelzellen. Daneben gibt es auch ein erweitertes Differenzierungspotential zu ektodermalen und endodermalen Zelltypen (adaptiert aus Kuhn & Tuan, 2010).

Ursprünglich ging man davon aus, dass adulte Stammzellen nur die Fähigkeit haben die Zelltypen des Gewebes zu bilden, in dem sie sich befinden. Verschiedene Studien haben jedoch beschrieben, dass adulte Stammzellen auch Zelltypen bilden können, die einer anderen Keimbahn angehören. Ein solches erweitertes Differenzierungspotential wurde beispielweise für HSCs (Krause et al., 2001; Camargo et al., 2003), NSCs (Bjornson et al., 1999) und Muskelstammzellen beschrieben (Gussoni et al., 1999). Andere Studien erbrachten auch Hinweise auf ein erweitertes Entwicklungspotential von MSCs. So wurde beispielsweise die Differenzierung von BM-, CB- und AT-MSCs zu neuroektodermalen Zellen des Gehirns (Kopen et al., 1999; Jang et al., 2010; Tio et al., 2010) sowie zu endodermalen Zelltypen, z.B. Hepatozyten, berichtet (Sato et al., 2005; Banas et al., 2007; Sgodda et al., 2007; Aurich et al., 2009) (Abb.2).

Allerdings wird kontrovers diskutiert, ob ein erweitertes Differenzierungspotential von MSCs und anderen adulten Stammzellen existiert. Denn Befunde, die ein erweitertes Entwicklungspotential von adulten Stammzellen nahe legen, könnten auch eine Folge der Fusion mit Zellen des Empfängers sein (Alvarez-Dolado et al., 2003; Vassilopoulos et al., 2003) oder aufgrund der Transplantation einer heterogenen Mischung verschiedener Vorläuferzellen beruhen (Issarachai et al., 2002; McKinney-Freeman et al., 2002). Somit ist das wahre Entwicklungspotential von MSCs unklar.

#### ***1.2.4. Potentielle Anwendungen für MSCs in der regenerativen Medizin***

Die Bedeutung von MSCs für die Entwicklung klinischer Therapien spiegelt sich in der großen Anzahl bereits durchgeführter, momentan laufender und noch geplanter Studien mit MSCs der klinischen Phase I und II wieder. Von den derzeit 146 auf der Webseite des U.S National Institutes of Health aufgelisteten klinischen Studien mit MSCs verwendet die Mehrzahl BM-, CB- oder AT-MSCs als Zellquelle (clinicaltrials.gov). Dies verdeutlicht die Rolle gerade dieser drei MSC-Quellen für die Entwicklung klinischer Therapien. Die derzeit erforschten Therapieansätze basieren dabei auf unterschiedlichen Eigenschaften von MSCs.

Ein Teil der erforschten Therapieansätze zielt auf die Regeneration oder den Ersatz geschädigten oder kranken Gewebes durch MSCs. Ein Beispiel hierfür ist die Behandlung von Patienten mit Osteogenesis Imperfecta (OI), einer autosomal dominanten Erbkrankheit, durch die es zur fehlerhaften Synthese von Kollagen Typ 1 kommt. Patienten mit OI leiden unter extremer Knochenbrüchigkeit, Knochendeformation und Wachstumsstörungen. Studien im transgenen Mausmodell (Pereira et al., 1998) und erste klinische Versuche im humanen System (Horwitz et al., 1999) konnten zeigen, dass die Gabe von MSCs zu einer Verbesserung dieses Krankheitsbildes führte. Daneben gibt es Bemühungen, MSCs zur Regeneration des Herzgewebes nach einem Herzinfarkt einzusetzen. Studien, die diesen Ansatz verfolgten, kamen zu dem Ergebnis, dass die Transplantation von MSCs zu einer deutlich verbesserten Regeneration des Herzmuskels führt (Grinnemo et al., 2004; Dai et al., 2005; Noiseux et al., 2006; Gaebel et al., 2011). Allerdings konnte eine Differenzierung von MSCs *in vivo* zu Kardiomyozyten im nennenswerten Umfang in diesen Studien nicht gezeigt werden. Somit kann die

positive Wirkung der MSCs nicht auf einen erfolgten Ersatz des geschädigten Gewebes durch gewebstypisch differenzierte MSCs zurückgeführt werden. Es wurde aber vermutet, dass die transplantierten MSCs die Regeneration des vom Infarkt betroffenen Gewebes durch parakrine Faktoren unterstützten. Vorausgegangene Studien haben nämlich gezeigt, dass MSCs u.a. Cytokine, die die Angiogenese fördern, und antiapoptotische Faktoren sezernieren (Kinnaird et al., 2004; Hung et al., 2007). Der Einsatz von MSCs zur Regeneration geschädigter Gewebe ist auch das Ziel für weitere potentielle Therapien mit MSCs, wie z.B. der Behandlung von Knochendefekten kritischer Größe (Quarto et al., 2001) oder der Unterstützung der Regeneration der Leber (Banas et al., 2008). Daneben finden MSCs auch Anwendung beim Tissue-Engineering, also der Gewebezüchtung. Hier wurden patienteneigene MSCs z.B. erfolgreich für die Herstellung transplantierbarer künstlicher Luftröhren verwendet (Macchiarini et al., 2008; Jungebluth et al., 2011).

Eine andere Eigenschaft von MSCs bildet die Grundlage für einen grundsätzlich unterschiedlichen Therapieansatz. MSCs werden nämlich vom Immunsystem nicht oder nur schlecht erkannt. Die Ursache für diese Immunprivilegierung liegt zum Teil im Immunphänotyp der Zellen. BM-MSCs exprimieren an der Zelloberfläche HLA-DR, während sie die co-stimulierenden Moleküle B7, CD40 oder CD40L nicht exprimieren. Daher werden sie von den T-Zellen des Immunsystems schlecht erkannt. Dazu kommt, dass MSCs auch auf verschiedene wichtige Zelltypen des Immunsystems, z.B. T-, B- und natürliche Killerzellen wirken und so die Immunantwort unterdrücken. Aufgrund dieser immunmodulierenden Eigenschaft wird die Behandlung der sogenannten *Graft versus Host Disease* (Transplant-gegen-Empfänger Krankheit, GvHD) mit MSCs erforscht. Die GvHD ist eine lebensbedrohliche Komplikation, die nach der Transplantation allogener HSCs auftreten kann. Dabei kommt es durch mittransplantierte immunkompetente Zellen zu einer Reaktion gegen die Antigene der Zellen des Empfängers. Zuerst beschrieben Le Blanc et al. die erfolgreiche Anwendung von haploidentischen MSCs zur Behandlung einer akuten GvHD in einer Einzelfallstudie (Le Blanc et al., 2004). Auch neuere klinische Studien mit einer größeren Anzahl Patienten legen nahe, dass die Gabe von MSCs sich vorteilhaft auf den Verlauf der GvHD auswirkt (Le Blanc et al., 2008). Gegenwärtig wird auch geprüft, ob durch die Co-Transplantation von MSCs bei der Transplantation von HSCs eine Ausbildung der GvHD verhindert werden kann (Chung et al., 2004; Tisato et al., 2007).



Neben ihren therapeutischen Einsatzmöglichkeiten sollen Stammzellen, die im Rahmen klinischer Therapien eingesetzt werden auch andere Kriterien erfüllen (Gimble et al., 2007): Sie müssen in ausreichender Zahl verfügbar sein, durch eine möglichst wenig invasive Prozedur mit minimaler Morbidität gewonnen werden können, gezielt und reproduzierbar differenzierbar sein, sicher und effizient in autologe und allogene Empfänger transplantiert werden können und in Übereinstimmung mit *Good Manufacturing Practice* (Gute Herstellungspraxis, GMP)-Bestimmungen produzierbar sein.

Eine vielversprechende Quelle für solche Stammzellen sind MSCs. Sie können relativ einfach aus Fettgewebe oder dem Knochenmark adulter Patienten gewonnen werden. Dies ermöglicht auch die Verwendung der Zellen in allogenen und autologen Therapieansätzen. MSCs sind immunprivilegiert und sie haben immunmodulierende Eigenschaften. Sie scheinen daher besonders geeignet für Transplantationen auch in allogene Empfänger zu sein. Daneben zeichnen sich MSCs durch eine gute Expansionsfähigkeit *in vitro* aus und ermöglichen so die Produktion der für die Therapie notwendigen Zellzahlen. Protokolle und Verfahren zur Gewinnung und Kultivierung von MSCs nach GMP-Anforderungen insbesondere unter Verzicht tierischer Seren werden derzeit entwickelt.

### **1.2.5. *In vitro* Expansion von MSCs**

Neben der Erforschung möglicher Anwendungsgebiete für MSCs in der regenerativen Medizin ist die Optimierung der Kulturbedingungen im Hinblick auf einen möglichen medizinischen Einsatz der MSCs von entscheidender Bedeutung, da eine Expansion von MSCs *in vitro* aufgrund ihrer niedrigen Frequenz in ihren Ursprungsgeweben vor einer potentiellen klinischen Anwendung grundsätzlich erforderlich scheint. Beispielsweise kommt auf  $3,4 \times 10^4$  Knochenmarkszellen nur eine MSC-Vorläuferzelle (Sarah et al., 2003). In der von Horwitz et al. durchgeführten klinischen Studie zum Einsatz von BM-MSCs zur Behandlung von Kindern mit OI wurden ca.  $5,7 - 7,5 \times 10^8$  Zellen pro kg Körpergewicht eingesetzt (Horwitz et al., 1999). Dies macht deutlich, dass eine Vermehrung der Zellen *in vitro* vorgenommen werden muss, um die nötigen Zellzahlen zu erreichen. Zwar wurde berichtet, dass die Vorläufer-

zellfrequenz im Fettgewebe höher ist als im Knochenmark (Kern et al., 2006), dennoch ist auch hier eine Expansion der Zellen *in vitro* unerlässlich um auf die nötigen Zellzahlen zu kommen.

Eine entscheidende Komponente ist dabei das dem Basalmedium zugefügte Serumsupplement. Es dient der Versorgung der MSCs mit Nährstoffen, Hormonen, Anheftungs- und Wachstumsfaktoren. Für die Proliferation und damit auch für die Expansion von MSCs *in vitro* sind verschiedene Wachstumsfaktoren bedeutsam, darunter Blutplättchen-Wachstumsfaktoren (PDGFs, *platelet-derived growth factors*), der transformierende Wachstumsfaktor (*transforming growth factor*, TGF)- $\beta$ , die Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (*fibroblast growth factors*, FGFs) (Ng et al., 2008) und der epidermale Wachstumsfaktor (*epidermal growth factor*, EGF) (Chieregato et al., 2011).

Als Serumsupplement in der Grundlagenforschung sowie in der Erprobung klinischer Anwendungen von MSCs wird bisher meist fötales Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS) verwendet. Grundsätzlich enthält FCS eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren, darunter PDGFs (Bowen-Pope et al., 1989) und TGFs (Childs et al., 1982). Es ist geeignet MSCs zu expandieren. Einige Autoren empfehlen die zusätzliche Gabe von weiteren Wachstumsfaktoren, wie z.B. EGF (Tamama et al., 2006) oder FGF-2 (Solchaga et al., 2005; Auletta et al., 2011). In anderen Studien wird die MSC-Kultur ohne zusätzliche Gabe von Wachstumsfaktoren durchgeführt (Kern et al., 2006; Kocaoemer et al., 2007).

Die Verwendung von FCS zur Expansion von MSCs und anderen Zelltypen für klinische Anwendungen ist jedoch aus verschiedenen Gründen nicht zu empfehlen, da dies zum Transfer von xenogenem Material in den Patienten führt. Dadurch besteht das Risiko einer Übertragung tierischer Krankheiten, sogenannten Zooanthroponosen auf den Patienten. Insbesondere das Risiko infektiöse Prionen zu übertragen, die im Verdacht stehen, übertragbare spongiforme Enzephalopathien zu verursachen (Asher, 1999), stellt ein großes Problem dar.

Unabhängig davon ist die Übertragung von xenogenem Material an sich ein Risiko, da dadurch eine Immunreaktion im Patienten ausgelöst werden kann. Studien mit MSCs und ESCs, die in FCS-supplementiertem Medium kultiviert wurden, zeigen, dass diese Zellen durch die im Menschen nicht vorkommende Sialinsäure N-Glycolylneuraminsäure (Neu5Gc) verunreinigt sind (Martin et al., 2005; Heiskanen et al., 2007). Da die meisten Menschen bereits Antikörper gegen Neu5Gc haben (Tangvoranuntakul et al., 2003),

besteht bei einer Transplantation von MSCs oder ESCs aus Kultur mit FCS-supplementiertem Medium das Risiko einer Immunreaktion gegen die transplantierten Zellen. Nicht nur Neu5Gc, sondern auch xenogene Proteine aus dem FCS könnten eine solche Reaktion beim Empfänger entsprechend kultivierter Zellen bewirken (Spees et al., 2004). Aufgrund dieser Risiken empfiehlt u.a. die European Medicines Agency (EMA) möglichst auf die Verwendung von tierischen Reagenzien bei der Herstellung von zellbasierten Medizinprodukten zu verzichten (Doc. Ref. EMA/CHMP/410869/2006).

### ***Alternativen zu FCS***

Eine Alternative zu FCS sind humane Supplemente wie Plasma, Serum oder aus Blutplättchen gewonnene Supplemente.

Eine erfolgreiche Expansion von MSCs kann beispielsweise durch humanes Blutplättchenlysate erfolgen, welches durch Zufügen von Thrombin oder wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Blutplättchen hergestellt wird. Auch humanes Plasma, der zellfreie Anteil des Blutes, und humanes Serum, d.h. Blutplasma, dessen Gerinnungsfaktoren entfernt wurden, sind geeignete Supplemente für die Expansion von MSCs. Grundsätzlich ist sowohl die Verwendung von autologen als auch allogenen Seren möglich. Unter autologem Serum versteht man ein Serum, bei dem der Spender der Zellen und des Serums identisch ist. Die Verwendung von autologem Serum für die Kultur von MSCs erbrachte meist positive Resultate, d. h. eine Expansion von MSCs war möglich (Stute et al., 2004; Kobayashi et al., 2005). Allerdings erscheint autologes Serum für die klinische Anwendung nur bedingt geeignet, da die verfügbare Menge eines solchen Serums begrenzt ist. Darüber hinaus kann sowohl die Erkrankung des Patienten, als auch ihre Behandlung – beispielsweise durch Chemotherapeutika oder andere Wirkstoffe – die Qualität des Serums beeinflussen. Daher wird die Verwendung von allogenen Seren zur Kultur von MSCs geprüft. Unter allogem Serum versteht man ein Serum, das von einem anderen humanen Spender stammt als die kultivierten Zellen. Allogene Seren können in größeren Mengen auch von einer Gruppe gesunder Spender bereitgestellt werden. Vorausgegangene Studien, in denen die Verwendung allogenen humanen Serums (HS) für die Expansion von BM-MSCs getestet wurde, kamen zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen. Während ein Teil der Arbeiten erfolgreich die Expansion von BM-MSCs in HS zeigen konnte (Oreffo et al., 1997; Gregory et al., 2006), berichteten

andere Studien von gleicher oder langsamerer Expansion der BM-MSCs verglichen mit FCS-Kulturen. Andere Studien stellten sogar vorzeitige Seneszenz der BM-MSCs bei Kultivierung mit einem Medium, das mit HS supplementiert war, fest (Kuznetsov et al., 2000; Shahdadfar et al., 2005). Die Verwendung von HS zur Expansion von AT-MSCs erbrachte ebenfalls verschiedene Ergebnisse. Während beispielsweise Lindroos et al. bei der Verwendung von allogenen HS im Vergleich zu FCS keine stärkere Proliferation feststellten (Lindroos et al., 2010), fanden Kocaoemer et al. eine stärkere Proliferation als in FCS-supplementiertem Medium (Kocaoemer et al., 2007).

### **1.2.6. Zelluläre Seneszenz**

MSCs lassen sich im Gegensatz zu anderen multipotenten Stammzellen wie HSCs vergleichsweise einfach in Kultur expandieren. Die Expansionsfähigkeit vieler Zelltypen in Kultur ist jedoch begrenzt. Dies wurde erstmals durch Studien in den 60er Jahren an humanen diploiden Fibroblasten beschrieben (Hayflick, 1965) und seither für eine Vielzahl von Zellen, darunter auch MSCs (Wagner et al., 2008). Andere Stammzellen wie ESCs lassen sich jedoch unbegrenzt in Kultur vermehren. Ursache für die Begrenzung der Expansionsfähigkeit sind Veränderungen der Zellen, die als zelluläre Seneszenz oder *in vitro* Alterung bezeichnet werden. Das Hauptmerkmal seneszenten Zellen ist der irreversible Verlust der Teilungsfähigkeit (Wagner et al., 2008). Daneben kommt es bei vielen Zelltypen auch zu morphologischen Veränderungen und bei Stammzellen darüber hinaus zum Verlust des Differenzierungspotentials. Häufig wird bei Seneszenz zwischen replikativer und prämaturer Seneszenz unterschieden.

Für replikative Seneszenz wird der Verlust der Telomerenden während der Replikation der Chromosomen als auslösender Faktor angenommen. Ursächlich für den Telomerverlust ist das sogenannte Endreplikationsproblem. Da die DNA-Polymerase die DNA nur in 5'-3'-Richtung synthetisiert, erfolgt die Polymerisation der DNA während der semikonservativen Replikation nur am Leitstrang kontinuierlich. Die Replikation des Folgestranges, der in 3'-5'-Richtung wächst, ist daher nur durch die Anlagerung von RNA-Primern möglich, die der DNA-Polymerase Anbindungsstellen bieten. Nach Abschluss der Polymerisation werden die RNA-Primer abgebaut und durch DNA ersetzt. Die Primer am äußersten 5'-Ende der neusynthetisierten Tochterstränge können jedoch

nicht ersetzt werden. In diesem Bereich befinden sich die Telomere, die sich folglich nach jeder Replikation verkürzen (Harley et al., 1990). Einige Zelltypen, darunter Keimzellen und ESCs, zeigen keinen Telomerverlust, da in diesen Zellen durch die Aktivität der Telomerase der Telomerverlust ausgeglichen werden kann (Blackburn, 1991; Wright et al., 1996; Amit et al., 2000). Da adulte MSCs aber weder Telomerase exprimieren noch eine Telomeraseaktivität feststellbar ist (Zimmermann et al., 2003; Bernardo et al., 2007), kommt es bei ihnen während der *in vitro* Kultur zum Telomerverlust und dadurch zum Funktionsverlust der Telomere.

Intakte Telomere schützen die linearen Chromosomenenden vor Chromosomenfusionen und Degradation und verhindern das Auslösen des DNA-Schädigungssignalweges durch die linearen Chromosomenenden (d'Adda di Fagagna et al., 2004; Capper et al., 2007). Es wird vermutet, dass bei Erreichen einer kritischen Länge Telomere ihre schützende Funktion verlieren. Es kommt daher zur Aktivierung des DNA-Schädigungssignalweges und dadurch zum Verlust der Teilungsfähigkeit der Zellen (d'Adda di Fagagna et al., 2003). Nach diesem Modell dienen Telomere als eine Art mitotische Uhr, die die Teilungsfähigkeit von Zellen begrenzt (Allsopp et al., 1992). Die Expansionsfähigkeit verschiedener humaner Zelltypen, darunter auch MSCs kann durch ektopische Expression der katalytischen Untereinheit der Telomerase (hTert) erweitert werden (Simonsen et al., 2002; Kobune et al., 2003).

Die Beobachtung, dass Seneszenz auch in Zellkulturen auftreten kann, die relativ lange Telomere haben und manche Zellen trotz Expression von hTert nicht unbegrenzt kultivierbar sind, führte zu der Erkenntnis, dass es auch andere Seneszenz auslösende Faktoren geben muss. Das Auftreten von Seneszenz vor dem Erreichen einer als kritisch angenommenen Telomerlänge führte zur Bezeichnung prämaturne Seneszenz. Als Auslöser der prämaturnen Seneszenz wurden u.a. kulturbedingte Stressfaktoren wie z.B. oxidativer Stress (Jin et al., 2009), UV-Strahlung und andere genotoxische Faktoren (Robles & Adami, 1998) vermutet. Zelluläre Seneszenz kann daher auch Folge von Stress in der Zellkultur sein.

Sowohl bei replikativer als auch prämaturner Seneszenz kommt es zur Aktivierung des DNA-Schädigungssignalweges. Im Gegensatz zu replikativer Seneszenz kann prämaturne Seneszenz aber durch Kulturbedingungen beeinflusst werden. So kann z.B. durch Komponenten der Seneszenz (Moran et al., 2002) oder durch Kultivierung bei

niedrigerer Sauerstoffkonzentration (Jin et al., 2009) der oxidative Stress der Zellen reduziert werden. Die Kultivierung unter hypoxischen Bedingungen, d.h. unter Sauerstoffmangel, führt bei MSCs daher zu einem höheren Expansionsvermögen (Fehrer et al., 2007; Jin et al., 2009).

### **1.3. Zielsetzung der Arbeit**

Für die Entwicklung zellbasierter klinischer Therapien sind MSCs eine der großen Hoffnungsträger. Grundlage hierfür ist auch das beschriebene Entwicklungspotential von MSCs. Insbesondere die Differenzierung von MSCs zu nicht-mesodermalen Geweben ist jedoch umstritten und wurde häufig auch nur *in vitro* gezeigt. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde deshalb das Entwicklungspotential von BM-, AT- und CB-MSCs nach Blastozysteninjektion *in vivo* in der murinen embryonalen Mikroumgebung untersucht. Durch die Analyse der Verteilung und der Differenzierung der Nachfahren der injizierten Zellen sollte das Entwicklungspotential von BM-, AT- und CB-MSCs vergleichend charakterisiert werden.

Im zweiten Teil wurde die Eignung eines HS, das aus verschiedenen Seren von Blutgruppe AB-Spendern bestand, für die Langzeitkultivierung von MSCs untersucht. Im Mittelpunkt der Untersuchungen standen die Auswirkungen der Verwendung von HS auf die *in vitro* Alterung der MSCs. Zur Bearbeitung dieser Fragestellung wurden AT-MSCs mit HS oder einem kommerziellen FCS-Supplement parallel kultiviert und das Expansionsvermögen sowie das Auftreten seneszenztypischer Veränderungen während der Langzeitkultur unter beiden Kulturbedingungen analysiert. Untersucht wurden dabei Veränderungen im Phänotyp, im adipogenen Differenzierungspotential und im Proliferationsvermögen sowie die Telomerverkürzung als möglicher Auslöser replikativer Seneszenz.

## 2. Ergebnisse

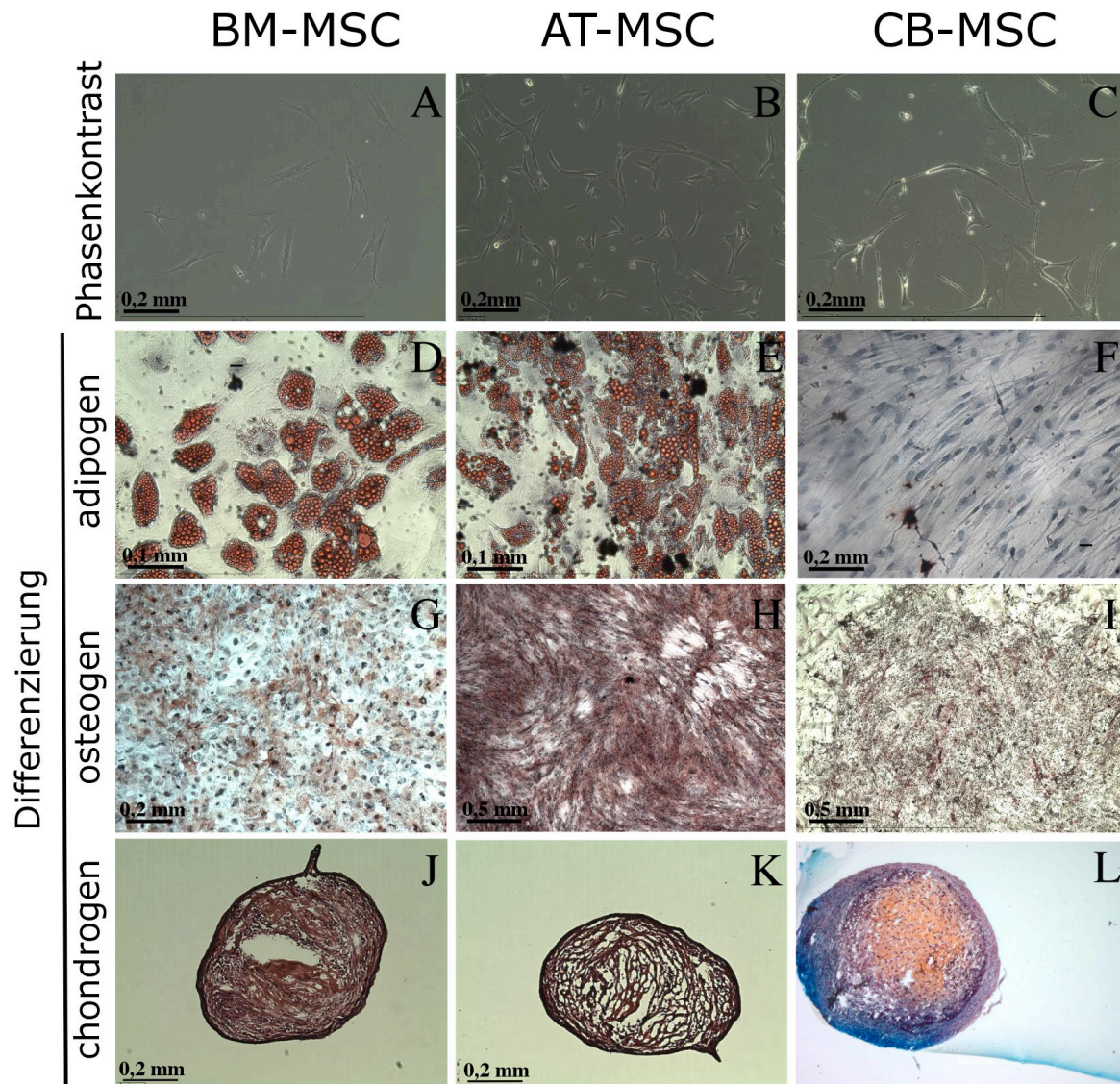
### 2.1. Morphologie und Multi-Linien-Differenzierungspotential von humanen MSCs aus BM, CB und AT *in vitro*

Bis zum heutigen Zeitpunkt ist die Isolation von mesenchymalen Vorläuferzellen aus einer Vielzahl von Ursprungsgeweben beschrieben worden (Kuhn & Tuan, 2010). Diese mesenchymalen Vorläuferzellen wurden häufig von verschiedenen Autoren unterschiedlich benannt, obwohl sie ähnliche Eigenschaften besitzen. Dazu kommt, dass selbst Zellen, die als MSCs benannt wurden, unterschiedliche Eigenschaften haben. Daher war es erforderlich, die in dieser Arbeit verwendeten Zellen zu charakterisieren. Da über die *in vivo* Eigenschaften der MSCs nur wenig bekannt ist, erfolgt die Charakterisierung von MSCs in der Regel aufgrund ihres *in vitro* Phänotypes und ihres *in vitro* Multi-Linien-Differenzierungspotentials.

#### 2.1.1. *In vitro* Phänotyp humaner MSCs

In der vorliegenden Arbeit wurden MSCs aus BM, CB und AT verwendet. Diese wurden unter gleichen Kulturbedingungen expandiert. Unter diesen Bedingungen wuchsen die MSCs aus BM (Abb.3 A), AT (Abb.3 B) und CB (Abb.3 C) adhärent auf der Zellkulturoberfläche und zeigten im Phasenkontrast mikroskopisch ein fibroblastoides Erscheinungsbild, welches auch für MSCs typisch ist. Morphologische Unterschiede zwischen MSCs aus BM, CB und AT wurden nicht beobachtet.

Die untersuchten Zellen wiesen also die für MSCs bekannte fibroblastoide Morphologie und adhärentes Wachstum auf.



**Abb. 3 Morphologie und Multi-Linien-Differenzierungspotential von MSCs aus BM, AT and CB**

Bei **A-C** handelt es sich um Phasenkontrastaufnahmen kultivierter MSCs aus BM (**A**), AT (**B**) und CB (**C**). **D-F** zeigen zuvor unter adipogenen Differenzierungsbedingungen kultivierte und anschließend mittels Öl-Rot gefärbte MSCs aus BM, AT und CB. Die abgebildeten Zellen in **G-I** sind osteogen differenzierte MSCs nach Detektion der Aktivität der endogenen Alkalischen Phosphatase. **J-L** zeigen Aufnahmen von Gewebeschnitten chondrogen differenzierter MSC-Pellets nach Safranin-O-Färbung. Die Aufnahme **L** wurde zur Verfügung gestellt von Andrea Hecker (Mannheim).n ≥ 2



### **2.1.2. Das *in vitro* Multi-Linien-Differenzierungspotential humaner MSCs**

Die beobachtete Morphologie ist nicht einzigartig für MSCs, sondern kommt auch bei anderen Zelltypen, wie z.B. Fibroblasten vor. Eine spezifische Eigenschaft der MSCs ist dagegen ihr *in vitro* Differenzierungspotential. Um zu überprüfen, ob es sich bei den Zellen um funktionelle MSCs handelt, wurde daher das MSC-typische *in vitro* Differenzierungspotential der Zellen getestet. Dazu wurde die Fähigkeit der Zellen adipogen, osteogen und chondrogen zu differenzieren untersucht.

Zur adipogenen Differenzierung wurden die konfluent gewachsenen Zellen abwechselnd in einem Differenzierungsmedium und einem Erhaltungsmedium für ca. drei Wochen kultiviert. Nach Induktion der adipogenen Differenzierung wiesen MSCs aus BM und AT eine phänotypisch deutlich sichtbare Akkumulation von Lipidvakuolen im Zytoplasma auf. Diese Lipidvakuolen konnten mittels Öl-Rot angefärbt werden (Abb. 3 D, E). MSCs aus CB (Abb. 3 F) dagegen zeigten nach Kultur unter adipogenen Differenzierungsbedingungen keine Lipidvakuolen und die Färbereaktion mit Öl-Rot erbrachte nur ein schwaches unspezifisches Signal, das sich deutlich von dem adipogen differenzierter BM- und AT-MSCs unterschied.

Die osteogene Differenzierung von MSCs wurde durch Dexamethason,  $\beta$ -Glycerophosphat und Ascorbat im Differenzierungsmedium induziert. Nach drei Wochen Kultur unter osteogenen Differenzierungsbedingungen wurde eine erfolgreiche osteogene Differenzierung der MSCs aus BM, AT und CB über eine gesteigerte Aktivität der endogenen alkalischen Phosphatase (AP) nachgewiesen. Diese Aktivität wurde nach Durchführung der Nachweisreaktion durch die Akkumulation eines roten Präzipitates auf dem Objektträger sichtbar (Abb. 3 G-I).

Die chondrogene Differenzierung wurde als Pelletkultur durchgeführt. Das durch die Zentrifugation entstandene Zellpellet entwickelte sich nach einem Tag zu einem frei schwimmenden Zellaggregat. Während des Differenzierungszeitraumes waren keine äußerlich sichtbaren Veränderungen zu erkennen. Nach drei Wochen Kultur unter chondrogenen Differenzierungsbedingungen wurden die Pellets dann kryokonserviert und Gefrierschnitte angefertigt. Nach Anfärbung der Schnitte wurde für die MSCs aus BM und AT die Bildung von knorpelspezifischen Glykosaminoglykanen mittels Safranin-O-Färbung festgestellt (Abb. 3 J-K). Die chondrogene Differenzierung von CB-MSCs

---

führte unser Kooperationspartner Andrea Hecker (Labor Dr. Karen Bieback, Mannheim) durch (Abb. 3 L). CB-MSCs besitzen ebenfalls ein chondrogenes Differenzierungspotential.

Aufgrund dieser Daten wurde festgestellt, dass die verwendeten MSCs aus CB, BM und AT chondrogenes und osteogenes Differenzierungspotential haben. Adipogenes Differenzierungspotential wurde dagegen nur für MSCs aus AT und BM nachgewiesen, nicht jedoch für CB-MSCs.

## **2.2. Auswirkungen längerer *in vitro* Kultur auf AT-MSCs in HS- oder FCS-supplementiertem Wachstumsmedium**

Eine wichtige Eigenschaft der MSCs ist ihre Kultivierbarkeit und ihre Expansionsfähigkeit *in vitro*, da für klinische Anwendungen oftmals hohe Zellzahlen erforderlich sind. Üblicherweise werden MSCs in Medium mit FCS-Supplement expandiert. Da jedoch bei der Verwendung von tierischem Serum die Gefahr besteht, dass tierische Proteine in den Patienten gelangen, wurde in den letzten Jahren verstärkt die Verwendung von nicht-tierischen Alternativen erforscht (Bieback et al., 2010; Lindroos et al., 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde HS von Spendern mit der Blutgruppe AB im Wachstumsmedium für die Expansion von AT-MSCs als mögliche Alternative zu FCS untersucht.

Die Verwendung von AT-MSCs bietet dabei Vorteile gegenüber der Verwendung von BM- oder CB-MSCs. Kern et al. fanden in einer Studie, in der MSCs aus BM, CB und AT vergleichend analysiert wurden, heraus, dass sich AT-MSCs ebenso wie BM-MSCs, aber im Gegensatz zu CB-MSCs, mit hoher Effizienz etablieren lassen (Kern et al., 2006). Darüber hinaus beschreibt die gleiche Arbeit, dass die Frequenz der mesenchymalen Vorläuferzellen bei Isolation der MSCs aus Fettgewebe höher ist als bei Isolation aus Knochenmark. Aufgrund dieser Eigenschaften erscheinen AT-MSCs als gute Alternative zu BM-MSCs.

Da bisher nur wenig bekannt ist über die Auswirkungen der Langzeitkultur von AT-MSCs bei Verwendung von HS, wurden in der vorliegenden Arbeit AT-MSCs mit HS- und FCS-supplementiertem Medium kultiviert und vergleichend analysiert. Dabei sollte die

Auswirkung von HS im Wachstumsmedium auf die AT-MSCs untersucht werden. Von besonderem Interesse war die Auswirkung von HS im Vergleich zu FCS auf die *in vitro* Alterungsprozesse der Zellen.

### ***2.2.1. Wachstumskinetik der AT-MSCs während der Langzeitkultur in HS- oder FCS-supplementiertem Medium***

Um den Einfluss des verwendeten Serums auf das Expansionsvermögen und die Wachstumskinetik von AT-MSCs während der Langzeitkultur zu testen, wurden jeweils drei AT-MSC-Präparationen mit FCS- oder HS-Supplement im Wachstumsmedium langzeitkultiviert. Die Zusammensetzung der Medien unterschied sich dabei nur in der Serumkomponente, Basalmedium und andere Medienzusätze waren identisch.

Während der Kultur wurde die Anzahl der Populationsverdopplungen aller sechs Präparationen nach jeder Passage bestimmt und die Zahl der kumulativen Populationsverdopplungen (*cumulative population doublings*, CPD) berechnet.

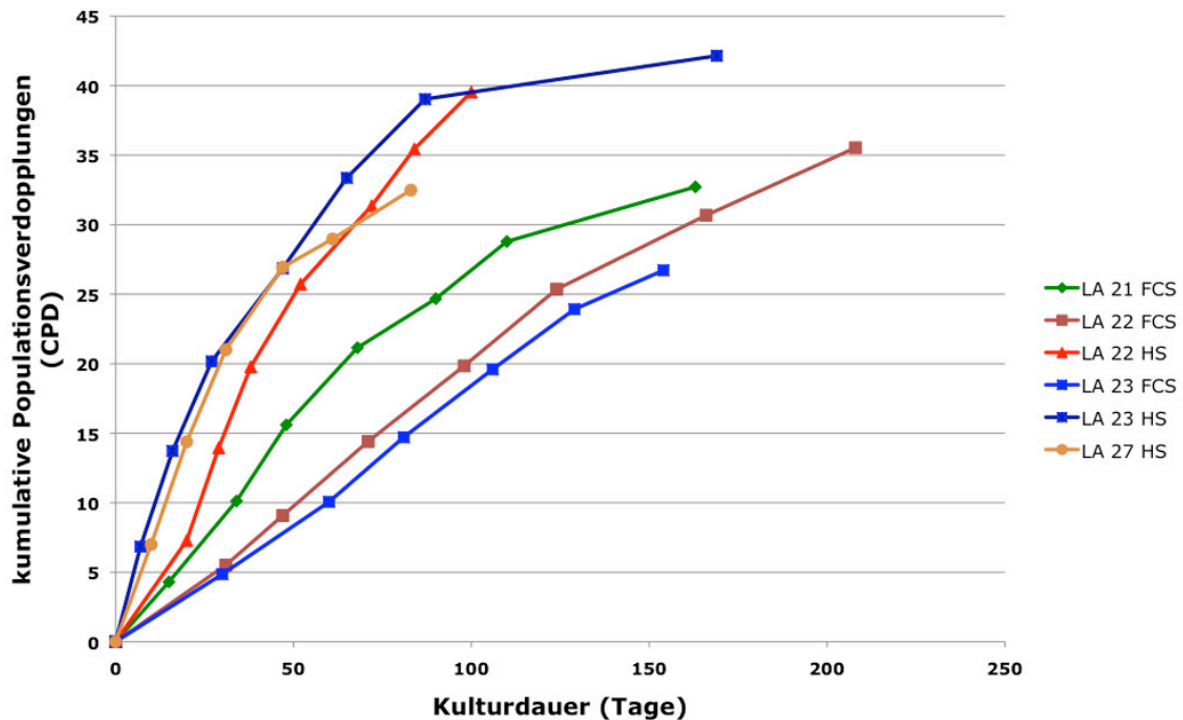
Für die Expansion der AT-MSC-Kulturen LA 22 HS, LA 23 HS und LA 27 HS wurde ein HS-supplementiertes Medium verwendet, während LA 21 FCS, LA 22 FCS und LA 23 FCS in FCS-supplementiertem Medium wuchsen. Um Einflüsse des genetischen Hintergrundes der Individuen zu berücksichtigen, wurden die Kulturen LA 22 (HS und FCS) und LA 23 (HS und FCS) aus einem identischen Spender isoliert.

Zur Bestimmung der CPD wurde, beginnend nach der ersten Passagierung, die Anzahl der Populationsverdopplungen zwischen den Passagen bestimmt. Dazu wurden die AT-MSCs in der Dichte 200 Zellen pro cm<sup>2</sup> Kulturoberfläche ausgesät. Die AT-MSCs wurden dann bis zum Erreichen einer Konfluenz von ca. 70-80 % kultiviert und nach der Bestimmung der Zellzahlen erneut in der Dichte 200 Zellen pro cm<sup>2</sup> ausgesät. Die AT-MSCs wurden auf die beschriebene Weise in den folgenden Passagen weiter kultiviert. Aus der Zellzahl, die ausgesät wurde ( $N_0$ ) und der Zellzahl bei Passagierung ( $N$ ) wurde die Anzahl der Populationsverdopplungen (PD) nach folgender Formel berechnet:

$$PD = \frac{(\log N - \log N_0)}{\log 2} .$$

Die Bestimmung der Populationsverdopplungen pro Passage wurde jeweils in drei parallelen Kulturansätzen durchgeführt. Der Mittelwert der drei berechneten Populationsverdopplungen wurde gebildet und zusammen mit den Populationsverdopplungen aus den vorhergehenden Passagen zur CPD summiert.

Alle Kulturen wurden mindestens bis zur Passage 6 expandiert. In den darüber hinaus gehenden Passagen wurde die Kultivierung der Zellen beendet, wenn die Zellen im Zeitraum von drei bis vier Wochen nicht bis zu 70-80 % konfluent wuchsen.



**Abb.4 Wachstumskinetik von AT-MSCs während der Langzeitkultivierung**

Das Diagramm zeigt die Entwicklung der Populationsverdopplungsrate mit fortschreitender Kulturdauer. Aufgetragen sind die mittleren kumulativen Populationsverdopplungen (CPD) von AT-MSCs aus Kulturen mit HS- bzw. FCS-supplementiertem Medium gegen die Kulturdauer. Die AT-MSC-Kulturen LA 22 (HS und FCS) und LA 23 (HS und FCS) wurden jeweils zeitgleich aus dem gleichen Spender isoliert und anschließend als HS- oder FCS-Kultur expandiert. Zur Bestimmung der mittleren CPD der Kulturen wurde jeweils die mittlere Anzahl der Populationsverdopplungen zwischen den Passagierungen in drei parallelen Ansätzen bestimmt ( $n=3$ ) und anschließend summiert.

Insgesamt erreichten die AT-MSCs unter diesen Kriterien in HS-Kultur maximal 32-42 CPD, während sie in FCS-Kultur nur zwischen 26 und 36 CPD erreichten.

Die Verwendung von HS-Supplement im Kulturmedium führte zu einer wesentlich schnelleren Populationsverdopplungsrate der AT-MSCs als die Verwendung von FCS-Supplement (Abb. 4). AT-MSCs in Kultur mit HS-Supplement erreichten 25 CPD nach 40 bis 50 Tagen, während AT-MSCs mit FCS-Supplement dafür 90 bis 140 Tage benötigten. Dieser schnelle Zuwachs spiegelt sich in der graphischen Darstellung durch die stärkere Steigung der Graphen der drei HS-Kulturen gegenüber der Steigung der Graphen der AT-MSCs in FCS-Kultur wider.

Bei der genaueren Analyse zeigte sich, dass zu Beginn der Kultur die Zunahme der Populationsverdopplungen pro Kulturdauer schwächer war und dann ein Maximum erreichte. Dieses Maximum lag bei den FCS-Kulturen LA 21 FCS zwischen Passage 2 und 3 (10-16 CPD), für LA 22 FCS zwischen Passage 1 und 3 (5-15 CPD), für LA 23 FCS zwischen Passage 2 und 3 (10-15 CPD) und war signifikant höher als in den übrigen Passagen ( $p < .01$ ). Die Wachstumskurve der HS-Kulturen hatte ihre stärkste Steigung zwischen Passage 1 und 2 LA 22 HS (7-14 CPD) und LA 27 HS (7-14CPD) bzw. zwischen Passage 0 und 1 LA 23 HS (0-7 CPD). Auch dieses Ergebnis war signifikant ( $p < .01$ ).

Nach Erreichen der maximalen Kurvensteigung nahm die Steigung allmählich ab und erreichte ein Minimum in den jeweils letzten untersuchten Passagen.

Die AT-MSCs aus der HS-Kultur wiesen die kürzeste Passagendauer - also den Zeitraum bis zur nächsten Passagierung - in den Passagen 1, 2 und 3 auf. In diesen Passagen lag die Passagendauer bei durchschnittlich 10,7 Tagen ( $SD \pm 3,5$ ). In den folgenden Passagen (4, 5, 6) dauerte es durchschnittlich 17,5 Tage ( $SD \pm 3,5$ ), bis die Zellen 70-80 % Konfluenz erreichten. Dieser Unterschied war signifikant ( $p < .01$ ). In der FCS-Kultur wurden 70-80 % Konfluenz während der frühen Passagen (1, 2, 3) nach durchschnittlich 18,5 Tagen ( $SD \pm 5,4$ ) erreicht, in späteren Passagen (4, 5, 6) dauerte es 24,3 Tage ( $SD \pm 6,73$ ). Dieser Unterschied war ebenfalls signifikant, jedoch weit weniger deutlich ( $p < .05$ ). Die Zunahme der Passagendauer wies ebenso wie der Rückgang der Populationsverdopplungsrate auf eine Verlangsamung des Wachstums der AT-MSCs im Laufe der Langzeitkultur hin.

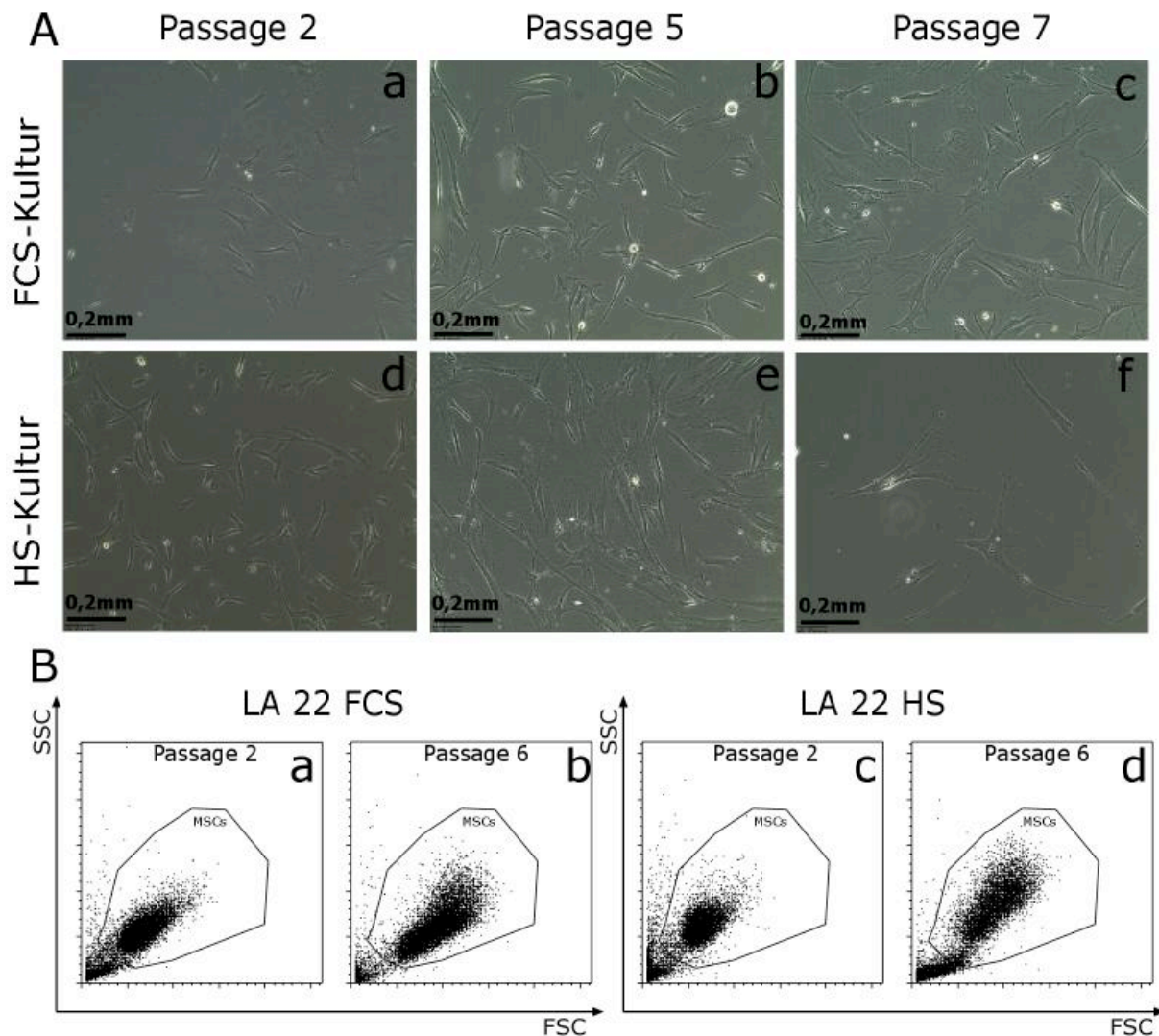
Insgesamt ergab die Analyse der Wachstumskinetik also, dass AT-MSCs in HS-Kultur schneller Populationsverdopplungen durchführen als AT-MSCs in FCS-Kultur. Weiterhin führte die Langzeitkultur von AT-MSCs in Medium mit HS- und FCS-Supplement zu einer Herabsetzung der Populationsverdopplungsrate und zu langsamem Populationswachstum.

### **2.2.2. Morphologie und Zellgröße während der Langzeitkultivierung von AT-MSCs**

Die Ergebnisse der Analyse der Wachstumskinetik machten bereits deutlich, dass während der Langzeitkultur die Wachstumsrate der AT-MSCs zurückgeht. Eine mögliche Ursache für den Verlust des proliferativen Potentials ist zelluläre Seneszenz. Seneszente Zellen verlieren unwiderruflich ihre Fähigkeit zur Zellteilung. Dieser Verlust geht einher mit deutlichen morphologischen Veränderungen. Seneszente Zellen sind häufig stark vergrößert und zeigen eine Anreicherung von Stressfasern im Zytoplasma (Chen et al., 2000). Für MSCs und andere Zelltypen sind solche morphologischen Veränderungen während der *in vitro* Alterung bereits dokumentiert (Wagner et al., 2008). In dieser Arbeit wurden die verwendeten AT-MSCs daher ebenfalls auf phänotypische Veränderungen während der Langzeitkultivierung untersucht. Auf diesem Weg sollten auftretende Veränderungen und der Einfluss des Serums auf die Veränderungen festgestellt werden.

Dazu wurden phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen zu verschiedenen Zeitpunkten der Langzeitkultur gemacht und die Morphologie der Zellen mikroskopisch untersucht. Zusätzlich wurde die Größe von Zellen mit niedriger (Passage 2) und hoher Passagenzahl (Passage 7) durch durchflusszytometrische Messung der Fluoreszenzintensität des Vorwärtstreulichts (FSC) und des Seitwärtsstreulichts (SSC) ermittelt. Da die Fluoreszenzintensität im FSC mit der Zellgröße korreliert und eine Zunahme im SSC eine erhöhte Granularität der Zellen anzeigt, können so Veränderungen der Morphologie festgestellt werden.

AT-MSCs aus Kultur mit HS- bzw. FCS-Supplement wurden in gleicher Konzentration in Vier-Kammer-Objektträgern ausgesät und nach einer Woche mikroskopisch ausgewertet.



**Abb. 5 Morphologie der AT-MSCs nach kurzer, mittlerer und langer Kultivierungsdauer**

In Abbildungsteil A sind Phasenkontrastaufnahmen von AT-MSCs nach kurzer (a, d), mittlerer (b, e) und hoher (c, f) Passagenzahl zu sehen. Die AT-MSCs wurden entweder in Medium mit HS- (a-c) oder FCS-Supplement (d-f) kultiviert. Abbildungsteil B gibt die Ergebnisse einer durchflusszytometrischen Bestimmung von Granularität und Zellgröße wieder. Die Zellgröße der MSCs wird repräsentiert durch die Fluoreszenzintensität im *forward scatter* (FSC), die Granularität durch die Fluoreszenzintensität im *sideward scatter* (SSC). In den Punktwolkendiagrammen sind FSC- gegen SSC-Profile kurzzeit- (a, c) und langzeitkultivierter (b, d) AT-MSCs aus HS- (a, b) und FCS-Kultur (c, d) aufgetragen. n=2

AT-MSCs veränderten nach langer Kulturdauer - unabhängig von der Kultivierung mit HS- oder FCS-Supplement - ihre Morphologie (Abb. 5). Während die Zellen zu Beginn der Kultivierung relativ klein waren und eine regelmäßige fibroblastoide Morphologie aufwiesen (Abb. 5 A a, d), ließ sich bereits in Passage 5 eine Zunahme an Heterogenität in der Zellgröße und der Morphologie erkennen (Abb. 5 A b, e). In Passage 7 schließlich

waren verstärkt Zellen zu finden, die stark abgeflacht und vergrößert waren (Abb. 5 A c, f). Diese Beobachtung konnte bei AT-MSCs unter beiden Kulturbedingungen gemacht werden. Die Zunahme der Zellgröße bei langzeitkultivierten AT-MSCs konnte auch bei durchflusszytometrischen Messungen beobachtet werden. In Abbildung 4 B ist dies am Beispiel einer Kultur mit FCS-supplementiertem (a-b) und HS-supplementiertem (c-d) Medium veranschaulicht. In beiden Beispielen ist eine Zunahme der Fluoreszenzintensität im FSC sowie im SSC nach Passage 7 gegenüber Passage 2 erkennbar.

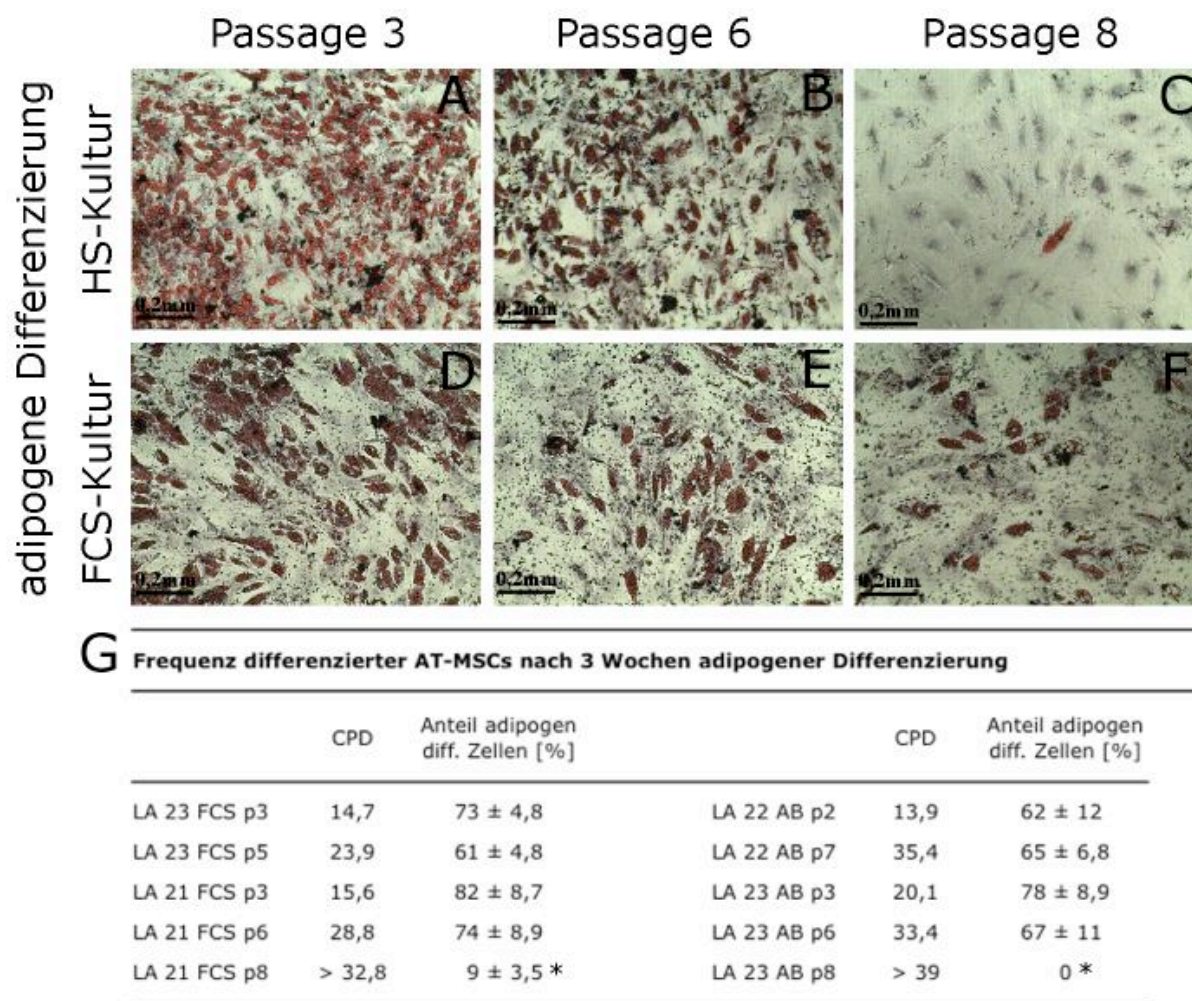
Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine Zunahme der Zellgröße und der Granularität der AT-MSCs in Langzeitkultur beobachtet werden konnte. Diese Veränderungen geschahen sowohl bei Verwendung von Medium mit HS- als auch mit FCS-Supplement. Die morphologischen Veränderungen traten parallel zu dem zunehmenden Verlust der Populationsverdopplungsrate auf.

### **2.2.3. Das adipogene Differenzierungspotential *in vitro* gealterter AT-MSCs**

Die bisherigen Ergebnissen verdeutlichen, dass die Langzeitkultur zu einem Verlust der Populationsverdopplungsrate und zu morphologischen Veränderungen führt. Deshalb sollte neben den schon festgestellten Veränderungen der Einfluss der Langzeitkultur auf die Differenzierungsfähigkeit der MSCs ermittelt werden. Dabei interessierte besonders, ob die Verwendung von HS- oder FCS-supplementiertem Medium sich unterschiedlich auf den Erhalt des Differenzierungspotentials auswirkt.

Dazu wurde das *in vitro* adipogene Differenzierungspotential von AT-MSCs zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Langzeitkultur bestimmt. Die adipogene Differenzierung wurde gewählt, da diese im Gegensatz zu osteogener und chondrogener Differenzierung die Quantifizierung durch Auszählung erlaubt. Es wurden AT-MSCs aus Kultur mit HS- oder FCS-supplementiertem Wachstumsmedium unterschiedlicher Passagen für drei Wochen unter adipogenen Bedingungen differenziert und anschließend mit Öl-Rot gefärbt. Die Färbungen wurden dann mikroskopisch ausgewertet und die Frequenz der differenzierten Zellen bestimmt.





**Abb. 6 Adipogenes Differenzierungspotential von AT-MSCs kultiviert in FCS- bzw. HS-supplementiertem Medium zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Langzeitkultivierung**

Abgebildet ist die adipogene Differenzierung von AT-MSCs aus HS-Kultur (A-C) und FCS-Kultur (D-F). Die adipogene Differenzierung wurde induziert nach Passage 2, 5 und 7. Zur Differenzierung wurden die AT-MSCs in drei unterschiedlichen 4-Kammer-Objekträgern ausgesät und die adipogene Differenzierung parallel induziert. Die Zellen wurden nach dreiwöchiger Differenzierung mit Öl-Rot angefärbt, mikroskopische Aufnahmen wurden erstellt und die Frequenz der positiven Zellen in den Differenzierungsansätzen bestimmt. In der Tabelle (G) ist die mittlere Anzahl der CPD zu Beginn der Differenzierung und die mittlere Frequenz mit Standardabweichung der Öl-Rot-positiven Zellen nach der Differenzierung angegeben. (n=2). Signifikant unterschiedliche Werte sind mit \* markiert ( $p < .05$ ).

Das adipogene Differenzierungspotential blieb bei den gewählten Kulturbedingungen über einen langen Zeitraum erhalten, während ein Rückgang des Differenzierungspotentials sich erst spät abzeichnete (Abb. 6). Sowohl AT-MSCs aus FCS- als auch aus HS-Kultur wiesen bis Passage 6/7 in hoher Frequenz differenzierte Zellen auf. Die Frequenzen, mit der die AT-MSCs nach Passage 2/3 (Abb. 6 A, D, G) und nach

Passage 6/7 (Abb. 6 B, E, G) adipogen differenzierten, lagen dabei zwischen 61 und 82 %. Sie waren für HS- und FCS-Kultur ähnlich hoch und nicht signifikant unterschiedlich ( bei  $p = .05$ ). AT-MSCs des Spenders LA 23, die als HS- bzw. FCS-Kultur wuchsen, unterschieden sich ebenfalls nicht signifikant in Passage 3 und Passage 5/6 (bei  $p = .05$ ). Ein signifikanter Rückgang des Differenzierungspotentials zeigte sich erst nach Induktion der adipogenen Differenzierung von Passage 8 AT-MSCs (LA 21 FCS p8 mit 9 %  $\pm 3,5$  und LA 23 HS p8 mit 0 %) (Abb. 6 C, F, G) .

Insgesamt blieb das adipogene Differenzierungspotential der AT-MSCs während der Expansion *in vitro* lange erhalten und AT-MSCs differenzierten in HS-Kultur in gleicher Frequenz adipogen wie AT-MSCs in FCS-Kultur. Anders als beim Rückgang der Populationsverdopplungsrate ging das adipogene Differenzierungspotential nicht stetig graduell, sondern erst gegen Ende, dann aber deutlich zurück.

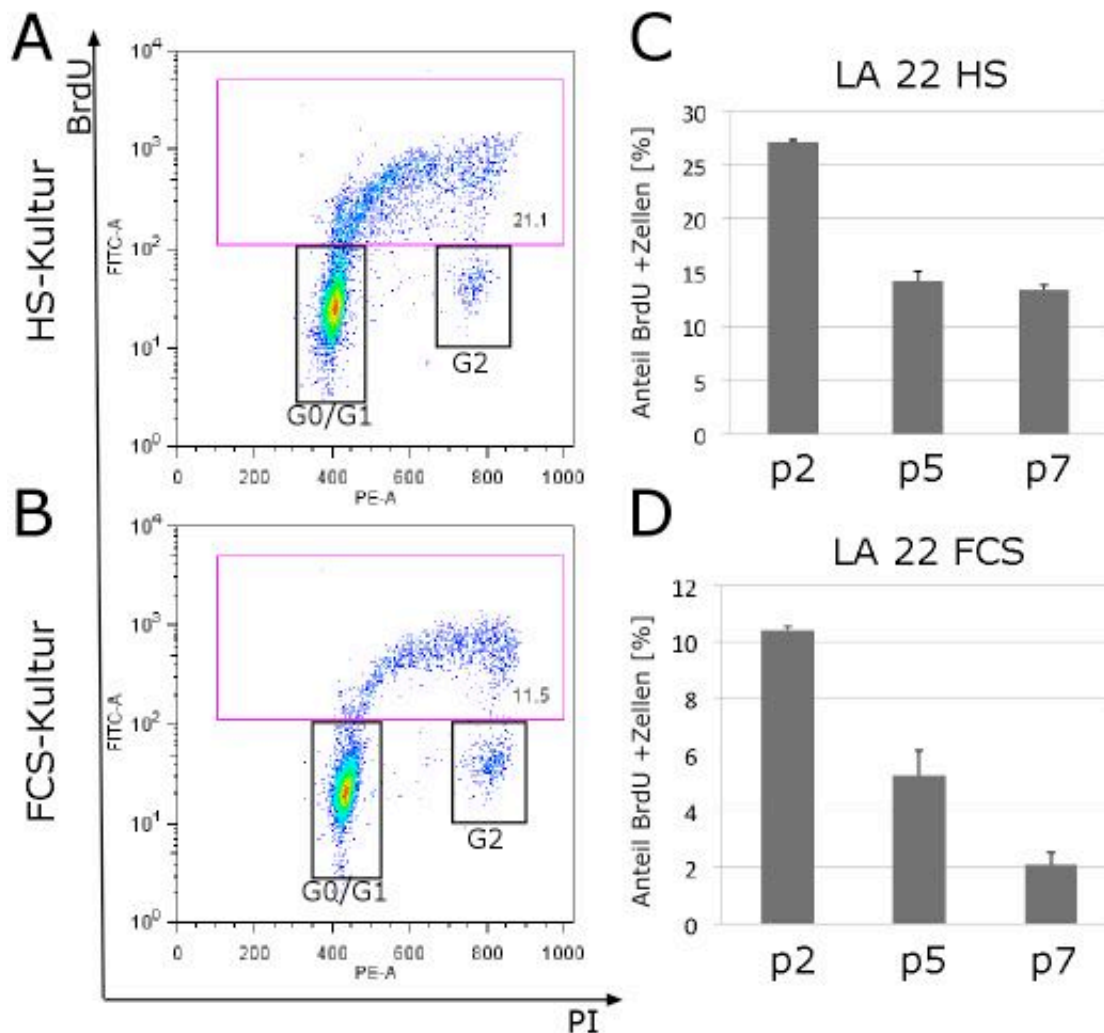
#### **2.2.4. BrdU-Inkorporation der AT-MSCs nach kurzer, mittlerer und langer Kultur in Medium mit HS- bzw. FCS-Supplement**

Durch die Bestimmung der CPD wurde mit zunehmender Kulturdauer ein Rückgang der Populationsverdopplungsrate, sowie Unterschiede in der Populationsverdopplungsrate zwischen AT-MSCs aus Kultur mit HS- oder FCS-supplementiertem Medium erkennbar. Zur genaueren Analyse des Rückgangs der Populationsverdopplungsrate und der Unterschiede zwischen HS- und FCS-Kultur wurden Puls-Markierungsexperimente mit dem Thymidinanalogon Bromdesoxyuridin (BrdU) durchgeführt.

Das Prinzip der BrdU-Pulsmarkierung als Nachweis für Proliferation beruht darauf, dass während der Inkubationszeit in allen neu synthetisierten DNA-Strängen BrdU eingebaut wird. Dieses kann mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Da die DNA-Neusynthese in der Regel nur zur Verdopplung des Chromosomensatzes vor der Teilung der Zellen auftritt, ist der Nachweis von Zellen mit neusynthetisierter DNA ein indirekter Nachweis proliferierender Zellen.

Zur Bestimmung des Anteils DNA-synthetisierender Zellen wurden AT-MSCs nach kurzer, mittlerer und langer Kulturdauer für acht Stunden in Medium mit BrdU kultiviert. Anschließend wurde das eingebaute BrdU mit einem Anti-BrdU-Antikörper detektiert und der Anteil BrdU-positiver Zellen durchflusszytometrisch bestimmt.

Zusätzlich wurden die Zellen mit Propidiumjodid (PI) gefärbt und nach Ausschluss der Zellaggregate gemessen. Die Auswertung der Messung ist in Abbildung 7 A und B zu sehen.



**Abb. 7 Untersuchung des BrdU-Einbaus während der Langzeitkultivierung von AT-MSCs in HS- und FCS-Kultur**

**A** und **B** geben die durchflusszytometrischen Analysen zur Bestimmung des Anteils BrdU-positiver Zellen zweier AT-MSC-Kulturen aus dem gleichen Spender wieder. Die AT-MSCs wurden in Medium mit HS- (**A**) oder FCS-Supplement (**B**) kultiviert. Nach Inkubation in BrdU-haltigem Medium wurden diejenigen Zellen, die BrdU eingebaut hatten, mittels Immunfluoreszenz detektiert. **C** und **D** zeigen die Zusammenfassung der Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analysen von p2-, p5- und p7-Kulturen als Diagramm. Die Werte repräsentieren Mittelwert und Standardabweichung zweier parallel angesetzter Experimente.

Die Ergebnisse aus den BrdU-Markierungsexperimenten machen deutlich, dass die Verwendung von HS-Supplement zu einem höheren Anteil DNA-synthetisierender Zellen führte als die Verwendung von FCS-Supplement (Abb. 7 C, D). So zeigten z.B. AT-

MSCs des Spenders LA 22 der Passage 2 in HS-Kultur mit  $30,2 \% \pm 3,96$  einen signifikant höheren Anteil BrdU-positiver Zellen als diejenigen in FCS-Kultur ( $10,7 \% \pm 0,14$ ) ( $p < .05$ ). Auch die Analyse nach mittlerer (Passage 4/5) und später Passagenzahl (Passage 6/7) erbrachte jeweils einen höheren Anteil BrdU-positiver Zellen bei Verwendung von HS- gegenüber FCS-Supplement (LA 22 HS Passage 4  $19,4 \% \pm 0,8$  / LA 22 FCS Passage 5  $5,25 \% \pm 0,57$ ; LA 22 HS Passage 6  $16,5 \% \pm 1,27$  / LA 22 FCS Passage 7  $2,1 \% \pm 0,03$ ). Die gleiche Beobachtung konnte auch für AT-MSCs des Spenders LA 23 gemacht werden (Tab. 1).

Insgesamt waren in den drei HS-Kulturen in frühen Passagen im Schnitt  $36,7 \% \pm 5,39$  ( $n=6$ ), in mittleren Passagen  $29,7 \% \pm 10,06$  ( $n=6$ ) und in späten Passagen  $8,9 \% \pm 5,91$  ( $n=6$ ) der Zellen BrdU-positiv. In FCS-Kultur waren in frühen Passagen  $8,8 \% \pm 5,32$  ( $n=4$ ), in mittleren  $7,7 \pm 6,23$  ( $n=6$ ) und in späten Passagen  $2,6 \% \pm 0,62$  ( $n=6$ ) BrdU-positiv. Allerdings ergaben sich große individuelle Unterschiede zwischen den verschiedenen AT-MSCs (Tab. 1). Dennoch war der Anteil BrdU-positiver Zellen in frühen und mittleren HS-Kulturen signifikant höher als in der späten HS-Kultur und der FCS-Kultur ( $p < .05$ ).

**Tab. 1** Zusammenfassung der Daten der BrdU-Puls Markierungsexperimente

| HS-Kultur               | LA 22 HS           |                    |                     | LA 23 HS           |                     |                    | LA 27 HS           |                    |                     |
|-------------------------|--------------------|--------------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| Kulturdauer [Passage]   | p2                 | p4                 | p6                  | p1                 | p4                  | p6                 | p2                 | p4                 | p6                  |
| Anteil BrdU+ Zellen [%] | 30,2<br>$\pm 3,96$ | 19,5<br>$\pm 0,85$ | 16,5*<br>$\pm 1,27$ | 40<br>$\pm 1,55$   | 41,5*<br>$\pm 0,57$ | 5,9<br>$\pm 0,85$  | 39,9<br>$\pm 0,50$ | 26,5<br>$\pm 0,36$ | 4,5<br>$\pm 0,24$   |
| FCS-Kultur              | LA 21 FCS          |                    |                     | LA 22 FCS          |                     |                    | LA 23 FCS          |                    |                     |
| Kulturdauer [Passage]   | p2                 | p5                 | p7                  | p2                 | p5                  | p8                 | p2                 | p3                 | p6                  |
| Anteil BrdU+ Zellen [%] | k.D.               | 15,7<br>$\pm 0,4$  | 3,1<br>$\pm 0,5$    | 13,4<br>$\pm 0,13$ | 4,6<br>$\pm 0,91$   | 2,1*<br>$\pm 0,42$ | 4,1<br>$\pm 0,25$  | 2,8*<br>$\pm 0,23$ | 2,24*<br>$\pm 0,27$ |

Tabelle 1 gibt den Anteil BrdU-positiver Zellen (BrdU+) nach acht Stunden BrdU-Puls für alle untersuchten AT-MSC-Kulturen wieder. Untersucht wurde der BrdU-Einbau von AT-MSCs in frühen, mittleren und späten Passagen. Die Resultate von je drei HS-Kulturen (**oben**) bzw. FCS-Kulturen (**unten**) sind aufgelistet. Jeder dargestellte Wert repräsentiert Mittelwert und Standardabweichung zweier parallel angesetzter Experimente. Die Unterschiede zwischen frühen und mittleren und mittleren und späteren Passagen waren signifikant mit Ausnahme der mit \* markierten Werte ( $p < .05$ ).

Auffällig war auch, dass der Anteil BrdU-positiver AT-MSCs mit zunehmender Passagenzahl abnahm. So war der Anteil BrdU-positiver Zellen in frühen Passagen signifikant höher als in späten (Tab. 1). Darüber hinaus lag der Anteil BrdU-positiver Zellen in den mittleren Passagen meist zwischen dem der frühen und dem der späten Passagen. Dieser graduelle Verlust konnte für vier der Kulturen festgestellt werden. Statistische Analysen zeigten jedoch, dass die Unterschiede zwischen mittlerer und früher bzw. zwischen mittlerer und später Passage nicht in jedem Fall signifikant waren.

HS-Kultur führte also zu einem höheren Anteil DNA-synthetisierender Zellen als die Vergleichskulturen in Medium mit FCS-Supplement. Analog zur Populationsverdopplungsrate sank jedoch auch hier der Anteil DNA-synthetisierender Zellen im Laufe der Kultivierung.

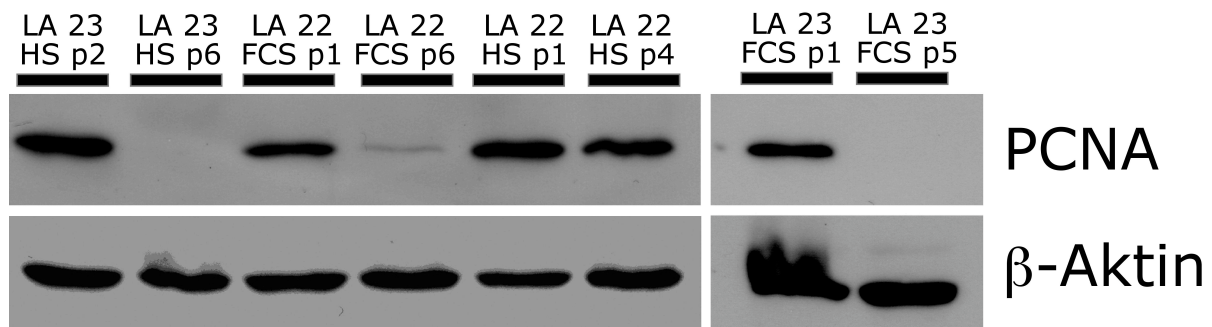
#### ***2.2.5. Proteinexpression des Proliferating Cell Nuclear Antigen in kurz- und langzeitkultivierten AT-MSCs***

Zur weiteren Analyse der auftretenden Veränderung im Proliferationsvermögen von AT-MSCs während der Langzeitkultur wurde die Proteinexpression des Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) von frühen und späten Passagen in AT-MSCs untersucht.

PCNA ist ein Hilfsprotein für die DNA-Polymerase  $\delta$ . Es wirkt bei der DNA-Replikation als Prozessivitätsfaktor für die DNA-Polymerase (Moldovan et al., 2007), hat jedoch auch eine wichtige Bedeutung bei der Reparatur von DNA-Schäden. Die Expression von PCNA beginnt in der späten G1-Phase und erreicht in der S-Phase ihr Maximum. Deshalb eignet sich PCNA als Proliferationsmarker. Da proliferierende Zellpopulationen einen hohen Anteil an Zellen in der S-Phase aufweisen, wird PCNA in solchen Populationen stark exprimiert. Darüber hinaus ist das PCNA-Protein in seneszenten Zellen weniger stark exprimiert (Nishio et al., 2001).

Zur Analyse der Expression des PCNA-Proteins wurden kryokonservierte Proben von vier kultivierten AT-MSC-Präparationen aufgetaut und für eine Woche kultiviert. Jeweils  $2 \times 10^5$  Zellen wurden dann lysiert, durch SDS-Page aufgetrennt und mittels

Western Blot analysiert. Die Proteinbeladung des Gels wurde anhand der Expression von  $\beta$ -Aktin überprüft. Zur Detektion des PCNA-Proteins wurde ein Anti-PCNA-Antikörper verwendet.



**Abb. 8 Einfluss der Serumwahl und der Kulturdauer auf die Expression des Proliferationsmarkers PCNA in AT-MSCs**

Dargestellt ist die Western Blot Analyse der Expression des PCNA-Proteins in AT-MSCs nach unterschiedlicher Kulturdauer. LA 23 HS und LA 22 HS wurden in HS-Medium kultiviert, während LA 22 FCS und LA 23 FCS in FCS-Medium expandiert wurden. Die Zellysate wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und mittels Anti-PCNA-Antikörper (Progen) getestet. Als Ladekontrolle wurde die Menge an humanem  $\beta$ -Aktin im Zellysat verwendet.

In LA 23 HS, LA 23 FCS und LA 22 FCS wurde das PCNA-Protein in frühen Passagen (1 und 2) exprimiert, die Expression war jedoch in späteren Passagen (5 und 6) reduziert oder sogar gar nicht mehr nachweisbar (Abb. 8). Die AT-MSC-Kultur LA 22 HS unterschied sich nicht in der Expression von PCNA in Passage 1 und 4.

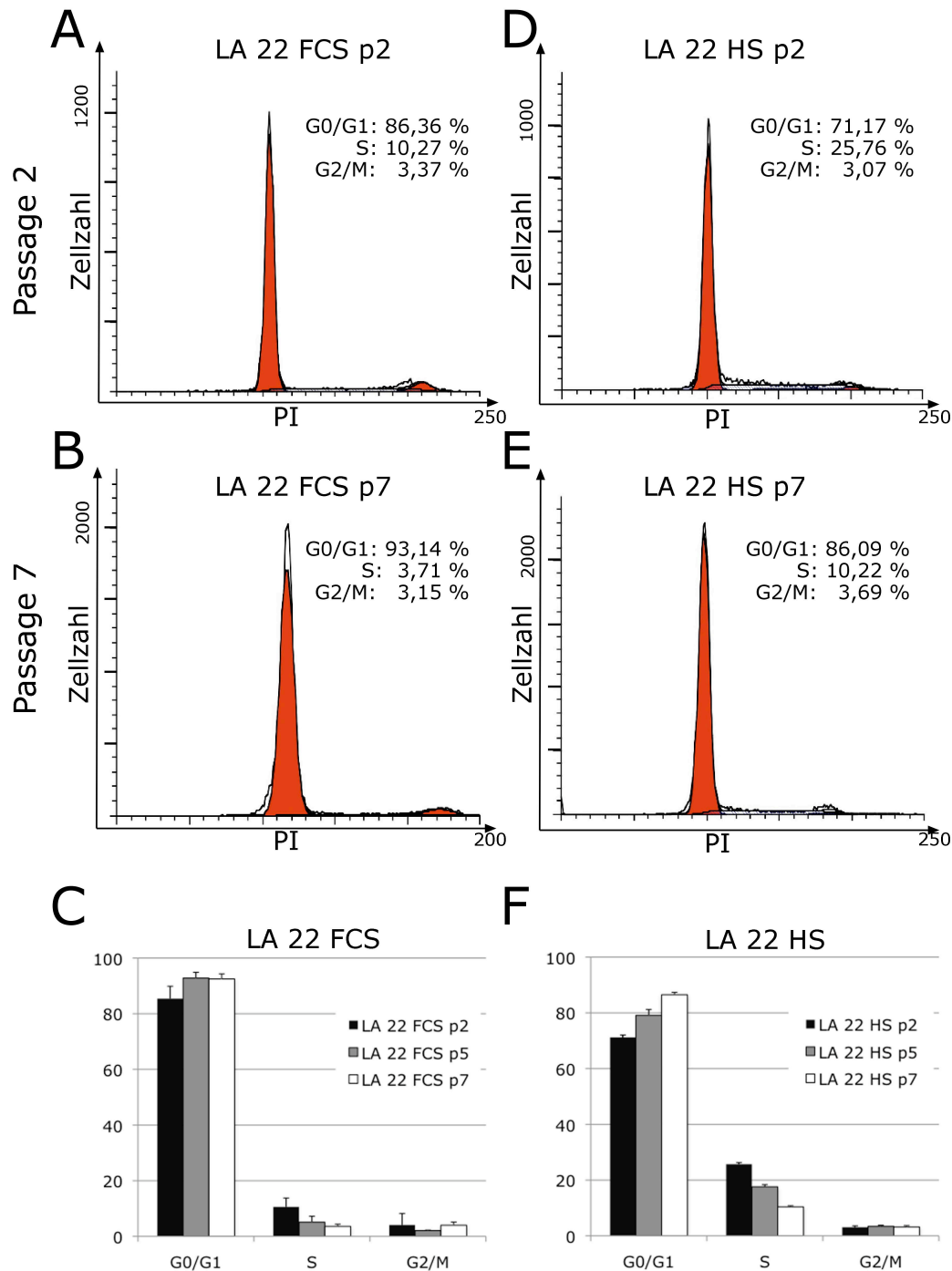
### **2.2.6. Zellzyklusverteilung während der Langzeitkultur mit HS- oder FCS-Supplement**

Die Ergebnisse der BrdU-Inkorporationsanalyse verdeutlichten bereits Unterschiede im Anteil DNA-synthetisierender Zellen zwischen frühen und späten Passagen und zwischen HS- und FCS-Kultur. Durch die BrdU-Inkorporationsanalyse konnte der Anteil der Zellen bestimmt werden, die während des Inkubationszeitraumes die S-Phase durchlaufen hatten, also teilungsfähig waren. Keine Aussage konnte dagegen über die Verteilung der Zellen auf die unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus getroffen werden. Die Analyse der BrdU-Inkorporation ermöglichte auch keinerlei Aussagen über

den Teil der Zellen, die keine Teilungsfähigkeit zeigten. Um genauer zu analysieren, wie sich Langzeitkultur und Serumwahl auf den Zellzyklus auswirken, wurde daher die Verteilung der Zellen auf die Phasen des Zellzyklus bestimmt. Dazu wurden AT-MSCs nach kurzer, mittlerer und langer *in vitro* Kultur mit PI gefärbt und die PI-Fluoreszenz durchflusszytometrisch gemessen. Die bei der Fixierung entstandenen Zellaggregate wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen und anhand der PI-Fluoreszenz der übrigen Zellen mittels Softwareanalyse die Zellzyklusverteilung der AT-MSCs berechnet. Die Ergebnisse einer solchen Analyse sind in Abbildung 9 beispielhaft wiedergegeben (Abb. 9 A, B, D, und E).

Der Vergleich der Zellzyklusverteilung von AT-MSCs aus HS- und FCS-Kultur ergab einen deutlich höheren Anteil von Zellen in der S-Phase für die AT-MSCs aus HS-Kultur. In LA 22 und LA 23 waren nach kurzer Kulturdauer (Passage 1/2) mit HS-Supplement 25,7 % (LA 22 HS Passage 2) bzw. 43 % (LA 23 HS Passage 1) der Zellen in der S-Phase, während nach Kurzzeitkultur mit FCS-Supplement nur 10,5 % (LA 22 FCS Passage 2) bzw. 3,1 % (LA 23 FCS Passage 2) in der S-Phase waren. Auch in mittleren (Passage 4/5) Passagen war der Anteil von Zellen in der S-Phase bei Verwendung von HS deutlich höher als in den entsprechenden Kulturen, die in FCS-supplementiertem Medium wuchsen (Tab. 2, Abb. 9 C, F).

Die Ergebnisse der Zellzyklusanalyse machten darüber hinaus deutliche Veränderungen in der Verteilung der Zellen auf die Phasen des Zellzyklus im Laufe der Kultivierung sichtbar. In frühen Passagen war der Anteil der Zellen in der S-Phase für die HS-Kulturen und LA 22 FCS am höchsten und deutlich höher als in späten Passagen. Dieser Unterschied war für alle HS-Kulturen und die FCS-Kultur LA 22 FCS statistisch signifikant ( $p < .05$ ). Die FCS-Kulturen LA 23 FCS und LA 21 FCS hatten in den mittleren Passagen einen signifikant höheren Anteil an S-Phase-Zellen als in späten Passagen. Dieser beobachtete Rückgang des Anteils der Zellen in der S-Phase im Laufe der Kultur ging einher mit der signifikanten Zunahme des Anteils der Zellen in der G0/G1-Phase in späten Passagen ( $p > .05$ ) (Tab. 2).



**Abb.9** Analyse der Zellzyklusverteilung früher, mittlerer und später Passagen von AT-MSCs.

Die Abbildung stellt typische Ergebnisse der Zellzyklusanalyse mit Propidiumjodid (PI) von AT-MSCs aus HS- und FCS-Kultur dar. Die PI-Fluoreszenz wurde durchflusszytometrisch gemessen. Die Verteilung der Zellen auf die Phasen des Zellzyklus wurde durch Softwareanalyse bestimmt (modfit, Verity Software House). Repräsentative Einzelergebnisse der Zellzyklusanalyse mit PI von LA 22 FCS in Passage 2 (A) und 7 (B) sowie von LA 22 HS der Passage 2 (D) und 5 (E) sind als Histogramme dargestellt. Die Diagramme darunter zeigen die mittlere Zellzyklusverteilung von LA 22 HS (C) und LA 22 FCS (F) nach niedriger, mittlerer und hoher Passagenzahl. Die Werte repräsentieren Mittelwert und Standardabweichung (n=3).



**Tab. 2** Zusammenfassung der Daten der Zellzyklusanalyse

| MSC-Kultur | Kulturdauer [Passage] | Anteil der Zellen in: |  |           |
|------------|-----------------------|-----------------------|--|-----------|
|            |                       | G0/G1 [%]             | S [%]  | G2/M [%]  |
|            | <b>p2</b>             | k.D.                  | k.D.   | k.D.      |
| LA 21 FCS  | <b>p5</b>             | 73,4 ±4,14            | 20,8 ±3,35   | 6,1 ±4,69 |
|            | <b>p7</b>             | 91,2 ±0,88 *          | 2,6 ±1,39 *  | 6,3 ±1,62 |
|            | <b>p2</b>             | 85,4 ±4,47            | * $\left\{ \begin{array}{l} 10,6 \pm 3,18 \\ 5,1 \pm 2,15 \\ 3,6 \pm 0,78 \end{array} \right.$       | 4,1 ±1,31 |
| LA 22 FCS  | <b>p5</b>             | 92,8 ±2,06            |  | 2,1 ±0,15 |
|            | <b>p7</b>             | 92,5 ±1,81            |  | 4,0 ±1,13 |
| LA 23 FCS  | <b>p2</b>             | 91,3 ±2,95            | * $\left\{ \begin{array}{l} 4,0 \pm 1,94 \\ 10,4 \pm 2,26 * \\ 3,1 \pm 0,58 * \end{array} \right.$   | 4,7 ±1,34 |
|            | <b>p5</b>             | * 84,3 ±8,42 *        |  | 5,3 ±6,27 |
|            | <b>p7</b>             | 89,4 ±0,87 *          |  | 7,5 ±0,98 |
| LA 22 HS   | <b>p2</b>             | 71,2 ±0,87            | * $\left\{ \begin{array}{l} 25,7 \pm 0,57 \\ 17,6 \pm 0,76 * \\ 10,4 \pm 0,41 * \end{array} \right.$ | 3,1 ±0,49 |
|            | <b>p5</b>             | * 79,1 ±0,65          |  | 3,4 ±0,43 |
|            | <b>p7</b>             | 86,5 ±0,83            |  | 3,2 ±0,47 |
| LA 23 HS   | <b>p1</b>             | 48,4 ±1,47            | * $\left\{ \begin{array}{l} 43,0 \pm 0,53 \\ 24,8 \pm 1,51 * \\ 1,7 \pm 0,31 * \end{array} \right.$  | 8,5 ±1,36 |
|            | <b>p4</b>             | * 71,8 ±2,08 *        |  | 3,4 ±0,63 |
|            | <b>p6</b>             | 94,4 ±1,75 *          |  | 4,6 ±2,96 |
| LA 27 HS   | <b>p2</b>             | 56,9 ±6,45            | * $\left\{ \begin{array}{l} 40,3 \pm 5,75 \\ 19,9 \pm 1,26 * \\ 5,8 \pm 1,07 * \end{array} \right.$  | 2,8 ±1,45 |
|            | <b>p4</b>             | * 76,8 ±1,50 *        |  | 3,3 ±0,47 |
|            | <b>p7</b>             | 88,9 ±0,89 *          |  | 6,5 ±2,57 |

Analysiert wurden jeweils kurz- (p1, p2), mittel- (p4, p5) und langzeitkultivierte (p6, p7) AT-MSCs. Mittelwert und Standardabweichung für die G0/G1-, G2/M- und S-Phase sind angegeben. Die Werte im oberen Tabellenteil stammen aus Analysen von AT-MSCs aus FCS-Kultur, während im unteren Tabellenteil die Resultate von AT-MSCs aus HS-Kultur wiedergegeben sind. Signifikanz der G0/G1- und S-Phase-Werte wurde über einfaktorielle Multivarianzanalyse (ANOVA) getestet. Signifikante Unterschiede ( $p > .05$ ) sind durch \* angezeigt.  $n \geq 3$

Insgesamt ergaben die Resultate der Zellzyklusmessung eine Akkumulation der Zellen in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase und eine Abnahme des Anteils der S-Phase-Zellen. HS-Kultur führte zu einem höheren Anteil an S-Phase-Zellen.

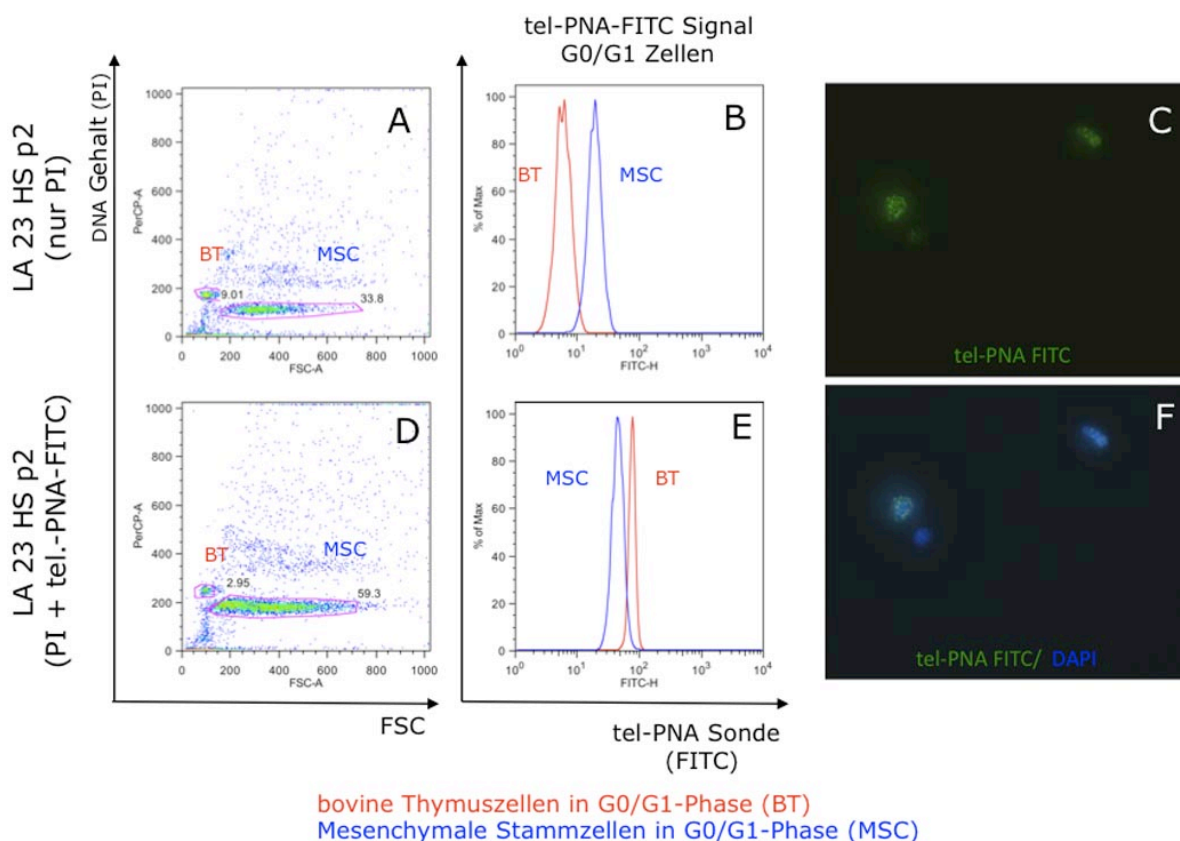
Eine weitere Beobachtung war, dass bei keiner Messung Hinweise auf eine Aneuploidie gefunden wurden. Die Zellen behielten also über den ganzen Kulturzeitraum ihren diploiden Chromosomensatz.

### **2.2.7. Telomerlänge in kurz-, mittel- und langzeitkultivierten AT-MSCs**

Die Länge der Telomere ist ein wichtiges Kriterium zur Bestimmung des replikativen Alters einer Zellkultur. Während der Replikation kommt es bei fehlender Aktivität des Enzyms Telomerase zu einer fortschreitenden Verkürzung der Telomere. Diese Telomerverkürzung ist einer der Faktoren, die für die Ausbildung eines seneszenten Phänotyps verantwortlich sind und damit zu einem irreversiblen Wachstumsstopp führen (Allsopp et al., 1992).

Um eine mögliche Telomerverkürzung während der Langzeitkultur zu untersuchen und um zu klären, ob dies eine mögliche Ursache für den beobachteten Verlust der Proliferationsfähigkeit ist, wurde die Telomerlänge der AT-MSCs bestimmt.

Dazu wurde bei den AT-MSCs eine Flow FisH-Analyse durchgeführt. Die Telomerlänge wurde durchflusszytometrisch relativ zur Telomerlänge boviner Thymuszellen (BTs) bestimmt. Die AT-MSCs wurden nach kurzer, mittlerer und langer Expansion kryokonserviert und zu einem späteren Zeitpunkt nach dem Auftauen zusammen mit BTs mit einer Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markierten telomerspezifischen Peptid-Nukleinsäuresonde (tel-PNA-FITC) hybridisiert (Abb. 10 C, F). Zusätzlich wurden die Zellen mit PI gefärbt, um diejenigen Zellen zu identifizieren, die einen einfachen Chromosomensatz tragen (Abb. 10 A, D). Die Beschränkung auf Zellen mit einfachem Chromosomensatz (G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase) stellte sicher, dass nur die einfache Telomerlänge gemessen wurde und die Messungen zwischen unterschiedlich stark proliferierenden Zellen vergleichbar waren.



### Abb. 10 Telomerlängenmessung mittels Flow-FisH.

Die Abbildungsteile A, B, D und E geben eine typische Auswertung einer Flow-FisH Messung von MSCs und bovinen Thymuszellen (BT) wieder. Das Punktwolkendiagramm A ist das Ergebnis der Messung der Fluoreszenzintensität des PI-Signals gegen die Zellgröße (FSC) einer nur mit PI gefärbten Kontrolle. Darunter dargestellt ist das Ergebnis der Messung einer Probe, die zusätzlich mit einer telomerspezifischen Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markierten PNA-Sonde (tel-PNA-FITC) hybridisiert wurde (B). Die umgrenzten Bereiche markieren G0/G1-Phase-MSCs und -BTs. Die Fluoreszenz-intensität im FITC-Kanal für die umgrenzten Zellen ist jeweils daneben in Histogrammform dargestellt (D, E). Die Kontrolle der Lokalisierung des telomerspezifischen Signals nach einer Flow-FisH Reaktion mittels Fluoreszenzmikroskopie ist in den Abbildungsteilen C und F wiedergegeben. In C ist nur die telomerspezifische Fluoreszenz (grün) sichtbar. F zeigt die Überlagerung des telomerspezifischen Signals mit den DAPI-gefärbten Zellkernen (blau).

Die mittlere Fluoreszenzintensität der G0/G1-Phase-MSCs und -BTs im FITC-Kanal wurde durchflusszytometrisch gemessen (Abb. 10 B, E). Zur Auswertung wurde die Fluoreszenzintensität der Zellen ohne Sonde (nur PI) von derjenigen der hybridisierten Zellen (tel-FITC) abgezogen. Die Berechnung der relativen Telomerlänge (RTL) erfolgte

nach der Formel: 
$$RTL = \frac{BT_{telFITC} - BT_{nurPI}}{MSC_{telFITC} - MSC_{nurPI}}$$

Vorexperimente hatten gezeigt, dass bei der Alterung von MSCs auch die Autofluoreszenz der Zellen zunahm. Dies führte dazu, dass bei der Auswertung der Flow FisH eine ungewöhnlich hohe Fluoreszenzintensitäten in späten Passagen gemessen wurden. Diese konnten nach Abzug der nur PI-gefärbten Zellen nicht ausgeglichen werden. Daher wurden die folgenden Messungen nach dem Protokoll von Wieser et al. an isolierten Zellkernen durchgeführt (Wieser et al., 2006). Auf diese Weise waren die Resultate vergleichbar, da die Autofluoreszenzen der Zellen ähnlich waren.

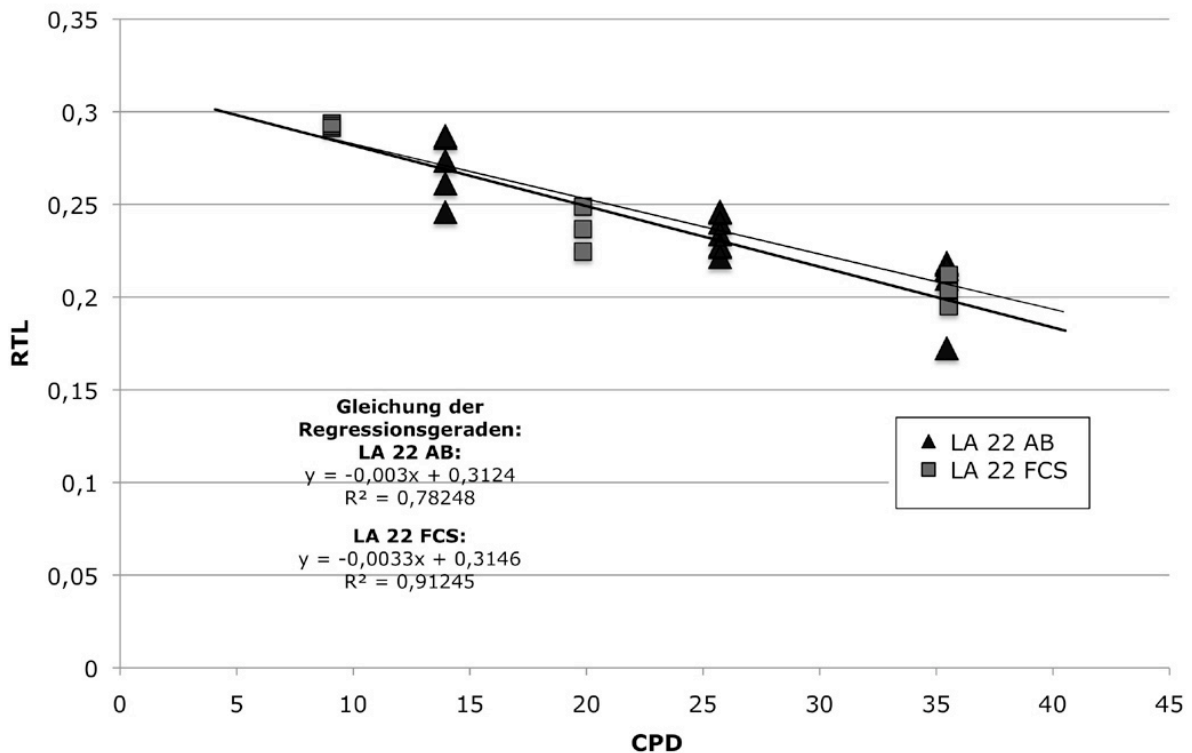
**Tab. 3** Zusammenfassung der Daten der Telomerlängenbestimmung

| HS-Kultur                   |  | LA 22 HS        |                 |                 | LA 23 HS        |                 |                 | LA 27 HS        |                 |                 |
|-----------------------------|--|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Kulturdauer in Passagen     |  | p2              | p4              | p6              | p2              | p5              | p7              | p1              | p4              | p6              |
| CPD                         |  | 13,9            | 31,4            | 35,4            | 13,7            | 26,9            | 38,1            | 14,4            | 26,9            | 32,5            |
| relative Telomerlänge [RTL] |  | 0,286<br>±0,027 | 0,235<br>±0,008 | 0,216<br>±0,017 | 0,301<br>±0,02  | 0,249<br>±0,015 | 0,219<br>±0,022 | 0,267<br>±0,004 | 0,221<br>±0,009 | 0,209<br>±0,017 |
| FCS-Kultur                  |  | LA 21 FCS       |                 |                 | LA 22 FCS       |                 |                 | LA 23 FCS       |                 |                 |
| Kulturdauer in Passagen     |  | p2              | p4              | p6              | p2              | p5              | p7              | p2              | p4              | p6              |
| CPD                         |  | 10,1            | 21,1            | 28,8            | 9,1             | 19,8            | 35,5            | 10,1            | 19,6            | 26,7            |
| relative Telomerlänge [RTL] |  | 0,327<br>±0,021 | 0,257<br>±0,013 | 0,229<br>±0,004 | 0,293<br>±0,004 | 0,237<br>±0,008 | 0,204<br>±0,006 | 0,239<br>±0,015 | 0,215<br>±0,001 | 0,191<br>±0,004 |

Aufgeführt ist die Kulturdauer in Passagen, die CPD sowie Mittelwert und Standardabweichung der relativen Telomerlänge (RTL). Die Mittelwerte wurden jeweils aus mindestens vier Einzelwerten aus zwei unabhängigen Messungen gebildet. Im oberen Teil sind die Ergebnisse der Messung von AT-MSCs aus HS-Kultur dargestellt. Der untere Teil gibt die Ergebnisse für AT-MSCs mit konventionellem FCS-haltigem Medium wieder. Alle RTL in mittleren und späten Passagen zeigen einen signifikanten Rückgang gegenüber den RTL in frühen Passagen ( $p < .01$ )

Die Flow FisH Messungen zeigten deutlich einen Verlust der RTL beim Vergleich kurzzeitkultivierter mit mittel- und langzeitkultivierten AT-MSCs. Dieser Verlust an Telomerlänge konnte sowohl für in HS- als auch in FCS-Medium kultivierte AT-MSCs festgestellt werden und war signifikant ( $p < .01$ ; Tab. 3). Dabei erreichte die telomerspezifische Fluoreszenz der AT-MSCs ca. 19-33 % der Signalstärke der BTs, also 19-33 % der Telomerlänge von BTs.

Die niedrigste RTL in frühen Passagen wurde für die Kultur LA 23 FCS bestimmt. Sie war nach 10,1 CPD deutlich niedriger als die HS-Kultur des gleichen Spenders nach 13,5 CPD (vgl. Tab. 3).



**Abb. 11 Bestimmung des Rückgangs der RTL während der Langzeitkultur durch Regressionsanalyse**

Der Graph zeigt exemplarisch die Auswertung der Flow FisH-Messung zweier MSC-Kulturen eines identischen Spenders kultiviert in Medium mit HS- oder FCS-Supplement. Aufgetragen ist die RTL gegen die Anzahl der CPD der Zellen zum Zeitpunkt der Messung. Die Gleichung der Regressionsgeraden sowie deren Korrelationskoeffizient sind angegeben. Die Steigung der Geraden gibt den durchschnittlichen Telomerverlust pro Populationsverdopplung an.

Die Regressionsanalyse erbrachte einen durchschnittlichen Verlust des Telomersignals von ca. 0,33 % ( $\pm 0,007$ ) für HS- und von 0,39 % ( $\pm 0,0101$ ) für FCS-Kulturen pro Populationsverdopplung. Der Verlust war nicht signifikant unterschiedlich für die HS- und die FCS-Kulturen ( $p < .01$ ). Außerdem korrelierte die gemessene RTL gut mit der CPD zum Zeitpunkt der Messung (Abb. 11).

Der Vergleich des Telomerverlustes der aus dem jeweils gleichen Spender stammenden AT-MSCs LA 22 und LA 23 in HS- und FCS-Kultur offenbarte ebenfalls

---

keine deutlichen Unterschiede im Telomerverlust pro Populationsverdopplung (LA 22 FCS 0,33 %; LA 22 HS 0,31 % Abb. 8; LA 23 FCS 0,33 % und LA 23 HS 0,38 %).

Insgesamt trat während der Kultivierung ein Verlust der Telomeren auf. Dieser durchschnittliche Telomerverlust unterschied sich nicht für AT-MSCs aus FCS- und HS-Kultur. Die CPD und die gemessene RTL korrelierten gut, so dass der zu erwartende Zusammenhang zwischen Replikation und Telomerverlust in den Messungen deutlich wurde.

### **2.3. Besiedlung muriner E16.5 Embryonen nach Mikroinjektion von MSCs aus BM, AT und CB in murine Blastozysten**

In Kapitel 2.2 wurden die Auswirkungen der *in vitro* Kultur von AT-MSCs auch unter dem Aspekt der Verwendung von HS als Mediumsupplement untersucht. Da die *in vitro* Kultur bei vielen potentiellen Ansätzen zur klinischen Verwendung der MSCs unvermeidbar ist, sind mögliche Veränderungen der MSCs während der *in vitro* Kultur von Relevanz für klinische Fragestellungen.

Ein anderer klinisch relevanter Aspekt, der im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, ist das erweiterte Differenzierungspotential der MSCs.

MSCs aus verschiedenen Ursprungsgeweben zeigen – wie in der vorliegenden Arbeit, aber auch von anderen festgestellt wurde - ein unterschiedliches Differenzierungspotential (Abb. 3 und Kern et al. 2006a).

Es ist somit nicht klar, in wie weit es sich bei MSCs der verschiedenen Ursprungstypen um funktionell gleiche oder unterschiedliche Zellpräparationen handelt. In dieser Arbeit wurden deshalb MSCs auf funktionelle Unterschiede *in vivo* getestet.

Zielsetzung der experimentellen Ansätze in der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung verschiedener MSC-Präparationen aus BM, AT und CB anhand ihrer Donorkontribution im murinen Embryo.

Um das Differenzierungspotential von humanen MSCs zu untersuchen, wurde die Injektion von MSCs in murine Präimplantations-Blastozysten als *in vivo* Testsystem angewandt. Humane MSCs wurden dafür in das Blastocoel muriner Blastozysten (E 3.5)

injiziert. Die injizierten Blastozysten wurden zur weiteren Embryonalentwicklung in Ammenmäuse retransferiert. Die sich aus den injizierten Blastozysten entwickelnden Embryonen wurden am Tag 16 der Embryonalentwicklung aus dem Uterus der Ammentiere entfernt. Zur weiteren Analyse wurden jeweils mindestens zehn verschiedene embryonale Gewebe isoliert und die genomische DNA (gDNA) extrahiert. Die gDNA wurde mittels humanspezifischer quantitativer Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion (quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR) auf humanen DNA-Anteil untersucht. Als Zielsequenzen für die humanspezifische PCR-Reaktion wurden der humane  $\beta$ -Globin-Locus (hu- $\beta$ -Glob) und eine hoch repetitive Sequenz in der Zentromer-Region des humanen Chromosoms 17 ( $17\alpha$ mod) (Warburton et al., 1991; Becker et al., 2002) ausgewählt. Zur Normalisierung der Signalstärke wurde eine murine Myogenin-PCR durchgeführt. Die Produktzunahme der hu- $\beta$ -Glob-PCR wurde durch SYBR-Green detektiert, während die Amplifikation der  $17\alpha$ mod-Sequenz durch Hydrolyse einer Taqman-Sonde festgestellt wurde. Die Quantifikation des humanen DNA-Anteils erfolgte über die DeltaDelta-CT-( $\Delta\Delta$ -CT-)Methode relativ zu einer Standard-DNA mit 0,2 % humanem und 99,8 % murinem Anteil. Da Vorexperimente gezeigt hatten, dass beide verwendeten PCR-Verfahren zuverlässig mindestens 0,01 % humane DNA in muriner DNA nachweisen konnten, wurde dieser Wert als Schwellenwert festgesetzt. Signale wurden folglich als positiv gewertet, wenn diese mindestens 0,01 % humanem DNA-Anteil entsprachen und dieser Wert in drei unabhängigen PCRs erreicht wurde.

### ***2.3.1. Donorkontribution in E16.5 Embryonen nach Injektion von BM-MSCs***

Vor der Blastozysteninjektion wurden kryokonservierte BM-MSCs der Passage 1 aufgetaut und für ca. drei Wochen kultiviert. Am Tag der Injektion wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst und 5 bis 10 BM-MSCs pro Blastozyste injiziert. Die sich aus den injizierten Blastozysten entwickelnden Embryonen wurden zum Zeitpunkt E16.5 auf humane Donorkontribution in verschiedenen Organen getestet. Dazu wurde die gDNA von zehn embryonalen Geweben auf humane Anteile analysiert (Kopf ohne Gehirn, Gehirn, Leber, Lunge, Darm, Herz, Muskel, Niere, Brustkorb und restlicher Embryo).

**Tab. 4** Verteilung von humanen Donoranteilen in murinen E16.5 Embryonen nach Injektion von humanen BM-MSCs

| Embryo | Kopf | Gehirn | Leber | Lunge | Darm | Herz  | Blut | Muskel | Niere | Brustkorb | Rest Embryo |
|--------|------|--------|-------|-------|------|-------|------|--------|-------|-----------|-------------|
| 1      | -    | -      | -     | -     | -    | 0,06% | -    | -      | -     | -         | -           |
| 2      | -    | -      | -     | -     | -    | -     | -    | -      | -     | -         | 0,02%       |
| 3      | -    | -      | -     | -     | -    | -     | -    | -      | -     | -         | -           |
| 4      | -    | -      | -     | -     | -    | -     | -    | -      | -     | -         | -           |
| 5      | -    | -      | -     | -     | -    | 0,02% | -    | 0,07%  | -     | -         | -           |
| 6      | -    | -      | -     | -     | -    | -     | -    | -      | -     | 0,02%     | -           |
| 7      | -    | -      | -     | -     | -    | -     | -    | -      | -     | -         | -           |
|        | 0/7  | 0/7    | 0/7   | 0/7   | 0/7  | 2/7   | 0/7  | 1/7    | 0/7   | 1/7       | 1/7         |

Dargestellt sind die Resultate der donorspezifischen PCR-Analyse von murinen E16.5 Embryonen aus Mikroinjektion humaner drei Wochen kultivierter BM-MSCs in murine E3.5 Blastozysten. Analysiert wurde die Verteilung der Donorsignale in den murinen Embryonen sowie die Höhe des Donoranteils. Humane Donoranteile in der gDNA der embryonalen Gewebe wurden über PCR-Nachweis der humanen  $\beta$ -Globin Sequenz (hu- $\beta$ -Glob) und über den Nachweis einer spezifischen Sequenz im humanen Chromosom 17 (17 $\alpha$ mod) detektiert. Die Quantifizierung der Donorsignale erfolgte über die  $\Delta\Delta$ -CT-Methode relativ zu einer Kontrolle, die 0,2 % humane und 99,8 % murine DNA enthielt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte drei quantitativer real-time PCRs (qPCRs). Signale wurden als positiv gewertet ab einer Signalstärke von mindestens 0,01 %. (Positive Signale  $\geq$  0,01 % und n=3; nicht positiv getestete Gewebe sind mit (-) markiert.)

Die Untersuchungen wiesen humane Donorkontributionen in Herz (2/7), Muskeln (1/7), Brustkorb (1/7), und in der Mischung übriger embryonaler Gewebe (1/7) nach. Insgesamt hatten vier von sieben Embryonen mindestens ein Organ in dem humane Donoranteile gefunden wurden. Einer der Embryonen war in zwei Geweben positiv (Tab. 4).

### **2.3.2. Donorkontribution in E16.5 Embryonen nach Injektion von CD271-positiven Knochenmarkszellen**

Neben den BM-MSCs wurden auch CD271-positive Knochenmarkszellen durch Blastozysteninjektion getestet. CD271 ist ein Marker zur Anreicherung des Anteils von mesenchymalen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark. Quirici et al. hatten gezeigt,



dass CD271-positive Knochenmarkszellen einen höheren Anteil mesenchymaler Vorläuferzellen enthalten als unselektionierte Knochenmarkszellen (Quirici et al., 2002).

Um zu untersuchen, wie sich die Selektion der Knochenmarkszellen auf CD271 auf die Fähigkeit auswirkt, murine Embryonen zu besiedeln, wurden CD271-positive Knochenmarkszellen in murine Blastozysten injiziert.

Die Gewinnung des Knochenmarksaspirats und die Sortierung der CD271-positiven Zellen erfolgte durch Dr. Heinrich Lannert (Universität Heidelberg). Die Injektion dieser Zellen erfolgte ohne weitere Kultivierungsschritte.

**Tab. 5** Verteilung von humanen Donoranteilen in murinen E16.5 Embryonen nach Injektion von CD271+ humanen Knochenmarkszellen

| Embryo | Gehirn | Leber | Lunge | Darm | Herz  | Blut  | Muskel | Niere | Brustkorb | Rest Embryo |
|--------|--------|-------|-------|------|-------|-------|--------|-------|-----------|-------------|
| 1      | -      | -     | -     | -    | -     | -     | -      | -     | -         | -           |
| 2      | -      | -     | -     | -    | -     | 0,02% | -      | -     | -         | -           |
| 3      | -      | -     | -     | -    | -     | -     | -      | -     | -         | -           |
| 4      | -      | -     | -     | -    | -     | -     | -      | -     | -         | -           |
| 5      | -      | -     | -     | -    | -     | -     | -      | -     | -         | -           |
| 6      | -      | -     | -     | -    | 0,02% | -     | -      | -     | -         | -           |
| 7      | -      | -     | -     | -    | -     | -     | -      | -     | -         | -           |
| 8      | -      | -     | -     | -    | -     | -     | -      | -     | -         | -           |
| 9      | -      | -     | -     | -    | -     | -     | -      | -     | -         | -           |
| 10     | -      | -     | -     | -    | -     | -     | -      | -     | -         | -           |
| 11     | -      | -     | -     | -    | -     | -     | -      | -     | -         | -           |
| 12     | -      | -     | -     | -    | -     | -     | -      | -     | -         | -           |
| 13     | -      | -     | -     | -    | 0,01% | -     | -      | -     | -         | -           |
| 14     | -      | -     | -     | -    | -     | -     | -      | -     | -         | -           |
| 15     | -      | -     | -     | -    | -     | -     | -      | -     | -         | -           |
| 16     | -      | -     | -     | -    | -     | -     | -      | -     | -         | -           |
| 17     | -      | -     | -     | -    | -     | -     | -      | -     | -         | -           |
| 18     | -      | -     | -     | -    | -     | -     | -      | -     | -         | -           |
| 19     | -      | -     | -     | -    | -     | -     | -      | -     | -         | -           |
|        | 0/18   | 0/18  | 0/18  | 0/17 | 2/15  | 1/16  | 0/17   | 0/17  | 0/18      | 0/12        |

Die in der Tabelle dargestellten Werte stellen Mittelwerte dar. Detektion und Quantifizierung erfolgte über hu- $\beta$ -Glob und 17 $\alpha$ mod spezifische qPCR. (Positive Signale  $\geq 0,01$  % und n=3 ; nicht positive Gewebe sind mit – markiert.)

Insgesamt wurden Injektionen mit vier verschiedenen CD271-positiven Zellpräparationen durchgeführt. Daraus entwickelten sich 19 Embryonen, von denen jedoch nur

drei chimär waren. Humane Donoranteile wurden dabei im Herz (2/19) und im embryonalen Blut (1/19) festgestellt (Tab. 5).

### 2.3.3. Donorkontribution in E16.5 Embryonen nach Injektion von CB-MSCs

Die Gewinnung von CB-MSCs erfolgt ähnlich wie bei BM-MSCs über die Selektion mononukleärer plastik-adhärenter Zellen.

**Tab. 6** Verteilung von humanen Donoranteilen in murinen E16.5 Embryonen nach Injektion von humanen CB-MSCs

| Embryo | Gehirn | Leber | Lunge | Darm  | Herz  | Blut  | Muskel | Niere | Brustkorb | Rest Embryo |
|--------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|-----------|-------------|
| 1      | -      | -     | -     | -     | -     | -     | -      | -     | -         | -           |
| 2      | -      | -     | -     | -     | -     | -     | -      | -     | -         | -           |
| 3      | -      | -     | -     | 0,02% | -     | -     | -      | -     | -         | -           |
| 4      | -      | -     | -     | -     | -     | -     | -      | -     | -         | -           |
| 5      | -      | -     | -     | -     | -     | 0,05% | -      | -     | -         | -           |
| 7      | -      | -     | -     | -     | -     | -     | -      | -     | -         | -           |
| 8      | -      | -     | 0,02% | -     | -     | -     | -      | -     | -         | -           |
| 10     | -      | -     | -     | -     | -     | -     | -      | -     | -         | -           |
| 11     | -      | -     | -     | -     | -     | -     | -      | -     | -         | -           |
| 12     | -      | -     | -     | -     | -     | -     | -      | -     | -         | -           |
| 13     | -      | -     | -     | -     | -     | -     | -      | -     | -         | -           |
| 14     | -      | -     | 0,06% | -     | 0,02% | -     | -      | -     | -         | -           |
| 15     | -      | -     | 0,03% | -     | -     | -     | -      | 0,02% | -         | -           |
| 16     | -      | -     | 0,03% | -     | -     | -     | -      | -     | -         | -           |
| 17     | -      | -     | -     | -     | -     | -     | -      | -     | -         | -           |
| 18     | -      | -     | -     | -     | -     | -     | -      | -     | -         | -           |
|        | 0/16   | 0/16  | 4/16  | 1/13  | 1/14  | 1/14  | 0/16   | 1/14  | 0/16      | 0/12        |

Tabelle 6 stellt die Zusammenfassung der PCR-Donoranalyse nach Blastozysteninjektion von CB-MSCs dar. Die CB-MSCs wurden vor der Injektion für ca. drei bis sechs Wochen *in vitro* kultiviert. Die sich aus den injizierten Blastozysten entwickelten E16.5 Embryonen wurden mittels hu- $\beta$ -Glob und 17 $\alpha$ mod qPCR auf humane Donorkontribution in verschiedenen Organen untersucht. (Positive Signale  $\geq 0,01$  % und n=3; nicht positive Gewebe sind mit - markiert.)

Die CB-MSCs wurden vor der Injektion für drei bis sechs Wochen *in vitro* expandiert. Die Zellen wurden enzymatisch gelöst und anschließend in murine E3.5

Blastozysten injiziert. Die sich aus den injizierten Blastozyten entwickelten E16.5 Embryonen wurden auf humane Donorkontribution in Gehirn, Leber, Lunge, Darm, Herz, Blut, Muskel, Niere, Brustkorb und restlichem Embryo untersucht. Die Ergebnisse der PCR-Analyse sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Nach der Injektion von CB-MSCs wurde in 6 von 18 Embryonen Gewebe mit Donorkontribution nachgewiesen. Am häufigsten wurden Donorsignale in der embryonalen Lunge nachgewiesen (4/16). Daneben fanden sich auch humane Signale im Darm (1/13), im Herz (1/14), im Blut (1/14) und der Niere (1/14).

#### **2.3.4. Humane Donoranteile in E16.5 Embryonen nach Injektion von AT-MSCs**

AT-MSCs wurden ebenfalls auf ihre Fähigkeit zur Kontribution im murinen Embryo untersucht. Die Zellen wurden wie CB- und BM-MSCs nach *in vitro* Expansion in FCS-Medium in E3.5 Blastozysten injiziert und die entstandenen E16.5 Embryonen auf humane Donorsignale überprüft.

Darüber hinaus wurden die Donoranteile von vorab injizierten AT-MSCs untersucht, die zuvor in Medium mit HS-Supplement kultiviert wurden. Dadurch sollten mögliche Unterschiede zwischen MSCs aus HS- und FCS-Kultur festgestellt werden.

Die PCR-Analyse der embryonalen Gewebeproben nach der Injektion von AT-MSCs aus FCS-Kultur zeigte nach der Injektion von kurzzeitkultivierten (drei Wochen) Zellen humane PCR-Signale in Herz (1/10), Muskel (1/10), Brustkorb (2/10), Lunge (3/10), Blut (3/10) und im Rest des Embryos (1/10). In Blut und Lunge fanden sich am häufigsten humane Donoranteile. Nach der Injektion der AT-MSCs, die zehn Wochen in Medium mit FCS-Supplement kultiviert waren, wurden in den acht untersuchten Embryonen keine Donorsignale festgestellt (Tab. 7).

Die Analyse der Embryonen, die aus der Blastozysteninjektion von AT-MSCs aus Kultur mit HS-supplementiertem Medium entstanden, brachte am häufigsten eine Donorkontribution in den Brustkorb (3/7) und im Darm (2/7) zum Vorschein. Es waren jedoch auch Signale in Muskel (1/7), Niere (1/7), Haut (1/7) und im Rest des Embryos (1/7) festzustellen (Tab. 8).

**Tab. 7** Verteilung von humanen Donoranteilen in murinen E16.5 Embryonen nach Injektion von AT-MSCs aus FCS-Kultur

|                      | Embryo | Gehirn | Leber | Lunge | Darm | Herz  | Blut  | Muskel | Niere | Brustkorb | Rest Embryo |   |
|----------------------|--------|--------|-------|-------|------|-------|-------|--------|-------|-----------|-------------|---|
| 3 Wochen kultiviert  | 1      | -      | -     | -     | -    | -     | 0,07% | -      | -     | -         | -           |   |
|                      | 2      | -      | -     | -     | -    | -     | 0,23% | -      | -     | -         | 0,1%        |   |
|                      | 3      | -      | -     | 0,1%  | -    | -     | -     | -      | -     | -         | -           |   |
|                      | 4      | -      | -     | -     | -    | 0,02% | 0,2%  | -      | -     | 0,02%     | -           |   |
|                      | 5      | -      | -     | 0,03% | -    | -     | -     | -      | -     | -         | -           |   |
|                      | 6      | -      | -     | 0,03% | -    | -     | -     | -      | -     | -         | -           |   |
|                      | 7      | -      | -     | -     | -    | -     | -     | -      | -     | -         | -           |   |
|                      | 8      | -      | -     | -     | -    | -     | -     | -      | 0,03% | -         | 0,08%       | - |
|                      | 9      | -      | -     | -     | -    | -     | -     | -      | -     | -         | -           | - |
|                      | 10     | -      | -     | -     | -    | -     | -     | -      | -     | -         | -           | - |
| 10 Wochen kultiviert | A      | -      | -     | -     | -    | -     | -     | -      | -     | -         | -           |   |
|                      | B      | -      | -     | -     | -    | -     | -     | -      | -     | -         | -           |   |
|                      | C      | -      | -     | -     | -    | -     | -     | -      | -     | -         | -           |   |
|                      | D      | -      | -     | -     | -    | -     | -     | -      | -     | -         | -           |   |
|                      | E      | -      | -     | -     | -    | -     | -     | -      | -     | -         | -           |   |
|                      | F      | -      | -     | -     | -    | -     | -     | -      | -     | -         | -           |   |
|                      | G      | -      | -     | -     | -    | -     | -     | -      | -     | -         | -           |   |
|                      | H      | -      | -     | -     | -    | -     | -     | -      | -     | -         | -           | - |
|                      |        | 0/18   | 0/18  | 3/18  | 0/18 | 1/18  | 3/18  | 1/18   | 0/8   | 2/18      | 1/18        |   |

Die Zellen wurden vor der Injektion 2 bzw. 10 Wochen in Medium mit FCS-Supplement kultiviert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus der Quantifizierung des humanen DNA-Anteils durch hu- $\beta$ -Glob und 17 $\alpha$ mod qPCR in den untersuchten Geweben. (Positive Signale  $\geq 0,01$  % und n=3 ; nicht positiv getestete Gewebe sind mit – markiert.)

Insgesamt konnten nach Injektion kurzzeitkultivierter AT-MSCs humane Donorsignale in den Embryonen generiert werden. Die Injektion von AT-MSCs aus FCS-Kultur brachte sieben positive E16.5 Embryonen von achtzehn insgesamt generierten Embryonen. Nach Injektion von AT-MSCs aus HS-Kultur waren fünf von sieben Embryonen positiv. Insgesamt waren fünf der Embryonen in mehr als einem Gewebe positiv (drei aus FCS- und zwei aus HS-Kultur). Nach Injektion acht Wochen kultivierter AT-MSCs wurden keine positiven Organe festgestellt.

**Tab. 8** Verteilung von humanen Donoranteilen in murinen E16.5 Embryonen nach Injektion von AT-MSCs aus HS-Kultur

| Embryo | Kopf | Gehirn | Leber | Lunge | Darm  | Herz | Blut | Muskel | Niere | Brustkorb | Rest Embryo | Haut  |
|--------|------|--------|-------|-------|-------|------|------|--------|-------|-----------|-------------|-------|
| 1      | -    | -      | -     | -     | 0,03% | -    | -    | -      | 1,24% | -         | 0,02%       | -     |
| 2      | -    | -      | -     | -     | -     | -    | -    | 0,02%  | -     | 0,02%     | -           | 0,24% |
| 3      | -    | -      | -     | -     | -     | -    | -    | -      | -     | -         | -           | -     |
| 4      | -    | -      | -     | -     | -     | -    | -    | -      | -     | -         | -           | -     |
| 5      | -    | -      | -     | -     | -     | -    | -    | -      | -     | -         | -           | -     |
| 6      | -    | -      | -     | -     | -     | -    | -    | -      | -     | -         | -           | -     |
| 7      | -    | -      | -     | -     | -     | -    | -    | -      | -     | -         | -           | -     |
| 6      | -    | -      | -     | -     | -     | -    | -    | -      | -     | 0,01%     | -           | -     |
| 7      | -    | -      | -     | -     | -     | -    | -    | -      | -     | 0,05%     | -           | -     |
| 8      | -    | -      | -     | -     | 0,02% | -    | -    | -      | -     | -         | -           | -     |
|        | 0/7  | 0/7    | 0/7   | 0/7   | 2/7   | 2/7  | 0/7  | 1/7    | 0/7   | 3/7       | 1/7         | 1/7   |

Die Zellen wurden vor der Injektion in Medium mit HS-Supplement für drei Wochen kultiviert. Der durch hu- $\beta$ -Glob und 17 $\alpha$ mod qPCR bestimmte mittlere humane DNA-Anteil ist angegeben. (Positive Signale  $\geq 0,01$  % und n=3 ; nicht positiv getestete Gewebe sind mit – markiert.)

### 2.3.5. Zusammenfassung der Ergebnisse der PCR-Analyse

#### *Effizienz der durchgeführten Blastozysteninjektion*

Nach der Blastozysteninjektion aller untersuchten Zelltypen wurden Embryonen mit Donorkontribution festgestellt. Die Effizienz, mit der diese generiert werden konnten, war jedoch unterschiedlich.

So wurden nach Injektion von AT-MSCs aus FCS-Kultur in 101 murine Blastozysten 17 Embryonen (17 %) generiert. Davon hatten acht (47 %) mindestens ein positives Gewebe. Nach Injektion von AT-MSCs aus Kultur mit HS-Supplement in 33 Blastozysten entwickelten sich sieben (21 %) E16.5 Embryonen, von denen drei (43 %) positiv für humane Donorsignale waren. Nach Injektion von 100 Blastozysten mit CB-MSCs entwickelten sich 16 (16 %) zu Embryonen, von denen 37 % (6/16) humane Donoranteile hatten. Die Injektion CD271-positiver Knochenmarkszellen erzeugte 19 % Embryonen (21/112), von denen allerdings nur 14 % (3/21) positiv waren. BM-MSCs

wurden in 30 Blastozysten injiziert. Daraus entwickelten sich sieben Embryonen (23 %). Vier davon (57 %) hatten Organe mit humanen Donoranteilen.

Nach Injektion von AT-, CB- und BM- lag der Anteil der E16.5 Embryonen die positiv für humane Donoranteile waren zwischen 37 % und 57 %. Ein deutlich geringerer Anteil der Embryonen (14 %) war positiv, wenn sie sich aus Blastozysten entwickelt hatten, denen CD271-positive Knochenmarkszellen injiziert wurden.

Die Frequenz, mit der sich nach der Blastozysteninjektion der einzelnen Zelltypen E16.5 Embryonen entwickelten, lag zwischen 16 und 23 % und damit niedriger als bei vergleichbaren Injektionen in den Arbeiten von Harder et al. und Dürr et al. (Harder et al., 2002a; Dürr et al., 2003) (Tab. 9).

**Tab.9** Effizienz der Blastozysteninjektion humaner Zellen

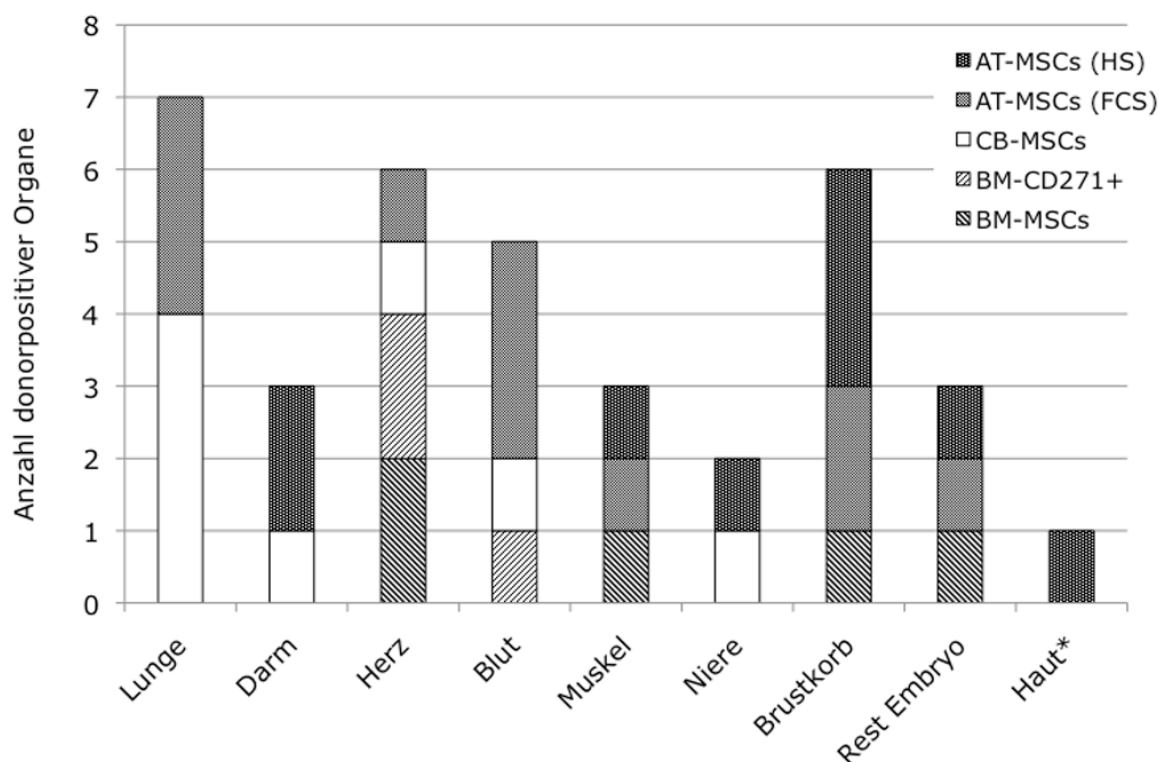
|  | injizierte Blastozysten | Embryonen (E 16.5) | Embryonen mit donor-positiven Geweben |
|--|-------------------------|--------------------|---------------------------------------|
| BM-MSCs  | 30                      | 7/30 (23%)         | 4/7 (57%)                             |
| AT-MSCs (FCS-Kultur)   | 101                     | 17/101 (17%)       | 8/17 (47%)                            |
| AT-MSCs (HS-Kultur)  | 33                      | 7/33 (21%)         | 3/7 (43%)                             |
| CB-MSCs  | 100                     | 16/100 (16%)       | 6/16 (37%)                            |
| CD271+ BM-Zellen   | 112                     | 21/112 (19%)       | 3/21 (14%)                            |
| hu HSCs<br>CD34 <sup>+</sup> /CD38 <sup>-</sup><br>(Harder et al.2002) | 30                      | 20/30 (67%)        | 9/20 (45%)                            |
| primäre hu AML Zellen<br>CD38 <sup>-</sup><br>(Dürr et al.2003)        | 52                      | 26/52 (50%)        | 14/26 (53%)                           |

Angegeben sind die Anzahl der injizierten Blastozysten, die daraus hervorgegangenen Embryonen sowie der Anteil der Embryonen mit humanen Donorsignalen in den Geweben. Zusätzlich sind die gleichen Angaben auch für die von Dürr et al. (2002) und Harder et al. (2002) durchgeführten Blastozysteninjektionen humaner Zellen aufgeführt.

#### *Verteilung der humanen Donorsignale*

Nach der Injektion von BM-Zellen, also BM-MSCs und CD271-positiven Zellen, wurden humane DNA-Sequenzen am häufigsten im Herzgewebe detektiert. Von den insgesamt sechs Embryonen, die chimär waren, wurde in vier der Chimärismus im Herzen nachgewiesen. Nach Injektion von CB-MSCs und AT-MSCs wurde nach der PCR-Analyse ebenfalls jeweils ein embryonales Herz mit humanen Donorsignalen

identifiziert (CB-MSCs 1/6; AT-MSC (FCS) 1/6). Die chimären Embryonen aus der Injektion von CB-MSCs zeigten am häufigsten Donorsignale in der Lunge (4/6 chimäre Embryonen). Dagegen wurden nach Injektion von Knochenmarkszellen (BM-MSCs, CD271-positiven Zellen) und AT-MSCs aus HS-Kultur keine Signale gefunden, die auf humane Donorzellen in den embryonalen Lungen hinwiesen. AT-MSCs aus FCS-Kultur waren ebenfalls häufig positiv in der Lunge (3/6), jedoch ebenso häufig im Blut (3/6). Die Injektion von AT-MSCs aus HS-Kultur erbrachte am häufigsten Signale in der Gewebeprobe vom Brustkorb der Embryonen (3/4) (Abb. 12).



**Abb. 12 Zusammenfassung der nach der PCR-Analyse gefundenen Gewebe mit humanen Donoranteilen.**

Die Gewebe wurden aus Embryonen entnommen, die durch Blastozysteninjektion von BM-MSCs, CD271-positiven Knochenmarkszellen (BM-CD271+), CB-MSCs oder AT-MSCs generiert wurden. Angegeben ist die Verteilung und die Anzahl der embryonalen Gewebe mit humanem Donoranteil sowie die Art der in die Blastozyste injizierten Donorzellen. \* Gewebeproben aus der Haut wurden nur nach Injektion von AT-MSCs aus HS-Kultur entnommen und getestet.

Die geringe Anzahl der chimären Embryonen, die durch die Injektion der jeweiligen Zelltypen generiert werden konnte, erlaubte jedoch keine sicheren Rückschlüsse auf

eine zelltypspezifische Verteilung der chimären Gewebe. Vielmehr waren die nach der PCR-Analyse identifizierten chimären Gewebe breit verteilt.

In der Summe wurden Signale in Herz, Oberschenkelmuskel, Brustkorb, Lunge, Darm, Niere aber auch im Blut festgestellt. Einzig im Gehirn und in der Leber fanden sich in keinem der untersuchten Embryonen humane Donorsignale.

#### *Ausmaß der Donorkontribution in den Gewebeproben der chimären Embryonen*

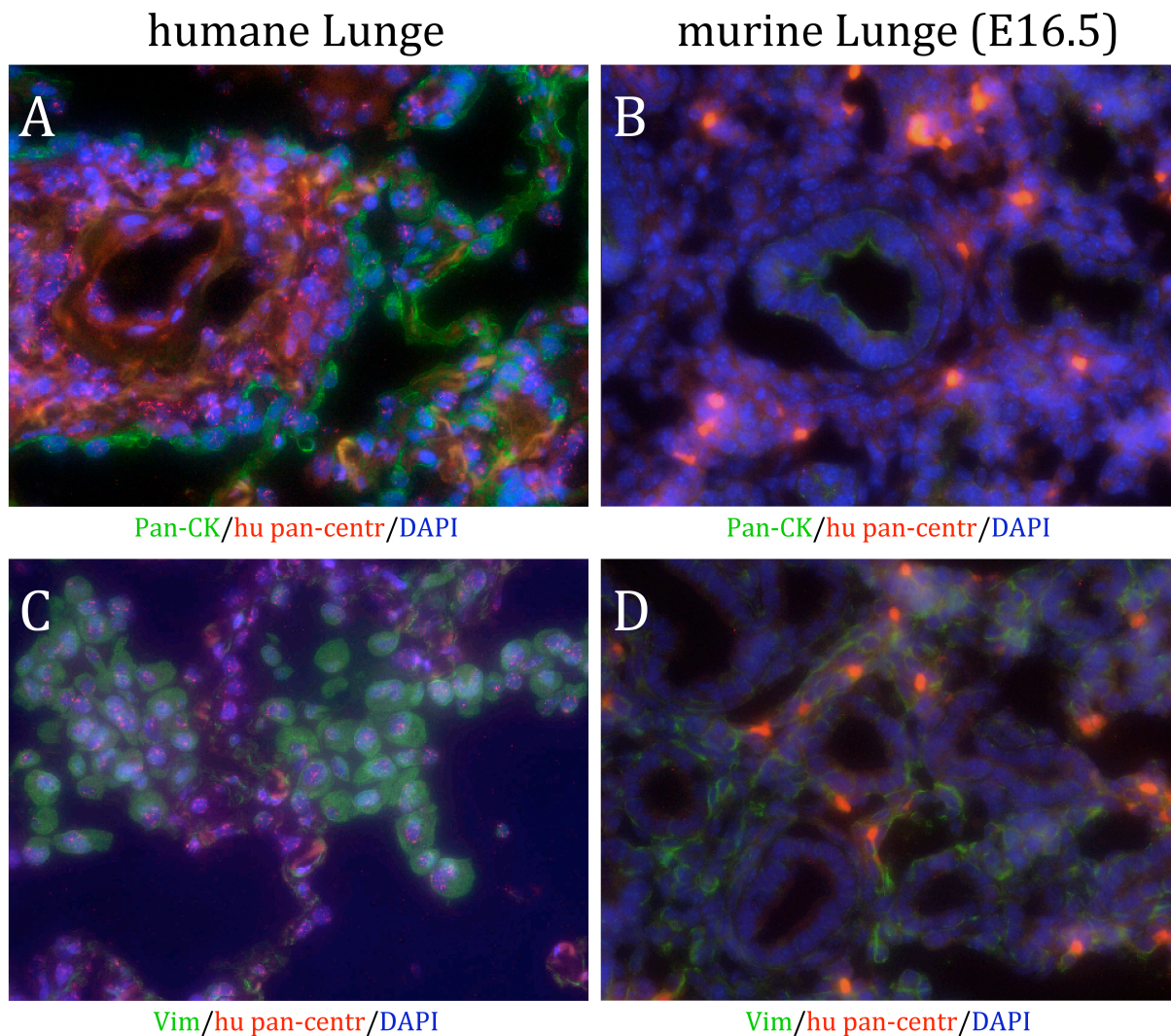
Die Ergebnisse der Bestimmung der Stärke des Donorsignals erbrachten Werte, die einem Donoranteil zwischen 0,01 und 1,24 %, also 1-124 pro 10 000 Zellen entsprachen. Nach der Injektion von BM-MSCs lag der Donoranteil in den chimären Geweben zwischen 0,02 und 0,07 %. Chimäre Gewebe aus der Injektion CD271-positiver Knochenmarkszellen hatten einen Donoranteil von 0,01-0,02 %. Donoranteile von 0,02 bis 0,05 % wurden nach der Injektion von CB-MSCs bestimmt. Für AT-MSCs lagen die Donoranteile zwischen 0,02 und 0,23 % für die FCS-Kultur und bei 0,02 bis 1,24 % für die HS-Kultur.

#### **2.3.6. Analyse der Gewebe mit humanen Donoranteilen durch humanspezifische Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung**

Mit der PCR-Analyse wurde aus der DNA der isolierten Gewebeproben der Donoranteil durch den Anteil der humanen DNA bestimmt. Um die Donorsignale im Gewebe zu lokalisieren und den Differenzierungsstatus der Donorzellen zu bestimmen, wurde an Gewebsschnitten von Organen, bei denen zuvor humane Donoranteile gefunden wurden, eine kombinierte *in situ* Hybridisierung / Immunhistochemie durchgeführt.

Dazu wurden Proben aus Herz, Lunge, Gehirn und Niere gleichzeitig mit den Proben für die PCR-Analyse entnommen und bis zur Anfertigung der Gefrierschnitte kryokonserviert. Zur Probennahme von Herz, Gehirn und Lunge wurden die Organe geteilt. Ein Teil wurde für die PCR-Analyse verwendet, während der andere für die Anfertigung von Gewebeschnitten aufbewahrt wurde.





**Abb. 13** Ergebnisse der humanspezifischen *in situ* Hybrdisierung von humanem Lungengewebe und PCR-positivem murinem embryonalen (E 16.5) Lungengewebe. Dargestellt ist das Ergebnis der kombinierten FisH/Immunfärbung von Gewebeschnitten aus Lungengewebe (10  $\mu$ m). Die Lungen-Gewebeschnitte A und C entstammen einer humanen Lunge und dienten als Positivkontrolle. Gewebeschnitte einer embryonalen murinen Lunge sind in B und D abgebildet. Die embryonale murine Lunge wurde aus einem nach Blastozysteninjektion von CB-MSCs entstandenen Embryo entnommen und zeigte nach PCR-Analyse Donorsignale. A und B wurden zusätzlich mit einem Pan-Cytokeratin-Antikörper (Pan-CK) gefärbt, während C und D mit einem Vimentin-Antikörper (Vim) gefärbt wurden. Cytokeratin ist typischer Weise in epithelialen Zellen exprimiert während Vimentin ein mesenchymaler Marker ist. Die verwendete humanzentromer-spezifische Sonde war direkt mit Cy3 markiert (rot), während die Antikörper mit einem FITC-konjugierten sekundären Antikörper (grün) detektiert wurden. Die Färbung der Zellkerne erfolgte durch DAPI (blau). Vergrößerung 1:200.

Da nach der PCR-Analyse häufig Donorsignale in der Lunge sowie im Herz der chimären Embryonen auftraten, wurden von den positiven Proben dieser Gewebe Gefrierschnitte angefertigt und weiter analysiert. Zum Nachweis der humanen Zellen

wurde eine *in situ* Hybridisierung mit einer Sonde durchgeführt, die spezifisch humane Zentromere bindet. Zur Detektion war die Sonde mit dem Fluorochrom CY3 markiert. Gleichzeitig mit der FisH wurde eine Immunfärbung gegen zelltypspezifische Marker durchgeführt, um eine mögliche Differenzierung der Zellen nachzuweisen. Die Detektion erfolgte durch einen FITC-markierten sekundären Antikörper.

Durch die Hybridisierung humaner Lungengewebe mit der humanspezifischen pan-Zentromeren-Sonde waren humane Zellen nachweisbar (Abb. 13 A, C). Die Frequenz, mit der die Zellen spezifisch nachgewiesen wurden, lag nach der Auszählung zwischen 70 und 80 %.

Dennoch konnten in den in Abbildung 13 dargestellten embryonalen Lungen sowie in den anderen untersuchten Gewebeschnitten keine humanen Zellen nachgewiesen werden, obwohl diese nach der qPCR-Analyse positiv für humane Donoranteile waren.

Insgesamt wurden zwei positive Lungen aus der Injektion von CB-MSCs (Embryo 15 n=15; Embryo 8 n=5), eine Niere aus der Injektion von AT-MSCs (HS-Kultur n=2), sowie zwei positive Herzen aus der Injektion von BM-MSCs (jeweils n=4) untersucht. Es wurden keine Nachkommen der injizierten MSCs identifiziert.

---

## 3. Diskussion

### 3.1. Das Entwicklungspotential humaner MSCs aus BM, AT und CB

Mit der Injektion verschiedener humaner MSC-Populationen in murine Blastozysten wurde das Entwicklungspotential von MSCs im embryonalen *in vivo* Kontext analysiert. Dazu wurde untersucht, in welchen Geweben des Mausembryos humane Signale auftraten. Die Verteilung der Donorsignale auf die Gewebe der Embryonen wurde analysiert und verglichen, um mögliche Unterschiede im Entwicklungspotential von MSCs aus BM, AT und CB aufzudecken. Grundsätzlich konnte gezeigt werden, dass Embryonen mit humanem Donorzellanteil nach Injektion aller untersuchten Zelltypen – BM-, AT- und CB-MSCs, sowie CD271-positiven Knochenmarkszellen – erzeugt werden können. Der Nachweis der humanen Donorzellen erfolgte durch Amplifikation humaner DNA-Sequenzen in den Geweben der sich entwickelnden E16.5 Embryonen mit qPCR.

#### ***3.1.1. Die Blastozysteninjektion als Modellsystem zur Analyse des Entwicklungspotentials von MSCs und anderen Stammzellen***

Humane MSCs aus BM, AT und CB wurden bisher nicht im Blastozysteninjektionsmodell vergleichend untersucht. Es wurden jedoch verschiedene murine mesenchymale Stammzelltypen mittels Blastozysteninjektion untersucht. So resultierte aus der Injektion von mMAPCs in murine Blastozysten ein Donorzellchimärismus in Zelltypen aller drei Keimblätter (Jiang et al., 2002). Auch murine MSCs wurden mittels Blastozysteninjektion auf ihr *in vivo* Differenzierungspotential untersucht (Okumura et al., 2009). Die Studie von Okumura et al. erbrachte Hinweise auf eine Differenzierungsfähigkeit von murinen MSCs zu epithelialen Zelltypen des Gastro-Intestinal-Trakts. Die Differenzierung von MSCs in andere Gewebstypen wurde allerdings in dieser Studie nicht untersucht.

Auch das Differenzierungspotential humaner mesenchymaler Stammzelltypen wurde durch Mikroinjektion in murine Blastozysten untersucht. So wurde auch die Differenzierungsfähigkeit von hiDPSCs im Blastozystenmodell untersucht (Siqueira da Fonseca et al., 2009). hiDPSCs besitzen wie MSCs ein osteogenes und chondrogenes

Differenzierungspotential, eine fibroblastoide Morphologie und sie exprimieren MSC-Marker (Kerkis et al., 2006; Siqueira da Fonseca et al., 2009). Die Injektion der hiDPSCs erbrachte eine Donorkontribution in einer Vielzahl Organe darunter Gehirn, Leber, Darm und Herz. Eine Differenzierung der Zellen zu muskulären und epithelialen Zelltypen konnte festgestellt werden. hiDPSCs unterscheiden sich jedoch trotz dieser Ähnlichkeiten von MSCs. So wurde gezeigt, dass hiDPSCs ES-Zellmarker wie Oct4 und Nanog exprimieren (Kerkis et al., 2006), die von perinatalen MSCs nicht exprimiert werden (Zhang et al., 2009).

Auch das Entwicklungspotential anderer humaner Stammzellen wurde durch Blastozysteninjektion untersucht. So zeigten Harder et al., dass nach der Injektion humaner HSCs aus der Nabelschnur humane Donorzellen an typischen Orten der embryonalen Hämatopoese sowie im Blut zu finden waren (Harder et al., 2002a).

Bei den durchgeführten Injektionen war die Häufigkeit, mit der injizierte Blastozysten sich zu lebenden E16.5 Embryonen entwickelten, für alle injizierten Zelltypen ähnlich. Sie war jedoch niedriger als bei vergleichbaren Injektionen humaner Zellen in murine Blastozysten, die in unserem Labor durchgeführt wurden (Harder et al., 2002a; Dürr et al., 2003).

Verantwortlich für diesen Unterschied könnte der Umstand sein, dass MSCs wesentlich größer sind als die von Harder et al. injizierten humanen HSCs oder auch die von Dürr et al. injizierten humanen akute myeloische Leukämie- (AML-) Zellen. Die Größe der MSCs könnte bei der Injektion zu einer mechanischen Schädigung der Blastozyste geführt haben. Dadurch könnte die Weiterentwicklung zu E16.5 Embryonen beeinträchtigt worden sein. Andererseits wurden nur diejenigen injizierten Blastozysten in die Leihmütter transferiert, die nach der Injektion die typische Morphologie von Blastozysten wiedererlangt hatten. Daher ist es unwahrscheinlich, dass zumindest stark geschädigte Blastozysten transferiert wurden.

Wahrscheinlicher ist, dass Unterschiede in der Durchführung der Blastozysteninjektion die Ursache für die niedrigere Häufigkeit, mit der Embryonen erzeugt wurden, waren. Diese Unterschiede könnten sich beispielsweise negativ auf die Einnistung der Blastozysten in den Uterus der Leihmütter ausgewirkt haben. Konkrete systematische Unterschiede in der Durchführung der Blastozysteninjektion konnten jedoch nicht identifiziert werden.

Für eine methodische Ursache der Unterschiede in der Effizienz, mit der die Embryonen generiert wurden, spricht auch, dass die Embryonen, die erzeugt werden konnten, zu einem prozentual ähnlich hohen Anteil Donorkontribution zeigten wie nach Injektion humaner HSCs (Harder et al., 2002a) und humaner AML-Zellen (Dürr et al., 2003) und ein nachteiliger Effekt der MSCs somit nicht nachweisbar war. Die Stärke der Donorsignale in den Geweben war in der eigenen Arbeit nach PCR-Analyse relativ schwach und lag meist nur zwischen 0,01 und 0,2 %. Damit war sie vergleichbar hoch wie in den Arbeiten von Harder et al. und Dürr et al. Im Gegensatz dazu war nach den von Okumura et al. durchgeführten Blastozysteninjektionen von murinen MSCs eine Donorkontribution im gastrischen Epithel von ca. 5 % festgestellt worden. Die Injektion von humanen MSCs führte also zu einer deutlich niedrigeren Besiedlung der Gewebe. Dies kann an der xenogenen Umgebung liegen, in der sich die humanen Zellen nach der Blastozysteninjektion befinden. Denn es sind zwar viele für die frühe humane und murine Embryonalentwicklung bedeutsame Gene und Signalwege evolutionär konserviert, es wurden aber für einige dieser Gene Unterschiede in der räumlichen und zeitlichen Expression während der murinen und humanen Embryonalentwicklung gefunden (Fougerousse et al., 2000; Bibb et al., 2001). Diese Unterschiede könnten eine Integration der MSCs in murine Embryonen erschwert haben und dadurch zu einer schwächeren Besiedlung geführt haben.

Die Quantifizierung der Donorsignale ergab jedoch auch Hinweise darauf, dass die MSCs in der xenogenen murinen Mikroumgebung proliferiert haben. So wurde nach Injektion von je 3-8 MSCs in den positiven Organen eine Donorkontribution von bis zu 1,24 % (124 pro 10 000 Zellen) nach Injektion von AT-MSCs festgestellt.

### ***3.1.2. Das Entwicklungspotential von MSCs aus BM, AT und CB***

In der vorliegenden Arbeit sollte das Entwicklungspotential humaner MSCs aus BM, CB und AT sowie von CD271-positiven Knochenmarkszellen durch Blastozysteninjektion analysiert werden. In einem Teil der nach den Injektionen entstandenen Embryonen konnten am Tag 16 humane Donorsignale in den Geweben mittels qPCR nachgewiesen werden. Es gelang jedoch nicht die humanen Zellen mittels FisH in den Gewebeschnitten zu identifizieren.

Dass in den untersuchten Geweben die humanen Zellen nicht identifiziert werden konnten, lag wahrscheinlich an der niedrigen Frequenz, in der sie vorlagen. Dazu kommt, dass die FisH, mit der die Zellen detektiert wurden, zwar eine sehr hohe Spezifität hat, in der Regel jedoch nicht hundert Prozent der Zellen detektiert. Dies könnte in Kombination mit der niedrigen Frequenz der Donorzellen dazu geführt haben, dass die humanen Zellen in den murinen Geweben nicht gefunden wurden und somit die Analyse des Differenzierungsstatus nicht möglich war. Aufgrund dieser Schwierigkeiten konnte eine *in vivo* Differenzierung der injizierten Zellen nicht nachgewiesen werden.

MSCs haben jedoch Eigenschaften, die dafür sprechen, dass eine Differenzierung im Blastozystenmodell grundsätzlich möglich ist.

MSCs haben z.B. ein ausgesprochen hohes Differenzierungspotential, welches durch eine Vielzahl von Studien belegt ist (Kopen et al., 1999; Pittenger et al., 1999; Shim et al., 2004; Aurich et al., 2009). Dazu kommt, dass viele der beschriebenen Differenzierungswege von MSCs durch umgebende Zellen induziert werden können. So führte beispielsweise die *in vitro* Kokultivierung von MSCs mit Ratten-Kardiomyozyten zu einem kardiomyozyten Phänotyp (Fukuhara et al., 2003), mit Luftwegs-Epithelzellen zu einem epithelialen Phänotyp (Spees et al., 2003) und mit endothelialen Zellen zu einem Phänotyp, der typisch für Zellen der glatten Muskulatur ist (Ball et al., 2004). Die Signale der *in vitro* kokultivierten Zelltypen scheinen also eine Differenzierung der MSCs zu ermöglichen. Kopen et al. zeigten zudem auch *in vivo*, dass murine MSCs durch die Mikroumgebung des Gehirns zu neuronalen Zelltypen differenzieren (Kopen et al., 1999). Der Kontakt mit den umgebenden Zellen im Blastozystenmodell könnte daher ebenso eine gewebstypische Differenzierung der MSCs ermöglicht haben. Dafür spricht auch die Tatsache, dass nach der Blastozysteninjektion von murinen MSCs eine Differenzierung zu Zellen des Gastro-Intestinal-Trakts im Blastozystenmodell feststellbar war (Okumura et al., 2009). Dass eine *in vivo* Differenzierung in einem xenogenen Modell von MSCs grundsätzlich möglich ist, zeigen auch die Experimente von Yokoo et al. (Yokoo et al., 2005). Die von Yokoo et al. eingesetzten *ex utero* Kulturen ganzer Embryonen sowie die verwendete Organkultur bot, ähnlich wie bei der Blastozysteninjektion, die Möglichkeit zur Differenzierung der MSCs während der Organbildung. Yokoo et al. konnten zeigen, dass auf diesem Weg eine funktionelle Integration der humanen MSCs in die Rattenniere möglich war.

Es ist daher gut möglich, dass die MSCs auch in der vorliegenden Arbeit unter dem Einfluss der Mikroumgebung des sich entwickelnden Embryos in den donorpositiven Geweben differenzierten. Eine Differenzierung der MSCs zu ektodermalen Zellen des Gehirns oder zu endodermalen Leberzellen im Blastozystenmodell kann dagegen ausgeschlossen werden, da humane Donorsignale in diesen Organen nicht gefunden wurden.

### ***3.1.3. Die Verteilung der humanen Donorsignale nach Mikroinjektion von humanen MSCs in murine Blastozysten***

Insgesamt konnten in der vorliegenden Arbeit Donorsignale in der Lunge, im Darm, im Herz, im Blut, im Muskel, in der Niere, im Brustkorb, in der Haut und im Rest des Embryos gefunden werden. Es konnte somit eine breite Verteilung der humanen Donorsignale auf eine Vielzahl von Mausgeweben festgestellt werden. Nach Injektionen von MSCs wurden jeweils in mindestens vier verschiedenen Geweben Donorsignale gefunden. Keine der untersuchten Gewebeproben wurde jedoch ausschließlich von MSCs eines bestimmten Ursprungsgewebes besiedelt. Es konnten jedoch trotzdem auch Hinweise dafür gefunden werden, dass unterschiedliche Ursprungsgewebe zu Unterschieden in der Verteilung der Donorsignale führten. So waren nach Injektion von CB-MSCs Donorsignale in der Lunge erheblich häufiger nachweisbar als in allen anderen Gewebeproben. Nach Injektion von AT-MSCs aus HS- und FCS-Kultur war eine Häufung der Donorsignale in den Gewebeproben des Brustkorbs festzustellen. Die Injektionen von BM-MSCs und CD271-positiven Knochenmarkszellen, die aus dem gleichen Ursprungsgewebe stammten, resultierten am häufigsten in donorpositiven Herzen. Sie generierten vier der sechs überhaupt gefundenen positiven embryonalen Herzen. Die Daten zeigten also eine präferentielle Besiedlung unterschiedlicher Gewebe und wiesen klar auf Unterschiede zwischen den Zellen aus den verschiedenen Ursprungsgeweben hin. Solche Unterschiede zwischen MSCs aus BM, CB und AT wurden auch von Gaebel et al. beschrieben (Gaebel et al., 2011). Sie untersuchten das regenerative Potential von BM-, CB- und AT-MSCs in einem Maus-Infarkt-Modell. Dabei fanden sie, dass injizierte BM-MSCs das murine Herz stärker besiedelten als injizierte AT- und CB-MSCs. Darüber hinaus war nach der Injektion von BM-MSCs auch ein stärkerer regenerativer Effekt auf das Herz messbar. Stärkere Donorsignale im Herz konnten nach der Blastozystinjektion

von Zellen aus dem BM in den eigenen Daten nicht generell festgestellt werden, obwohl das stärkste gemessene Donorsignal aus der Injektion von BM-MSCs stammte. Allerdings war insgesamt die gemessene Donorkontribution im Herz eher schwach und Unterschiede zwischen MSCs aus BM, AT und CB waren daher möglicherweise nicht messbar. Die in den eigenen Daten festgestellte präferentielle Besiedlung des Herzens durch Zellen aus BM und die Daten von Gaebel et al. legen aber nahe, dass sich MSC-Präparationen aus den verschiedenen Ursprungsgeweben unterscheiden und sich diese Unterschiede auch *in vivo* auswirken können.

Eine bevorzugte Besiedlung bestimmter Organe könnte auch auf Unterschiede im Differenzierungspotential der MSCs hinweisen. Unterschiede im Differenzierungspotential *in vitro* zeigten die in dieser Arbeit verwendeten CB-MSCs, da sie unter den gewählten Differenzierungsbedingungen, anders als BM- und AT-MSCs, nicht adipogen differenzierten. Grundsätzlich ist jedoch ein chondrogenes, osteogenes und adipogenes Differenzierungspotential für CB-MSCs ähnlich wie für BM- und AT-MSCs beschrieben (Lee et al., 2004). Scheinbar differenzieren MSCs aus BM, AT und CB *in vitro* aber unterschiedlich leicht zu bestimmten Zelltypen. So zeigen AT-MSCs beispielweise eine stärkere Differenzierungsfähigkeit in die adipogene Richtung als BM-MSCs (Sakaguchi et al., 2005). Sie haben jedoch ein schwächeres chondrogenes Differenzierungspotential als BM-MSCs (Winter et al., 2003; Hennig et al., 2007). Außerdem exprimieren AT-MSCs nach osteogener Differenzierung die osteogenen Marker schwächer als osteogen differenzierte BM-MSCs (Noël et al., 2008). Solche Unterschiede im Differenzierungspotential könnten auch zu der beobachteten Häufung der Donorsignale in verschiedenen Geweben geführt haben.

## **3.2. Auswirkungen von HS und FCS auf AT-MSCs**

### ***3.2.1. Proliferation der AT-MSCs in HS-Supplement***

Die Analyse der Proliferationsfähigkeit zeigte, dass HS im Vergleich zu FCS zu einer deutlich stärkeren Proliferation der AT-MSCs führte. In frühen und mittleren Passagen zeigten die AT-MSCs aus HS-Kultur eine höhere Populationsverdopplungsrate und der



---

Anteil der Zellen mit aktiver DNA-Synthese war signifikant höher als bei AT-MSCs aus FCS-Kultur.

Diese stärkere Proliferation in HS-Kultur konnte zudem auch für AT-MSCs des gleichen Spenders gezeigt werden. Daher ließen sich die Unterschiede auf die verwendeten Seren zurückführen und waren nicht spenderabhängig. Die Ergebnisse stehen im Einklang mit denen von Kocaoemer et al., die ebenfalls eine stärkere Proliferation der AT-MSCs unter Verwendung von HS gegenüber FCS fanden (Kocaoemer et al., 2007). Eine Studie von Lindroos et al. stellte dagegen eine geringere mitogene Wirkung von HS auf AT-MSCs fest (Lindroos et al., 2010). Dieses abweichende Ergebnis könnte auf der unterschiedlichen Behandlung der Seren beruhen. Lindroos et al. benutzten ein hitzeinaktiviertes HS, während in der vorliegenden Arbeit keine Hitzeinaktivierung des HS vorgenommen wurde. Die Hitzeinaktivierung von HS führt jedoch zu signifikanten Veränderungen der Zusammensetzung der Seren (Ayache et al., 2006), was auch verantwortlich für die von Lindroos et al. beobachtete niedrigere mitogene Wirkung von HS sein könnte.

### ***3.2.2. Das adipogene Differenzierungspotential von AT-MSCs in HS- und FCS-Kultur***

Shahdadfar et al. beschrieben für BM-MSCs bei der Verwendung von Medium mit humanem autologen Serum eine deutlich langsamere Differenzierung als in FCS-Kultur. Außerdem stellten sie fest, dass undifferenzierte BM-MSCs aus FCS-Kultur auch eine stärkere Expression differenzierungsspezifischer Gene aufwiesen als BM-MSCs in Kultur mit humanem Supplement (Shahdadfar et al., 2005). Für AT-MSCs wurde analog dazu durch vergleichende Analysen des Transkriptom gezeigt, dass eine Vielzahl von Genen, die eine Rolle bei der Differenzierung und Entwicklung spielen, in FCS-Kultur stärker exprimiert sind als in HS-Kultur (Bieback et al., 2010). Unterschiede im Differenzierungspotential konnten von Bieback et al. jedoch nicht festgestellt werden. Solche Unterschiede konnten auch in den eigenen Daten nicht identifiziert werden, da AT-MSCs unter beiden Kulturbedingungen in ähnlicher Frequenz adipogen differenzierten. In der vorliegenden Arbeit wurden die AT-MSCs in Medium mit HS- bzw. FCS-Supplement kultiviert, für die Differenzierung wurde, wie auch in der Studie von

Bieback et al., einheitlich ein kommerzielles Differenzierungsmedium verwendet, welches mit FCS supplementiert war. Die Differenzierung fand also unter identischen Bedingungen statt. In der Arbeit von Shahdadfar et al. wurde die Differenzierung mit unterschiedlichen Supplementen durchgeführt. Dieser Unterschied kann die verschiedenen Resultate in der Arbeit Shahdadfars und der eigenen Arbeit erklären. In Übereinstimmung mit den eigenen Daten fanden auch Gregory et al. für BM-MSCs (Gregory et al., 2006) ebenfalls, bei Verwendung eines einheitlichen Differenzierungsmediums, keine Unterschiede im adipogenen Differenzierungspotential von HS- und FCS-kultivierten Zellen. Das während der Expansion verwendete Supplement scheint also keinen Einfluss auf das adipogene Differenzierungspotential zu haben.

Einen Einfluss scheint hingegen der Zellspender zu haben. Bieback et al. stellten nämlich fest, dass die gefundenen Unterschiede zwischen den einzelnen Zellspendern größer waren als zwischen den getesteten Kulturbedingungen. Sie schlossen daher darauf, dass eher spenderabhängige Faktoren für die Unterschiede im Differenzierungspotential verantwortlich waren. Eine Spenderabhängigkeit des Differenzierungspotentials konnte mit den eigenen Daten nicht überprüft werden, da nur zwei der untersuchten AT-MSC-Präparationen vom gleichen Spender stammten. Auch diese unterschieden sich nicht in der Frequenz mit der sie adipogen differenzierten. So scheint es, obwohl nicht überprüfbar, dennoch wahrscheinlich, dass eine Spenderabhängigkeit des Differenzierungspotentials auch hier vorlag.

### ***3.2.3. Unterschiede in Gehalt und Zusammensetzung von Wachstumsfaktoren in HS und FCS***

Die genaue Zusammensetzung von Seren ist aufgrund der Vielzahl der enthaltenen Inhaltsstoffe nicht bekannt. Daher sind Unterschiede in der Zusammensetzung der Seren nur wenig charakterisiert. Außerdem liefern Zytokin-Arrays aufgrund der Speziespezifität der Antikörper keine zuverlässigen Daten über die Unterschiede in der Zusammensetzung von FCS und humanen Supplementen (Kocaoemer et al., 2007). Dennoch gibt es Studien, die Unterschiede in Gehalt und Zusammensetzung einzelner Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise dem knochenmorphogenetischen Protein (BMP, *bone morphogenetic protein*) (Herrera & Inman, 2009) und PDGFs (Bowen-Pope et al.,

1989) beschrieben haben. Solche Unterschiede könnten für die in dieser Arbeit beobachtete stärkere Proliferation der AT-MSCs in Medium mit HS-Supplement verantwortlich sein.

Eine Studie von Ng et al. identifizierte verschiedene Signalkaskaden, die für die Regulation der Differenzierung, aber auch die Proliferation von MSCs von Bedeutung sind. Diese Signalkaskaden wurden durch PDGFs, TGF- $\beta$  und FGF aktiviert (Ng et al., 2008). Die Autoren konnten zeigen, dass nach der Blockierung jeweils eines dieser Signalwege durch Inhibitoren die Expansionsfähigkeit von BM-MSCs deutlich reduziert wurde. Darüber hinaus konnten sie zeigen, dass die Wachstumsfaktoren  $\beta$ -FGF, TGF- $\beta$ 1 und PDGF-BB ausreichend waren, um MSCs in serumfreiem Medium zu kultivieren. Für AT-MSCs erwies sich auch eine Kombination aus EGF, FGF und PDGF-BB als geeignet um die Proliferation anzuregen (Chieragato et al., 2011). Aufgrund der Bedeutung dieser Wachstumsfaktoren für die MSC-Proliferation ist es sehr wahrscheinlich, dass die in der vorliegenden Arbeit gefundene unterschiedliche mitogene Wirkung von HS und FCS auf Unterschieden in diesen Wachstumsfaktoren beruht.

Solche Unterschiede wurden beispielsweise von Bowen-Pope et al. beschrieben. Sie stellten beim Vergleich von Seren unterschiedlicher Spezies fest, dass HS einen deutlich höheren Gehalt an PDGFs hatte als FCS oder viele andere tierische Seren (Bowen-Pope et al., 1989). Sie zeigten weiterhin, dass sich die getesteten Seren bei der Verteilung der PDGF-Isoformen unterschieden. HS war im Gegensatz zu FCS und anderen tierischen Seren besonders reich an PDGF-AA und -AB. Aufgrund der Bedeutung von PDGFs für die Proliferation von MSCs könnten also Unterschiede in deren Konzentration für die beobachtete stärkere Proliferation in HS-Kultur verantwortlich sein. Nimura et al. vermuteten, dass der stärkere mitogene Effekt von HS auf der zusätzlichen mitogenen Wirkung von PDGF-AA und -AB beruht (Nimura et al., 2008).

Die Unterschiede in der Konzentration und Zusammensetzung von PDGFs von HS und FCS liefern eine plausible Erklärung für die beobachtete stärkere Proliferation der AT-MSCs in HS. Denkbar ist auch, dass Unterschiede im Gehalt anderer für die MSC-Proliferation wichtiger Wachstumsfaktoren wie  $\beta$ -FGF, TGF- $\beta$ 1 und EGF für die stärkere Proliferation in HS verantwortlich sind.

### 3.3. Auswirkungen der Langzeitkultur auf AT-MSCs

Zu Beginn der Kultivierung zeigten AT-MSCs in HS- und FCS-Kultur eine für MSCs typische Morphologie. Mit zunehmender Kulturdauer wurden die Zellen größer, abgeflacht und zeigten unregelmäßigere Umrisse. Außerdem nahm die Granularität der Zellen zu. Insgesamt wurden die AT-MSCs im Laufe der Langzeitkultur heterogener in Größe und Granularität. Diese morphologischen Veränderungen fanden sich sowohl bei AT-MSCs aus HS- als auch aus FCS-Kultur und wirkten sich ähnlich auf den Phänotyp der Zellen aus. Diese Veränderungen wiesen auf die Entwicklung eines seneszenten Phänotyps in den untersuchten Kulturen hin, wie er in der Literatur bereits vielfach beschrieben ist (u.a. Blazer et al., 2002; Bonab et al., 2006; Wagner et al., 2008; Lee et al., 2009).

#### 3.3.1. Auswirkungen der Langzeitkultur auf die Proliferation

Neben den morphologischen Veränderungen zeigte sich die *in vitro* Alterung in der vorliegenden Arbeit auch anhand der Proliferationsfähigkeit der untersuchten Populationen.

Die Bestimmung der Wachstumskinetik zeigte, dass die höchste Populationsverdopplungsrate der AT-MSCs in dem Medium mit HS-Supplement innerhalb der ersten zwei, in dem mit FCS-Supplement innerhalb der ersten drei Passagen erreicht wurde. In diesen Passagen war auch die Passagendauer am kürzesten. In den folgenden Passagen stieg die durchschnittliche Passagendauer und die Populationsverdopplungsrate sank. Auch die Analyse der Expression des PCNA-Proteins der BrdU-Inkorporation und die Zellzyklusverteilung lieferten Belege für den Rückgang der Proliferation. Somit kann der Rückgang der Proliferation als eine Folge der Langzeitkultur identifiziert werden.

Mittels der Zellzyklusanalyse konnte eine Akkumulation der Zellen in der G0/G1-Phase festgestellt werden. Es wird angenommen, dass zelluläre Seneszenz und der damit verbundene Zellzyklusstop im Wesentlichen durch zwei unabhängige Mechanismen verursacht werden (Herbig et al., 2004). Bei einem der Mechanismen kommt es – ausgelöst durch Telomerverkürzung – zur Aktivität des Tumorsuppressors

p53, einem Protein, das auch an der Regulation von Stresssignalen der Zellen beteiligt ist (Herbig et al., 2004). P53 aktiviert die Expression von p21, eines Inhibitor von cyclin-abhängiger Kinasen (cyclin dependent kinase, CDK), welches wiederum die Phosphorylierung und damit die Inaktivierung des Retinoblastomproteins (pRB) verhindert. Diese Inaktivierung ist jedoch für die Zellzyklusprogression von der G1- zur S-Phase erforderlich und deren Verhinderung verursacht daher einen Zellzyklusstop. Der zweite Mechanismus führt über die Aktivierung des CDK-Inhibitors p16 ebenfalls durch Verhinderung der Inaktivierung von pRB zu einem Zellzyklustop (Rheinwald et al., 2002). Es wird angenommen, dass die Aktivierung von p16 jedoch nicht durch Telomerverkürzung induziert wird, sondern durch andere kulturbedingte Stressfaktoren, wie oxidativen oder mitogenen Stress (Herbig et al., 2004; Lee et al., 2009).

Der hier beobachtete Zellzyklusstop und der Rückgang des Anteils proliferierender Zellen könnte ebenfalls durch Telomerverkürzung oder zellulären Stress hervorgerufen und damit ein Anzeichen für zelluläre Seneszenz sein, da AT-MSCs in HS- und FCS-Kultur nach längerer Kulturdauer sowohl p16 als auch p21 exprimieren (Bieback et al., Manuskript eingereicht).

### ***3.3.2. Der Verlust des adipogenen Differenzierungspotentials***

Während der Langzeitkultur war sowohl in Kultur mit HS- als auch mit FCS-Supplement eine eindeutige adipogene Differenzierung auch noch nach längerer *in vitro* Kultur nachweisbar. Die untersuchten AT-MSCs zeigten auch noch nach Passage 6 bzw. 7 eindeutig eine adipogene Differenzierung. Kocaoemer et al. berichteten ebenfalls über einen Erhalt des adipogenen Differenzierungspotentials der HS- als auch der FCS-Kultur für einen langen Zeitraum (Kocaoemer et al., 2007).

Ein signifikanter Rückgang des Anteils adipogen differenzierter Zellen zeigte sich in der vorliegenden Arbeit erst nach Passage 8. Somit konnte erst nach relativ langer Kulturdauer ein Funktionsverlust der MSCs festgestellt werden. Ein Rückgang des adipogenen Differenzierungspotentials während der Langzeitkultur in FCS-supplementiertem Medium wurde schon von verschiedenen anderen Gruppen berichtet (Bonab et al., 2006; Noer et al., 2009). Die eigenen Daten zeigten darüber hinaus einen Verlust des

---

adipogenen Differenzierungspotentials auch für MSCs aus HS-Kultur. Grundsätzliche Unterschiede in der adipogenen Differenzierungsfähigkeit von AT-MSCs aus HS- und FCS-Kultur konnten nicht festgestellt werden.

Die Beobachtung, dass die Frequenz der adipogen differenzierten Zellen bis Passage 6/7 relativ konstant war lässt vermuten, dass sich die Langzeitkultur weniger stark auf das adipogene Differenzierungspotential auswirkt als beispielsweise auf die Proliferation der AT-MSCs. Andererseits zeigen Analysen der Triglycerid-Konzentration von AT-MSCs aus HS- und FCS-Kultur, die parallel zu den eigenen Versuchen im Labor von Karen Bieback durchgeführt wurden, einen Rückgang der Triglyceride bereits nach mittlerer Kulturdauer (Bieback et al. Manuskript eingereicht). Es ist daher möglich, dass die Zellen zwar adipogen differenzierten, die Ausprägung der Differenzierung jedoch schwächer war.

Eine Studie von Alves et al. erbrachte Hinweise auf mögliche Ursachen des Verlustes des Differenzierungspotentials (Alves et al., 2009). Sie zeigte, dass MSCs mit fortschreitender Kulturdauer DNA-Schäden akkumulierten und parallel dazu verstärkt Proteine des DNA-Schädigung-Signalweges wie phosphoryliertes p53, p16 und p21 in den Zellen nachweisbar waren. In weiteren Experimenten konnten Alves et al. zeigen, dass das Differenzierungspotential von MSCs bereits durch moderaten oxidativen Stress reduziert werden konnte. Sie vermuteten daher, dass die zunehmende Schädigung der DNA für den Rückgang des Differenzierungspotentials verantwortlich war. Da p16 und p21 auch nach Langzeitkultur von AT-MSCs in HS- bzw. FCS-Supplement exprimiert werden (Bieback et al. Manuskript eingereicht), könnten für den Verlust des adipogenen Differenzierungspotentials in der vorliegenden Arbeit ebenfalls DNA-Schäden verantwortlich sein. Möglicherweise wird der Verlust des adipogenen Differenzierungspotentials auch durch den Verlust der Proliferationsfähigkeit der Zellen verursacht. Studien haben nämlich gezeigt, dass es während der adipogenen Differenzierung zu einer Phase mitotischer klonaler Expansion der Zellen kommt, bevor sie in die post-mitotische Phase ausdifferenzierter Adipozyten übergehen (Morrison & Farmer, 1999; Tang et al., 2003). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass diese mitotische Aktivität Voraussetzung für die folgende adipogene Differenzierung ist (Tang et al., 2003). Der Verlust der Proliferationsfähigkeit in seneszenten Zellen während der Langzeitkultur könnte daher eine adipogene Differenzierung verhindert haben.

### ***3.3.3. Auswirkungen auf die Expansionsfähigkeit***

Die Ergebnisse zeigten, dass der Rückgang der Proliferation (BrdU, Zellzyklusanalyse) absolut betrachtet in HS-Kultur in der Regel deutlich stärker ausfiel als in FCS-Kultur. Ein höheres Expansionspotential der AT-MSCs aus FCS-Kultur konnte jedoch nicht festgestellt werden. Die maximal erreichte Anzahl CPDs war im Gegenteil sogar in zwei der HS-Kulturen höher als in den FCS-Kulturen der gleichen Spender. Sie wiesen eher darauf hin, dass die HS-Kultur ein höheres Expansionspotential der Zellen ermöglicht.

Zelluläre Seneszenz begrenzt die Expansionsfähigkeit von Zellen. Sie kann durch vielfältige Faktoren ausgelöst werden. Äußere Faktoren, die zur Ausbildung von Seneszenz führen, sind beispielsweise die Exposition mit DNA-schädigenden Substanzen (Robles & Adami, 1998), oxidativer Stress (Jin et al., 2009) aber auch die Bedingungen, unter denen die Zellen kultiviert werden. So berichten einige Studien, dass Kulturbedingungen wie der Glucosegehalt im Kulturmedium (Blazer et al., 2002; Stolzing et al., 2006) sowie das verwendete Serum (Shahdadfar et al., 2005; Duggal & Brinchmann, 2011) Seneszenz auslösen können. Das Expansionspotential wird zudem von der Dichte, in der die MSCs ausgesät werden, beeinflusst (Cholewa et al., 2011). Daneben sind es Eigenschaften der Zellen selbst, die Seneszenz auslösen können, wie beispielsweise die Expression von Onkogenen (Di Micco et al., 2006) und der Verlust der Telomerlänge (Baxter et al., 2004). Da in der vorliegenden Arbeit die Kulturbedingungen mit Ausnahme des verwendeten Serums gleich waren, sind Unterschiede im Expansionspotential der Zellen wahrscheinlich auf Unterschiede in der Telomerlänge oder des verwendeten Serums zurückzuführen.

### ***3.3.4. Einfluss der Telomerverkürzung auf das Expansionspotential***

Ein Verlust der Telomerlänge konnte während der Langzeitkultur der AT-MSCs unter beiden Kulturbedingungen festgestellt werden. Der Rückgang der Telomerlänge war für die AT-MSCs in HS- und FCS-Kultur vergleichbar.

Für MSCs und andere Zellen ist ein Zusammenhang zwischen dem Verlust der Telomerlänge und der Ausbildung von Seneszenz in einer Vielzahl von Arbeiten beschrieben (Harley et al., 1990; Allsopp et al., 1992; Baxter et al., 2004; Herbig et al., 2004). MSCs exprimieren keine Telomerase und zeigen auch keine Telomeraseaktivität (Zimmermann et al., 2003; Bernardo et al., 2007). Daher kommt es während der *in vitro* Kultur zum Verlust der Telomerenden während der Replikation, wie er auch in den eigenen Versuchen festgestellt wurde. Beim Erreichen einer kritischen Telomerlänge kommt es dann zur Ausbildung von replikativer Seneszenz (Harley et al., 1990; Baxter et al., 2004). Die Bedeutung der Telomerlänge für das Expansionspotential zeigen auch Studien, in denen durch ektopische Expression von *hTert* die replikative Lebensdauer von MSCs (Simonsen et al., 2002; Kobune et al., 2003) und anderen humanen Zelltypen (Bodnar et al., 1998; Steinert et al., 2000) deutlich verlängert werden konnte.

Auch die eigenen Daten lieferten Hinweise auf einen Einfluss des Telomerverlustes auf das Expansionspotential. So hatten zum Beispiel die beiden Kulturen, die auch die niedrigste Expansionskapazität offenbart hatten (LA 23FCS, LA 27HS), bereits zu Beginn der Kultivierung eine deutlich niedrigere RTL als die anderen getesteten Kulturen. Ein solcher Zusammenhang zwischen Telomerlänge und Expandierbarkeit wurde zum Beispiel von Baxter et al. für BM-MSCs beschrieben. In ihrer Studie konnte durch die Bestimmung der Telomerlänge zu Beginn der Kultivierung das Expansionspotential von BM-MSCs vorhergesagt werden (Baxter et al., 2004). Dieser Zusammenhang wird auch in den eigenen Daten erkennbar.

Auf diesem Wege nicht erklärbar ist hingegen der Unterschied in der RTL zwischen der HS- und der FCS-Kultur des Spenders LA 23. Denn eine besonders niedrige RTL konnte für LA23 HS, anders als für LA23 FCS nicht festgestellt werden. Außerdem zeigte LA 23 HS im Gegensatz zu LA 23 FCS ein starkes Wachstum und eine normale Expansionskapazität. Da die Kulturen zur gleichen Zeit aus demselben Spender isoliert wurden, müssen die Unterschiede in der Telomerlänge aufgrund anderer Umstände entstanden sein. Denkbar wäre, dass die Kultur LA 23 FCS einen niedrigeren Anteil Vorläuferzellen enthielt und deshalb bis zum Erreichen von Passage 1 mehr Zellteilungen durchlaufen hatte. Der Telomerverlust könnte deshalb vor der Messung stärker ausgefallen sein.



Es wurden also Hinweise für ein Einfluss der Telomerlänge auf das Expansionspotential gefunden. Dieser Einfluss erklärt jedoch nicht die Unterschiede im Expansionspotential zwischen HS und FCS. Denn die Messung der RTL zeigte, dass der durchschnittliche Telomerverlust pro Populationsverdopplung bei den AT-MSCs aus HS- und FCS-Kultur ähnlich war. Der Rückgang der RTL korrelierte dabei im Laufe der Kultur gut mit der Zunahme der CPD zum Zeitpunkt der Messung. Folglich ist es unwahrscheinlich, dass die festgestellten Unterschiede im Expansionspotential zwischen HS- und FCS-Kultur auf Unterschiede im Telomerverlust zurückzuführen sind.

### ***3.3.5. Einfluss des Serums auf die Expansionsfähigkeit der AT-MSCs***

In den Experimenten der vorliegenden Arbeit waren mit Ausnahme des Serums die äußeren Bedingungen der Kultur der AT-MSCs gleich. Unterschiede im Expansionsvermögen von HS- und FCS- kultivierten Zellen konnten deshalb auf das verwendete Serum zurückgeführt werden.

Kocaoemer et al. fanden im Gegensatz zu den eigenen Ergebnissen hinsichtlich der Expansionskapazitäten von AT-MSCs in HS- und FCS-Kultur keine Unterschiede (Kocaoemer et al., 2007). Für andere humane Supplemente wurde ein höheres Expansionspotential jedoch bereits beschrieben. So erreichten bei Cholewa et al. AT-MSCs bei Verwendung von Blutplättchenlysat höhere CPDs als in konventioneller Kultur mit FCS-Supplement (Cholewa et al., 2011) Die Arbeit von Cholewa et al. zeigt, dass das Expansionspotential von AT-MSCs durch die Wahl des Supplements beeinflusst werden kann.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass HS ein höheres Expansionspotential ermöglicht. Ein Einfluss des Telomerverlustes auf das Expansionspotential konnte festgestellt werden, dieser war jedoch unter beiden Kulturbedingungen vergleichbar hoch und erklärt deshalb nicht die Unterschiede im Expansionspotential. Die Verwendung von HS-supplementiertem Medium ermöglicht also eine schnellere und effizientere Expansion der AT-MSCs.

### 3.4. Abwägung der Seren für die *in vitro* Kultivierung von AT-MSCs

Die Langzeitkultur von AT-MSCs führte sowohl bei der Verwendung von HS- als auch bei FCS-Supplement zur Ausbildung von Seneszenz. Dies wirkte sich auf die Morphologie, das Differenzierungspotential und vor allem auf die Proliferationsfähigkeit der Zellen aus. Gerade im Hinblick auf das Proliferationsvermögen waren aber deutliche Vorteile des HS-Supplements erkennbar, da die Proliferation deutlich stärker ausfiel. Darüber hinaus zeigten die HS-Kulturen ein höheres Expansionspotential. In Bezug auf das adipogene Differenzierungspotential unterschieden sich beide Kulturen nicht. Auch andere Eigenschaften wie Immunsuppression, osteogene Differenzierung aber auch die Expression von Markern waren in HS-Kultur unverändert (Bieback et al. Manuskript eingereicht).

AT-MSC-Kultur in Medium mit HS-Supplement bietet darüber hinaus andere Vorteile gegenüber der FCS-Kultur. In erster Linie ist dabei die Vermeidung von tierischen Proteinen für die MSC-Kultur zu sehen, da die Kultur mit FCS zu Aufnahme boviner Proteine in die MSCs führt (Spees et al., 2004). Dies kann zu einer Immunreaktion des Empfängers auf die Spenderzellen führen. Auch Zooanthroponosen sind ein mögliches Risiko beim Einsatz von FCS in der regenerativen Medizin (WHO, 1997). Durch die Verwendung von HS könnten die Risiken durch die Übertragung xenogenen Materials und von Zooanthroponosen jedoch vermieden werden. Ein weiterer Vorteil der HS-Kultur ist die Tatsache, dass in HS-Kultur schneller die für eine Therapie notwendigen Zellzahlen erreicht werden können. Verschiedene Studien haben die negativen Auswirkungen unphysiologischer Kulturbedingungen beschrieben. So verursacht die im Vergleich zu physiologischen Bedingungen vorherrschende erhöhte Sauerstoffkonzentration während der *in vitro* Kultur eine vorzeitige Alterung der Zellen und Schädigungen der DNA (Alves et al., 2009; Jin et al., 2009). Außerdem steigt womöglich durch eine lange Kulturdauer auch das Risiko onkogener Transformationen der Zellen, wie sie z.B. von Rubio et al. für *in vitro* kultivierte AT-MSCs beschrieben wurde (Rubio et al., 2005). Daneben berichten Studien von der Ausbildung von Aneuploidien nach *in vitro* Kultur von murinen und humanen Stammzellen (Baker et al., 2007; Vukicevic et al., 2010). Daher erscheint grundsätzlich empfehlenswert, die Kulturdauer von MSCs auf ein Minimum zu reduzieren. Dies ist durch die stärkere Proliferation der AT-MSCs in HS-Kultur möglich. Allerdings bleibt noch zu zeigen, dass

HS-Kultur von AT-MSCs die genannten Risiken der Zellkultur verringern kann. Die HS-Kultur erscheint jedoch aufgrund der möglichen Risiken von Immunreaktionen durch xenogene Bestandteile des FCS und der Vorteile, die in dieser Arbeit gezeigt wurden, als die bessere Alternative.

## 4. Material und Methoden

### 4.1. Material

#### 4.1.1. Mäuse

| Mauslinie | Verwendung                        | Herkunft                    |
|-----------|-----------------------------------|-----------------------------|
| NMRI      | Blastozystendonor/<br>Rezipienten | Harlan Winkelmann, Borchten |

Die Haltung und Vermehrung der Tiere erfolgte in der Verstuchstierhaltung des Instituts für Medizinische Strahlenkunde und Zellforschung (MSZ) unter Einhaltung der Tierschutzrichtlinien der Regierung von Unterfranken.

#### 4.1.2. Humane MSCs

Die verwendeten humanen Stammzellpräparationen wurden von unserem Kooperationspartner Karen Bieback (Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie des DRK-Blutspendedienstes Baden Württemberg-Hessen GmbH, Mannheim) im Einklang mit dem Ethik Votum der Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg präpariert und zur Verfügung gestellt. Die gesunden Stammzellspender waren komplett anonymisiert.

| Zellen            | Ursprungsgewebe | Bezugsquelle                        |
|-------------------|-----------------|-------------------------------------|
| AT-MSCs           | Lipoaspirat     | Dr. Karen Bieback,<br>Mannheim      |
| CB-MSCs           | Nabelschnurblut | Dr. Karen Bieback,<br>Mannheim      |
| BM-MSCs           | Knochenmark     | Dr. Karen Bieback,<br>Mannheim      |
| CD 271+ BM-Zellen | Knochenmark     | Dr. Heinrich Lannert,<br>Heidelberg |

## 4.2. Zellkultur und Differenzierungsmedien

### **MSC-Wachstumsmedium mit FCS-Supplement**

440 ml DMEM low Glucose (BE12-707F, Lonza)

+60 ml hMSC MSCGM Singlequots® (PT-4105, Lonza)

beinhaltet: 50ml MSCGS (FCS) (PT-4106E), 10ml L-Glutamine (L-Glut) (PT-4107E),  
0,5ml Penicilin (Pen) /Streptomycin (Strep) (PT-4108E)

### **MSC-Wachstumsmedium mit HS-Supplement**

440 ml DMEM low Glucose (BE12-707F, Lonza)

+50 ml HS (Dr. Karen Bieback)

+5ml L-Glut (200 mM, PAA Laboratories)

+5ml Pen/Strip (je 10000 U/ml, PAA Laboratories)

### **Osteogenes Differenzierungsmedium**

170 ml Osteogenic basal medium (PT-3924, Lonza)

+30 ml hMSC Osteogenic Singlequots® (PT-4120, Lonza)

beinhaltet: 20ml MSCGS (FCS) (PT-4134F), 4ml L-Glut (PT-4140F), 2ml Pen/Strep  
(PT-4133F), 2ml  $\beta$ -Glycerophosphat (PT-4110F) 1ml Dexamethason (PT-4109F),  
1ml Ascorbat (PT-4111F)

### **Adipogenes Differenzierungsmedium:**

170 ml Adipogenic induction medium (PT-3102B, Lonza)

29,6 ml hMSC Adipogenic Induction SingleQuots® (PT-4135, Lonza)

beinhaltet: 20ml MSCGS (FCS) (PT-4134B), 4ml L-Glut (PT-4140B), 2ml Pen/Strep  
(PT-4133B), 2ml Insulin (PT-4119B) 1ml Dexamethason (PT-4132B), 0,4ml  
Indomethacin (PT-4117B), 0,2ml IBMX (PT-4118B)

**Adipogenes Erhaltungsmedium:**

170 ml adipogenic maintenance medium (PT-3102B, Lonza)

28 ml hMSC adipogenic maintenance SingleQuotes® (PT-4122, Lonza)

beinhaltet: 20ml MSCGS (FCS) (PT-4134A), 4ml L-Glut (PT-4140A), 2ml Pen/Strep (PT-4133A), 2ml Insulin (PT-4119A)

**Inkomplettes chondrogenes Differenzierungsmedium:**

170 ml adipogenic induction medium (PT-3102B, Lonza)

29,6 ml hMSC chondrogenic SingleQuotes® (PT-4121, Lonza)

beinhaltet: 4ml L-Glut (PT-4140G), 2ml Pen/Strep (PT-4133G), 2ml Ascorbat (PT-4131G) 2ml Prolin (PT-4115G), 2ml Pyruvat (PT-4114G), 2ml IST+Supplement (PT-4113G)

Zur Herstellung des **chondrogenen Differenzierungsmedium** wurde kurz vor der Verwendung je 0,5 µg TGF-β3 (PT-4124 Lonza) pro ml frisch zugefügt.

**4.2.1. Antikörper**

**primäre Antikörper:**

| <b>Antikörper-spezifität</b> | <b>Klon</b>   | <b>Isotyp</b>   | <b>Hersteller</b>  |
|------------------------------|---------------|-----------------|--------------------|
|                              |               |                 | Kat.Nr.:61015      |
| Bromdesoxyuridine            | BU5.1         | Maus            | Progen, Heidelberg |
|                              |               |                 | Kat.Nr.:11434      |
| PCNA                         | PC10          | Maus            | Progen, Heidelberg |
|                              |               |                 | Kat.Nr.:GP13       |
| Vimentin                     | polyclonal    | Meerschweinchen | Progen, Heidelberg |
| Pan epithelial Keratin       | Ks 5+8.22/C22 | Maus            | Kat.Nr.:61031      |

|       |      |       |  |
|-------|------|-------|--|
| Aktin | I-19 | Ziege | Progen, Heidelberg<br>Kat.Nr.:SC-1616<br>Santa Cruz, |
|-------|------|-------|--|

**sekundäre Antikörper:**

| Antikörperspezifität | Markierung | Hersteller |
|----------------------|------------|------------|
| Maus                 | Fitc       | Chemicon   |
| Maus                 | Cy3        | Chemicon   |
| Meerschweinchen      | Fitc       | Chemicon   |
| Maus oder Ziege      | HRP        | Amersham   |

**4.3. Chemikalien**

**4.3.1. Puffer und Lösungen**

Hypotoner-Lyse-Puffer: 2% Triton X-100 in 0.1M Zitratpuffer

PBS: 137mM NaCl, 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4,3mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,7 mM KCl, pH 7,3 in H<sub>2</sub>O

TE-Puffer: 10 mM Tris pH 8,0; 0,2mM EDTA

Lysis-Puffer: 10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 0.5 % SDS, pH 8.0 in H<sub>2</sub>O

FACS-Puffer: PBS, 0.3 % BSA, 0.1% NaN<sub>3</sub> , pH 7.4

Flow-FisH-Puffer: 62,7ml Formamid (deionisiert) + 3,72ml H<sub>2</sub>O, 1ml Tris, pH 7.1 (1M) + 1ml 1M NaCl + 8,37ml 10% BSA + 1ml 1M NaCl

Zitratpuffer: 10mM pH 6 9 mL 0.1 M Zitronensäure in H<sub>2</sub>O + 41mL 0.1M Natriumzitratdihydrat H<sub>2</sub>O + 450 mL H<sub>2</sub>O

20 x SSC 3 M NaCl, 0,3 M Na<sub>3</sub>-Citrat\*2H<sub>2</sub>O, pH 7,0

**4.3.2. Chemikalien**

|                            |                         |
|----------------------------|-------------------------|
| Borsäure                   | Applichem, Darmstadt    |
| Bovines Serumalbumin (BSA) | PAA Laboratories, Cölbe |

|                                       |                               |
|---------------------------------------|-------------------------------|
| DAPI                                  | Sigma-Aldrich, Schnelldorf    |
| DEPC                                  | Applichem, Darmstadt          |
| Dimethylformamid                      |                               |
| Dimethylsulfoxid (DMSO)               | Sigma-Aldrich, Schnelldorf    |
| dNTPs                                 | Gibco Invitrogen, Karlsruhe   |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)   | Applichem, Darmstadt          |
| Essigsäure                            | Applichem, Darmstadt          |
| Ethanol                               | Applichem, Darmstadt          |
| Fluorescence mounting medium          | Dako, Hamburg                 |
| Formamid deionisiert                  | Applichem, Darmstadt          |
| Glycerol                              | Applichem, Darmstadt          |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30 % ) | Applichem, Darmstadt, Germany |
| humanes Choriogonadotropin (hCG)      | Intervet, Unterschleißheim    |
| HCl, 37%                              | Applichem, Darmstadt          |
| Isopropanol                           | Applichem, Darmstadt          |
| M2 Medium                             | Sigma-Aldrich, Schnelldorf    |
| M16 Medium                            | Sigma-Aldrich, Schnelldorf    |
| Magermilchpulver                      | Roth, Karlsruhe               |
| Methanol                              | Applichem, Darmstadt          |
| Natriumchlorid (NaCl)                 | Applichem, Darmstadt          |
| Natriumdodecylsulfat (SDS)            | Sigma-Aldrich, Schnelldorf    |
| Natriumhydroxid                       | Applichem, Darmstadt          |
| di-Natriumtetraborat                  | Applichem, Darmstadt          |
| Natriumzitatdihydrat                  | Applichem, Darmstadt          |
| Paraformaldehyd (PFA)                 | Applichem, Darmstadt          |
| Phenol-Chloroform                     | Applichem, Darmstadt, Germany |



|   |   |
|---|---|
| Potassium chloride  | Applichem, Darmstadt, Germany                             |
| Safranin O  | Sigma-Aldrich, Schnelldorf                                |
| Stutenserumgonadotropin (PMSG;<br><i>Pregnant mare serum gonadotropin</i> ) | Intervet, Unterschleißheim, Germany                       |
| TRIZMA (Tris)   | Applichem, Darmstadt                                      |
| Triton X-100  | Fluka BioChemika (Sigma-Aldrich),<br>Schnelldorf, Germany |
| Trypanblau  | Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Germany                       |
| Tween 20  | Gibco Invitrogen, Karlsruhe                               |
| Wasser Ultra pure   | Merck, Darmstadt  |
| Ziegen-Serum  | Sigma-Aldrich, Schnelldorf                                |

#### **4.3.3. Enzyme, Kits und Reagenzien**

|                                 |                            |
|---------------------------------|----------------------------|
| Alkaline Phosphatase Kit        | Sigma-Aldrich, Schnelldorf |
| ABsolute SybrGreen Mix          | ThermoFisher, Germany      |
| Meyer's Hämatoxylin             | Sigma-Aldrich, Schnelldorf |
| Pepsin (66U/m)                  | Sigma-Aldrich, Schnelldorf |
| Proteinase K (10U/μl)           | Sigma-Aldrich, Schnelldorf |
| Super Taq (5000U/ml) und Puffer | HT Biotechnology           |
| RNase 15U/μl                    | Sigma-Aldrich, Schnelldorf |
| DNase                           | Sigma-Aldrich, Schnelldorf |

#### **4.3.4. Nukleotide und Nukleotidanalogue**

*Primer:*

Die Primersynthese wurde durchgeführt durch die MWG-Biotech AG (Ebersberg).

| Zielsequenz  | Primer-orientierung | Primersequenz                                |
|--|---------------------|--|
| Humanes $\beta$ -Globin<br>(Bungert et al., 1995)                | sense               | 5'-ACA CAA CTG TGT TCA CTA GCA<br>ACC TCA-3' |
|  | antisense           | 5'-GGT TGC CCA TAA CAG CAT<br>CAG GAG T-3'   |
| Myogenin<br>(Müller et al., 1994)                                | sense               | 5'-TTA CGT TCG TGG ACA GC-3'                 |
|  | antisense           | 5'-TGG GCT GGG TGT TAG TCT TA-3'             |
| 17 alpha mod<br>(Warburton et al., 1991;<br>Becker et al., 2002) | sense               | 5'-GGG ATA ATT TCA GCT GAC TAA<br>ACA G-3'   |
|  | antisense           | 5'-AAA CGT CCA CTT GCA GAT TCT<br>AG-3'      |
| Myogenin   | sense               | 5'-TCC CTT ACG TCC ATC GTG GA-3'             |
|  | antisense           | 5'-CAG TTG GGC ATG GTT TCG TC-3'             |

Taqman Sonde:

Die Synthese der Taqman-Sonden wurde durchgeführt von der MWG-Biotech AG (Ebersberg)

|                                    |   |
|------------------------------------|---|
| 17 alpha mod (Becker et al., 2002) | 5'- <b>6-FAM</b> -CAC GTT TGA AAC ACT CTT<br>TTT GCA GGA TC- <b>TAMRA</b> -3'     |
| Myogenin                           | Sonde: 5'- <b>6-FAM</b> -TCA CGG TGG AGG<br>ATA TGT CTG TTG CCT- <b>TAMRA</b> -3' |

DNA-Sonde Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH):

Star\*FISH human pan-Centromeric Probes FITC (Kat.Nr.: 1695-F-02) und Cy3 (Kat.Nr.: 1695-Cy3-02) markiert (Cambio Ltd, , Cambridge, UK)

Peptid nukleinsäure Sonde:

Telomer-PNA probe FITC markiert (Kat.Nr.:F1009; Panagene, Daejeon, Korea)

Probe: FITC-OO-CCCTAA-CCCTAA-CCCTAA

**4.3.5. Verbrauchsmaterialien**

|  |   |
|--|---|
| Deckglässchen  | Hartenstein Laborbedarf, Würzburg           |
| Einfrierröhrchen   | PAA   |
| Einmalhandschuhe   | Kimberly-Clark, Koblenz                     |
| Eppendorf Reaktionsgefäße<br>(0,5 mL und 1,5 mL und 2mL) | Eppendorf AG, Wesseling-Berzdorf            |
| FACS Röhrchen  | Greiner Bio One, Essen                      |
| Kammerobjektträger                                       | BD Biosciences, Heidelberg,                 |
| Kanülen B.   | Braun, Melsungen,<br>Dispomed, Gelnhausen   |
| Parafilm   | M Brand, Wertheim                           |
| Pipettenspitzen  | Hartenstein Laborbedarf, Würzburg           |
| Einmal-Skalpelle   | Ratiomed, Schloß Holte-Stukenbrock          |
| Sterilfilter   | Schleicher & Schuell, Dassel,               |
| Super-Frost® Plus Objektträger                           | Menzel-Gläser, Braunschweig                 |
| Zellkulturflaschen<br>T25, T75 und T175                  | Greiner Bio One, Essen;<br>Nunc, Wiesbaden, |
| Zellsiebe (70 µm)  | BD Biosciences, Heidelberg,                 |
| Zentrifugenröhrchen<br>(15 mL & 50 mL)                   | Greiner Bio One, Essen                      |

**4.3.6. Instrumente**

|  |   |
|--|---|
| BioPhotometer                          | Eppendorf, Wesseling-Berzdorf   |
| Digitalkamera                          | Olympus, Hamburg  |
| FACS Diva Durchflusscytometer          | BD Biosciences, Heidelberg  |
| Feinwaage                              | Sartorius, Göttingen, Germany   |
| Gefrierkontainer                       | Nalgene, Hereford, UK   |
| Hybaid OmniSlide in situ Thermocycler  | Thermo Scientific , Dreieich  |
| Inkubator                              | Thermo Scientific , Dreieich  |
| Inversionsmikroskop                    | Carl Zeiss, Jena  |
| Neubauer improved Zählkammer           | Marienfeld, Lauda-Königshofen   |
| pH-Meter                               | Knick, Berlin   |
| Pipetten                               | Gilson, Middleton, WI, USA  |
| Rotor-Gene 3000 Real Time PCR-Maschine | Corbett Life Sciences (Quiagen)   |
| Sterilbank                             | Heraeus, Hanau  |
| Vortexer                               | Scientific Industries, New York, USA  |
| Zentrifugen                            | Hettrich Zentrifugen Tuttlingen;<br>Thermo Scientific, Dreieich;<br>Eppendorf, Wesseling-Berzdorf |
| Wasserbad                              | GFL Gesellschaft für<br>Labortechnik, Burgwede  |

**4.3.7. Verwendete Software:**

Excel (Microsoft), FACSDiva (Becton, Dickinson), Flowjo (Tree Star) ImageJ, Micron EVOS (AMG), Modfit Lt (Verity Software House), Origin 8 (OriginLab), RotorGene 6 Software (Corbett),

---

## 5. Methoden

### 5.1. Isolation von humanen MSCs

CB-, BM und AT-MSCs wurden isoliert und initial kultiviert von unserem Kooperationspartner Karen Bieback (Mannheim). Die Zellpräparationen wurden dann zur weiteren Analyse zur Verfügung gestellt. Die Präparation dieser MSCs wurde durchgeführt wie beschrieben in Bieback et al., 2004 und Zuk et al., 2002.

#### Isolation von humanen MSCs in Kürze :

##### CB-MSCs

CB-MSCs wurden durch Punktion der Nabelschnur bei ungeborener Plazenta gewonnen. Dem gewonnenen Nabelschnurblut wurde zur Verhinderung der Koagglutination Zitrat-Phosphat-Dextrose zugesetzt. Zur Gewinnung von mononukleären Zellen wurde dem Nabelschnurblut das gleiche Volumen PBS/2mm EDTA zugesetzt und die Monozyten über Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation bei 435 g, 30 min und RT aus der entstandenen Interphase isoliert. Nach drei Waschschrritten in PBS wurden die Zellen in der Dichte  $1 \times 10^6$  ausgesät. Die Kultivierung erfolgte dann in MSC-Wachstumsmedium mit FCS-Supplement bei 37 °C 5 % CO<sub>2</sub>. Nicht adhärenzte Zellen wurden am folgenden Tag durch Medienwechsel entfernt.

##### BM-MSCs

BM-MSCs wurden aus Knochenmarksaspirat gewonnen. Dem Knochenmarksaspirat wurde ebenfalls Zitrat-Phosphat-Dextrose zugesetzt. Die gewonnene Knochenmarkszellsuspension wurde vor der Weiterverarbeitung im Verhältnis 1:5 mit PBS/2mmol EDTA verdünnt. Die übrige Isolation erfolgte wie oben beschrieben über Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation und Adhärenz an Zellkulturplastik. Zur initialen Kultivierung der Zellen wurde ebenfalls MSC-Wachstumsmedium mit FCS-Supplement verwendet.

## **AT-MSCs**

Zur Isolation von AT-MSCs wurde humanes Lipoaspirat aus kosmetischen Liposuktionen verwendet. Zum Entfernen roter Blutkörperchen und des Debris wurde das Lipoaspirat mit sterilem PBS gewaschen. Das gewaschene Lipoaspirat wurde mit 0,075 % Typ 1 Kollagenase bei 37 °C für 30 min unter leichtem Rühren enzymatisch dissoziiert. Die enzymatische Reaktion wurde dann mit gleichem Volumen DMEM 10 % FCS inaktiviert und die Zellsuspension für 10 min langsam zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in DMEM/10 % FCS resuspendiert und durch ein 100 µm Sieb filtriert. Das Filtrat wurde erneut zentrifugiert und das Pellet anschließend je nach Verwendungszweck in MSC-Wachstumsmedium mit FCS- oder HS-Supplement resuspendiert und in Zellkulturflaschen ausgesät.

### ***5.1.1. MSC-Kultur***

Als Kulturmedium wurde MSC-Wachstumsmedium mit FCS- oder HS-Supplement verwendet. Der Mediumwechsel erfolgte alle drei bis vier Tage durch kompletten Austausch des Wachstumsmediums. Bei Erreichen von 70-90 %iger Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Wachstumsmedium entfernt und die Zellen einmalig mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen enzymatisch gelöst (7.1.2) und die Gesamtzellzahl (7.1.3) bestimmt. Zur weiteren Kultivierung wurden CB-MSCs in der Dichte 1000 Zellen pro cm<sup>2</sup> und AT- bzw. BM-MSCs in der Dichte 200 Zellen pro cm<sup>2</sup> in neue Zellkulturflaschen ausgesät, .

### ***5.1.2. Trypsinisierung***

Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension und zum Ablösen der adhären wachsenden MSCs wurden die Zellen trypsinisiert. Dazu wurde zuerst das Wachstumsmedium durch Absaugen und anschließendes Waschen mit PBS vollständig entfernt. Die Zellen wurden dann bei 400 g (4 °C) zentrifugiert und das PBS durch erneutes Absaugen entfernt. Daraufhin wurden die MSCs durch Zugabe von Trypsin/EDTA-Lösung und Inkubation bei 37 °C für 4-8 min unter mikroskopischer Kontrolle enzymatisch abgelöst. Zum Abstoppen der Reaktion wurden MSC-

Wachstumsmedium zugefügt. Die Suspension wurde erneut zentrifugiert (400 g; 4 °C) und nach erneutem Absaugen in Wachstumsmedium resuspendiert.

### **5.1.3. Bestimmung der Lebendzellzahl in der Neubauer-Zählkammer**

Die Anzahl der lebenden Zellen wurde unter Verwendung einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dazu wurden 20 µl der Zellsuspension entnommen und mit 20 µl Trypanblau-Lösung vermischt. Von dieser Mischung wurden 10 µl auf die Neubauer Zählkammer aufgetragen und unter dem Mikroskop ausgezählt. Da lebende Zellen Trypanblau aktiv aus dem Zytoplasma transportieren und tote Zellen dies nicht können erscheinen lebende Zellen hell und tote Zellen blau. Die lebenden Zellen in den Großquadraten wurden gezählt und die Gesamtzellzahl konnte dann mit der Formel:

Anzahl lebender Zellen pro Großquadrat  $\times 2 \times 10^3 \times$  Ausgangsvolumen [ml] bestimmt werden.

### **5.1.4. Bestimmung der kumulativen Populationsverdopplungsrate**

Zur Berechnung der kumulativen Populationsverdopplungen (CPD) der kultivierten AT-MSCs wurde wie oben beschrieben die Gesamtzellzahl jeweils bei der Passagierung der Kulturen bestimmt. Ausgehend von der Anzahl der ausgesäten Zellen und der Zellzahl zum Zeitpunkt der Passagierung konnte die Anzahl der Populationsverdopplung (PD) berechnet werden.

$$\text{Formel: } PD = \frac{(\log N - \log N_0)}{\log 2}$$

$N_0$  =Zellzahl, die ausgesät wurde ; N= Zellzahl bei Passagierung

Die Anzahl der PD wurde jeweils in drei parallelen Ansätzen bestimmt. Zur Berechnung der CPD wurden die Mittelwerte der PD nach jeder Passage addiert.

### **5.1.5. Einfrieren von MSCs**

Zum Kryokonservieren der MSCs wurden die Zellen in Einzelzellsuspension überführt und die Zellzahl bestimmt. Die Zellen wurden dann in Aliquots von mindestens  $1 \times 10^5$  bis maximal  $1 \times 10^6$  eingefroren. Dazu wurden die MSCs zentrifugiert (400 g, 4 °C, 5 min) und nach Absaugen in jeweils 700 µl FCS pro Aliquot resuspendiert. Anschließend wurden 700 µl frisch vorbereitetes 2x-Einfriermedium (FCS 20 % DMSO) pro Kryo-Röhrchen vorgelegt und anschließend 700 µl Zellsuspension dazu pipettiert. Die Kryo-Röhrchen wurden dann innerhalb einer Isopropanol-gefüllten Einfrierbox (1 °C pro min) bei -80 °C gelagert.

### **5.1.6. Auftauen von MSCs**

Zum Auftauen von kryokonservierten MSCs wurden die gefrorenen Zellen bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut bis nur noch ein Kern aus Eis sichtbar war. Die Zellen wurden dann mit DMEM 10 % FCS gewaschen und nach Zentrifugation direkt in MSC-Wachstumsmedium resuspendiert.

### **5.1.7. Bromdesoxyuridin (BrdU) Einbau**

Zur Untersuchung des proliferativen Potentials der MSCs wurden BrdU-Puls-Markierungsexperimente durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden  $2 \times 10^5$  MSCs in eine T75 Zellkulturflasche ausgesät. Die Zellen wurden für zwei Tage in 10 ml MSC Wachstumsmedium kultiviert. Am dritten Tag wurde dem Wachstumsmedium 100 µl (100 µmol BrdU) zugeführt und 8 h weiter kultiviert. Die Zellen wurden anschließend enzymatisch gelöst (Trypsin) und zum Nachweis des eingebauten BrdU wurde eine Immunfärbung durchgeführt (7.5.3).



### **5.1.8. *in vitro* Differenzierung**

#### Chondrogene Differenzierung

Für die chondrogene Differenzierung wurden  $2,5 \times 10^5$  MSCs pro Ansatz benötigt. Die entsprechende Anzahl MSCs wurde in ein 15 ml Polypropylen-Röhrchen gegeben und bei 150 g für 5 min bei RT pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in inkomplettem chondrogenen Differenzierungsmedium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen wiederum bei 150 g (5 min bei RT) zentrifugiert. Das Medium wurde abgesaugt und durch 500  $\mu$ l chondrogenes Differenzierungsmedium ersetzt. In einer letzten Zentrifugation wurden die Zellen erneut bei 150 g (5 min bei RT) pelletiert und in dem 15 ml Röhrchen bei 37 °C (5 % CO<sub>2</sub>) mit locker aufliegendem Deckel als Pelletkultur kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte alle zwei bis drei Tage durch kompletten Austausch des chondrogenen Differenzierungsmediums. Die Differenzierung erfolgte ca. 21 Tage. Das Pellet wurde dann in Tissue Tek® Compound eingebettet und eingefroren (-20 °C). Zur Auswertung wurden dann Gefrierschnitte angefertigt und diese mit Safranin O gefärbt

#### Osteogene Differenzierung

Für die osteogene Differenzierung wurden die MSCs in einer Dichte von  $3,1 \times 10^3$  Zellen pro cm<sup>2</sup> in Vier-Kammer-Objektträgern ausgesät. Danach wurden die Zellen über Nacht bei 37 °C (5 % CO<sub>2</sub>) in MSC-Wachstumsmedium (500  $\mu$ l pro Kammer) inkubiert um die Anhaftung der MSCs zu gewährleisten. Am folgenden Tag wurde das MSC-Wachstumsmedium durch das osteogene Differenzierungsmedium ersetzt. Parallel zu den Differenzierungsansätzen wurden MSCs in gleicher Dichte in Vier-Kammer-Objektträgern ausgesät und mit MSC-Wachstumsmedium aber ohne Induktion durch osteogenes Differenzierungsmedium für den gleichen Zeitraum kultiviert. Sowohl der Differenzierungsansatz als auch der Ansatz ohne Differenzierungsbedingungen wurde dann für zwei bis drei Wochen kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte alle drei bis vier Tage durch Austausch des kompletten Mediums. Eine erfolgreiche osteogene Differenzierung wurde durch Nachweis der endogenen Alkalischen Phosphatase (7.2.2) gezeigt.

### adipogene Differenzierung

Die adipogene Differenzierung wurden  $2,1 \times 10^4$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  in Vier-Kammer-Objekträgern ausgesät. Die Zellen wurden anschließend in Wachstumsmedium expandiert bis sie Konfluenz erreichten. Die konfluenten MSCs wurden nun abwechselnd zuerst mit adipogenem Induktionsmedium für drei Tage oder Erhaltungsmedium ein bis zwei Tage kultiviert, Nach drei Zyklen Induktion und Erhalt war die Differenzierung abgeschlossen und die Differenzierungsansätze wurden mit Öl-Rot gefärbt (7.2.1).

## **5.2. Histologische Färbungen**

### **5.2.1. Öl-Rot-Färbung**

Die Auswertung der adipogenen Differenzierungsansätze erfolgte durch Färbung mit Öl-Rot. Öl-Rot färbt durch seine hydrophoben Eigenschaften die Lipidvakuolen reifer Adipozyten.

Nach Abschluss des Differenzierungszeitraums wurde das Medium aus den Kammern der Objekträger abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Zur Fixierung wurden die Zellen dann mit 10 % Formalin-Lösung für 30 min bei RT fixiert. Nach Abschluss der Fixierung wurde die Formalin-Lösung entfernt und Reste des Fixanz durch Waschen mit Aqua dest. entfernt. Die Zellen wurden dann in 60% Isopropanol für 3-5 min bei RT inkubiert. Die 60 % Isopropanol Lösung wurde dann durch Absaugen entfernt und durch die Öl-Rot-Färbelösung ersetzt. Die Zellen wurden für 5 min bei RT gefärbt. Anschließend wurde die Färbelösung entfernt. Überreste der Färbelösung wurden durch dreimaliges Waschen mit Leitungswasser entfernt. Die Zellkerne wurden dann mit Meyer's Hämatoxylin für 15 min bei RT gefärbt.

### **5.2.2. Nachweis Alkalischer Phosphatase (AP)**

Zum phänotypischen Nachweis einer osteogenen Differenzierung wurde die Aktivität der AP in den differenzierten Proben untersucht. Der Nachweis erfolgte über eine enzymatische Reaktion bei der durch die Aktivität der endogenen AP Phosphat von Naphthol AS-MX-Phosphat abgespaltet wurde. Das entstehende Produkt wurde dann mit einem Diazonimsalz (Vector Violet B) zu einem roten schwerlöslichen Präzipitat umgesetzt, welches lichtmikroskopisch zu erkennen war. Für die Nachweisreaktion wurde das Leukocyte-Alkaline-phosphatase-Kit der Firma Sigma Aldrich (85L-3R) verwendet.

Die in Vier-Kammer-Objektträger differenzierten MSCs wurden nach Absaugen des Differenzierungsmediums mit PBS gewaschen und anschließend mit 60 % Aceton/1x Zitratlösung für 30 sek bei RT entfernt. Anschließend wurde das Fixanz abgesaugt und die Objektträger 2 x mit Aqua dest. gewaschen. Danach wurde die alkalische Färbelösung auf die Objektträger gegeben und für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Aqua dest. gewaschen und mit Meyers-Hematoxylin-Lösung für 15 min gegengefärbt. Abschließend wurde die Hämatoxylin Lösung unter fließendem Leitungswasser entwickelt.

### **5.2.3. Safranin Färbung**

Die Färbung der knorpelspezifischen Proteoglykane wurde an Gefrierschnitten der differenzierten Pelletkultur durchgeführt. Die Gefrierschnitte waren zuvor bei -80 °C gelagert worden und wurden für die Färbung bei RT aufgetaut. Anschließend wurden die Gefrierschnitte mit eiskaltem Aceton (-20 °C) für 2 min fixiert. Nach der Fixierung erfolgten zwei Waschschrte mit Aqua dest. Die Färbung der Proteoglykane erfolgte dann mit einer 0,1 %igen Safranin-O Lösung bei RT.

## **5.3. Injektion von humanen MSC und Reimplantation in Ammentiere**

Zur Gewinnung der Blastozysten wurden 4-6 Wochen alte NMRI Weibchen verwendet. Um eine optimalen Ausbeute an Blastozysten zu erreichen wurden durch die intraperitoneale Gabe von 10 U Stuten-serum-Gonadotropin (pregnant mare serum

gonadotropin, PMSG) eine Superovulation der Weibchen hormonell induziert und 46h später durch Gabe von 10 U humanes Choriogonadotropin(hCG) der Eisprung induziert. Die derart hormonelle behandelten Weibchen wurden dann mit Männchen verpaart und erfolgreich gepaarte Weibchen anhand des vaginalen Propfs identifiziert. Die Weibchen wurden dann drei Tage nach der Paarung durch zervikale Dislokation getötet und Uterus und Eileiter entnommen. Die Isolation der Blastozysten erfolgte dann durch Spülen des Eileiters und des Uterus mit M2. Die isolierten Blastozysten wurden dann in einem mit Silikonöl überschichteten Tropfen M16 überführt und bis zur Injektion bei 37 °C inkubiert.

Die zu injizierenden MSCs wurden in Einzelzellsuspension überführt und in Injektionsmedium aufgenommen. Die MSCs wurden dann unter mikroskopischer Kontrolle in eine Injektionsnadel (Biomedical instruments) geladen. Anschließend wurden 3-8 MSCs in das Blastocoel der isolierten Blastozysten injiziert.

Die injizierten Blastozysten wurden dann im Brutschrank für mindestens 1 h bei 37 °C 5 % CO<sub>2</sub> gelagert. Nach der Inkubation wurde die Morphologie der Blastozysten untersucht und diejenigen, die die typische Morphologie wiedererlangt hatten für die Transplantation in die Rezipientenmäuse ausgewählt.

Als Rezipientenmäuse dienten durch Paarung mit vasktomierten Männchen scheinchwangere NMRI Weibchen. Der Retransfer der injizierten Blastozysten erfolgte unter Narkose in das Uterushorn der Rezipientenmäuse.

## **5.4. Immunohistochemie**

### ***5.4.1. Vorbereitung der Proben***

Den durch Blastozysteninjektion generierten E16.5 Embryonen wurden Proben aus Gehirn (eine Gehirnhälfte), Lunge (ein Lungenflügel), Niere (eine Niere) und Herz (eine Hälfte des Herzens) entnommen und zur Herstellung von Kryoschnitten vorbereitet. Dazu wurden die Gewebe für 12h in PBS 4% PFA bei 4° C fixiert. Die Fixierungslösung wurde dann durch Absaugen entfernt und zur Dehydratation der Gewebe durch eine Lösung von 16 % Glucose in PBS ersetzt und für 24h bei 4° C gelagert. Danach wurde die Lösung abgesaugt und nochmals durch PBS 16% Glucose ersetzt und die Gewebe einen

weiteren Tag dehydriert. Am folgenden Tag wurden die Gewebe dann in TissueTek O.C.T. eingebettet und bis zur Anfertigung der Kryoschnitte bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Aus den eingebetteten Geweben wurde dann  $10\ \mu\text{m}$  Schnitte erstellt und auf Objektträger aufgebracht. Die Objektträger wurden dann für 2-3h bei RT getrocknet und dann bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

#### **5.4.2. Kombinierte FisH/Immunfärbung**

Die Objektträger mit den Gewebeschnitten wurden ca. 20-30 min bei RT aufgetaut und anschließend für 20 min mit PBS 4 % PFA fixiert. Danach wurden Überreste der Fixierungslösung durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt (15 min, RT). Zur Antigendemaskierung wurden die Objektträger dann in Zitratpuffer bei  $96^{\circ}\text{C}$  für 15 min inkubiert und anschließend bei RT für ca. 30 min abgekühlt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Gewebe für 30 min in Methanol/3 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  inkubiert und anschließend erneut mit PBS (3X) gewaschen (5min, RT) und in SSC überführt.

##### In situ Hybridisierung:

Zur Denaturierung wurden die Objektträger in  $75^{\circ}\text{C}$  heißes 70 % Formamid/SSC überführt und für 2min inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger in eiskaltem 70 % Ethanol abgekühlt (4 min). Die Gewebe wurden über eine Alkoholreihe (70 %, 90 %, 100 % Ethanol) je 2min dehydriert und an der Luft getrocknet.

Nach Auftauen der Sonde und des Hybridisierungspuffers (Cambio,  $37^{\circ}\text{C}$ ; 5 min) wurde pro Objektträger  $1\ \mu\text{l}$  Sonde und  $9\ \mu\text{l}$  Puffer gemischt und im Heizblock bei  $85^{\circ}\text{C}$  für 10 min denaturiert. Nach der Denaturierung wurden Hyb-Mix (Sonde+Puffer) sofort im Eisbad abgekühlt. Nach auftragen von  $10\ \mu\text{l}$  der Sonde/Puffer-Mischung pro Objektträger wurden diese mit Deckglässchen verschlossen. Die Hybridisierung erfolgte dann bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Hybaid OmniSlide in situ Thermocycler über Nacht. Am folgenden Tag wurden die Deckglässchen entfernt und die Objektträger mit 2xSSC ( $37^{\circ}\text{C}$ ) 5 min gewaschen. Danach folgten zwei Waschschrte mit 50 % Formamid/2xSSC bei  $37^{\circ}\text{C}$  und zwei Waschschrte mit 2x SSC bei RT. Die Objektträger mit den Gewebeproben wurden dann einmal mit PBS gewaschen. Die Gewebeproben wurden dann entweder

zur mikroskopischen Auswertung mit DAPI gefärbt oder eine immunhistologische Färbung angeschlossen.

#### Immunfärbung:

Unspezifische Bindungen wurden durch Inkubation in PBS +5% Ziegen Serum +0,1% Triton x (30 min, feuchte Kammer) geblockt. Die Lösung wurde dann durch zweimaliges Waschen mit PBS 0,1% Triton X entfernt. Anschließend wurden die Proben über Nacht mit einem 100 µl Pan-Cytokeratin (1:10 in PBS +5% Ziegen Serum +0,1% Triton x ) in einer feuchten Kammer bei 4 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurde der primäre Antikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und mit einem FITC markierten sekundären Anti-Maus Antikörper (1:200 in PBS +5% Ziegen Serum +0,1% Triton x) für 2h bei 4 °C gefärbt. Der sekundäre Antikörper wurde dann durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt und die Kerne mit Dapi gegengefärbt.

## **5.5. Durchflusszytometrische Analysen**

### **5.5.1. Ethanolfixierung**

MSCs wurden nach dem Ernten mit 70% Ethanol (eiskalt) fixiert. Dazu wurden die Zellen in 200 µl PBS resuspendiert und anschließend unter Vortexen 1,5 ml 70% iger Ethanol-Lösung tropfenweise hinzugefügt. Die so fixierten Zellen wurden anschließend bei -20 °C für mindestens 30 min inkubiert.

### **5.5.2. Analyse des DNA Gehalts (Zellzyklusanalyse)**

Nach der Fixierung wurden die Zellen zum Entfernen des Alkohols bei 2000 rpm für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Abschließend wurden die Zellen in 200 µl PI-Färbelösung + RNase (100 µg/ml) resuspendiert und im Wasserbad bei 37 °C für 30 min inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. Da es bei der Fixierung von Zellen mit Ethanol häufig zur Bildung von Zellaggregaten kommt, war es notwendig diese Zellaggregate von den

Einzellzellen zu unterscheiden. Dazu wurden die maximale Intensität des PI-Signals (height) gemeinsam mit dem Integral des PI-Signals (Area) in einem Punktwolkendiagramm mit linearer Skalierung aufgetragen und die Einzellzellen wie in Wersto et al. 2001 gezeigt eingegrenzt (Wersto et al., 2001). Für die weitere Auswertung Messung wurden nur diese Einzellzellen verwendet. Die Bestimmung der Zellzyklusverteilung erfolgte mittels der Software Modfit LT (Verity Software House, Topsham, ME, USA).

### ***5.5.3. Immunfärbung zum Nachweis von Zellen mit eingebautem Bromdesoxyuridin (BrdU)***

Die Fixierung erfolgte wie in 7.5.2 beschrieben mit 70 %iger Ethanol-Lösung (eiskalt). Nach der Fixierung wurden die Zellen bei 2000 rpm für 5 min zentrifugiert und der Überstand entfernt. Anschließend wurden die Zellen 2 x mit PBS gewaschen. Zum Nachweis der eingebauten BrdU-Moleküle war es erforderlich die DNA-Doppelstränge zu trennen. Zu diesem Zweck wurden die Zellen in 2M Salzsäure für 30 min bei RT denaturiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Salzsäure nach Zentrifugation entfernt. Zum Neutralisieren des pH-Wertes wurden die Zellen dann in 1ml einer 0,15 M Natriumtetraborat-Lösung resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS-T (PBS + 0.1 % BSA + 0.2 % Tween 20, pH 7.4) gewaschen. Nach Entfernen des PBS-T wurden die Zellen dann mit 55 µl Anti-BrdU Antikörper Lösung (1:10 in PBS-T) für 45 min bei RT inkubiert. Der primäre Antikörper wurde dann durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt. Anschließend wurden die Zellen mit 100 µl einem sekundären Fitc Anti-Maus Antikörper (1:100 in PBS-T) für weitere 60 min bei RT inkubiert. Nach erneutem zweimaligen Waschen mit PBS-T und 1 x in PBS wurden die Zellen in 200 µl PI-Färbelösung + RNase (100 µg/ml) resuspendiert und im Wasserbad bei 37 °C für 30 min gefärbt. Der Anteil der Zellen, die BrdU eingebaut hatten, wurde dann durchflusszytometrisch bestimmt.

#### **5.5.4. Isolation von Rinderthymuszellen**

Frischer Rinderthymus wurde zur Verfügung gestellt von Südfleisch Würzburg GmbH. Das Thymusgewebe wurde in kleine Stücke zerteilt und von Fett befreit. Anschließend wurde der Thymus in kleine Stücke (5 mm) zerteilt und durch ein Zellsieb mit der Rückseite eines Spritzenkolbens gestrichen. Alle 15 sek wurde der Filter mit Verdau-Lösung (DMEM + 5 %FCS + DNase 22 µg/ml) gespült. Die Zellen wurden anschließend unter dem Mikroskop untersucht. Lagen die meisten Zellen als Einzelzellen vor, wurden sie bei 450g für 10 min pelletiert; andernfalls wurden die Zellen erneut filtriert. Das Pellet wurde mit PBS-D (PBS+ Dnase 22 µg/ml) teilweise resuspendiert. Der untere Teil des Pellets enthielt die meisten verklumpten Zellen und wurde daher nicht resuspendiert. Im nächsten Schritt wurden der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 1-2 min stehen gelassen. Die Zellsuspension wurde abgenommen und mit gleichem Volumen 0,2 % Formaldehyd-Lösung vermischt und für 10 min schüttelnd inkubiert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen (450g; 4 °C) und anschließend in Einfriermedium resuspendiert. Die Zellen wurden eingefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

#### **5.5.5. Telomerlängenbestimmung mittels nuclear Flow FisH**

Zur Bestimmung der Telomerlänge wurden pro Ansatz jeweils  $5 \times 10^5$  MSCs eingesetzt. Die MSCs wurden dann zur Isolation der Zellkerne jeweils in 400 µl Hypotonen-Lyse-Puffer aufgenommen und für 10 min bei RT unter gelegentlichem vortexen inkubiert. Anschließend wurde der Hypotone-Lyse-Puffer durch Waschen mit PBS entfernt. Als interne Kontrolle wurden pro Ansatz je  $5 \times 10^5$  Rinderthymuszellen zugefügt. Die Hybridisierungsansätze wurden dann entweder in 300 µl Flow-FisH-Hyb-Puffer mit tel-PNA Sonde oder nur in Flow-FiSH-Hyb-Puffer resuspendiert. Die Proben wurden bei 80 °C für 10 min denaturiert und die Hybridisierung erfolgte bei RT über Nacht. Am folgenden Tag wurden der Flow-FisH-Hyb-Puffer durch zweimaliges Waschen (10 min 500 g; 4 °C; mit warmen PBS (40 °C) entfernt. Anschließend wurden die in Flow-FiSH-PI-Färbelösung resuspendiert und durchflusscytometrisch ausgewertet.



---

## 5.6. Molekularbiologische Methoden

### 5.6.1. Isolierung genomischer DNA aus Gewebeproben

Zur Isolation genomischer DNA (gDNA) aus Zellen und Geweben war der Aufschluss der Gewebe und der Zellstruktur notwendig. Dieses wurde im ersten Schritt durch Verdau mit Proteinase K-Verdau in Kombination mit dem detergenthaltigen Lysispuffer ermöglicht. Dazu wurde in dem Lysispuffer 1% Proteinase K (10mg/ml) gelöst und von der Mischung 700 µl zu den Proben hinzugefügt. Der Aufschluss der Gewebe erfolgte unter Rotation bei 56 °C über Nacht. Am folgenden Tag wurde zu jedem Ansatz 1% RNase (10mg/ml) und bei 37 °C für 30 min die zelluläre RNA enzymatisch zerstört. Zur Entfernung des Proteinanteils wurde den Proben ein gleiches Volumen Phenol-Chloroform zugefügt. Die Ansätze wurden dann durch gründliches Vortexen gut durchmischt. Durch Zentrifugation bei 20.000g für 10min kam es zur Trennung in wässrige, Inter- und Phenol-Phasen im Reaktionsgefäß. Die entstandene wässrige Phase enthielt die DNA, während die Interphase den Proteinanteil der Proben enthielt. Die wässrige Phase wurden dann ohne Interphase abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Zur besseren Aufreinigung wurden die Schritte der Phenol-Chloroform-Extraktion wiederholt. Nach Abschluss der zweiten Phenol-Chloroform-Extraktion wurde die DNA durch Zugabe des gleichen Volumens eiskalten Isopropanols für mindestens 1 h bei -20 °C gefällt. Die gefällte DNA wurde dann durch Zentrifugation bei 20.000 g, bei 4 °C und für 30 min pelletiert. Der Überstand wurde entfernt und durch zweimaliges Waschen mit 70%igem Ethanol Salzrückstände entfernt. Das DNA-Pellet wurde nach Entfernung des Überstandes in TE-Puffer resuspendiert. Anschließend wurde die DNA-Konzentration spektrophotometrisch bestimmt und Arbeitsverdünnungen der gewonnen gDNA mit der Konzentration 200 ng/µl erstellt.

### 5.6.2. qPCR zur Analyse des Donorchimärismus

Die Quantifizierung der Donorsignale in der aus den Geweben isolierten gDNA erfolgte über humanspezifische qPCRs. Im Gegensatz zu konventioneller PCR, bei der nur Endpunktanalysen möglich sind, ermöglicht die qPCR die Darstellung der PCR-

Reaktion in Echtzeit. Die Messung der Menge der amplifizierten Zielsequenzen während der Reaktion erfolgte dabei über die Bestimmung der Fluoreszenzzunahme. Zu diesem Zweck wurde dem Reaktionsansatz entweder der interkalierende Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green oder eine spezifische Taqman-Sonde zugefügt. Zur Quantifizierung der Zielsequenz wurde die Anzahl der PCR-Zyklen bis zum Erreichen eines bestimmten Fluoreszenz-Schwellenwertes (*Cycle of threshold*, Ct) bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte dann relative zu einem Standard mittels der DeltaDelta-CT( $\Delta\Delta$ -Ct)-Methode (7.6.3).

SYBR Green basierte qPCR:

SYBR-Green ist ein DNA-interkalierender Farbstoff, der nach Bindung an doppelsträngige DNA stark fluoresziert. Die von SYBR-Green emittierte Fluoreszenz ist dabei proportional zu Menge der doppelsträngigen DNA im Reaktionsansatz. Durch diese Eigenschaften kann SYBR-Green zur Echtzeit-Messung der Produktzunahme während der PCR-Reaktion verwendet werden.

Die gDNAs, die aus den nach der Blastozysteninjektion entstandenen Embryonen isoliert wurden, wurde mittels SYBR-Green qPCR analysiert. Zum Nachweis humaner Sequenzen in den gDNAs wurden Primer für den humanen  $\beta$ -Globin (hu  $\beta$ -Glob) Locus verwendet. Durch die verwendeten hu  $\beta$ -Glob Primer wurden nur humane gDNA amplifiziert nicht jedoch murine Zielsequenzen. Zur Normalisierung des DNA-Gehalts wurden Myogenin spezifische PCR-Primer verwendet.

Reaktionsansatz:

10,0  $\mu$ L 2x SYBR Green Mix

je 0,5  $\mu$ L Sense bzw. Antisense Primer (100 p mol /  $\mu$ L)

1,0  $\mu$ L gDNA (200ng/ $\mu$ L)

8  $\mu$ L Aqua dest.

PCR-Programm:

95 °C 10 min

95 °C 30 sek

60 °C 1 min

72 °C 1 min

83 °C 15 sek

} x 40

72 °C 2min

Sonden basierte humanspezifische qPCR:

Für die Detektion der humanen Zielsequenz mittels sondenbasierter Realtime PCR wurde eine für die humanen 17 $\alpha$ mod Loci spezifische Taqman-Sonde (Warburton et al., 1991; Becker et al., 2002) eingesetzt, die innerhalb des amplifizierten Bereichs lag. An ihrem 5'-Ende trug die Sonde als Reporter das Fluorophor 6-Carboxy-Fluorescein (FAM) und an ihrem 3'-Ende als Quencher 6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin (TAMRA).

Das Prinzip des Aufbaus einer Taqman-Sonde beruht darauf, dass es bei intakter Sonde aufgrund der räumlichen Nähe von Reporter und Quencher zu einem Fluoreszenz-Energie-Transfer (FET) kommt. Dadurch wird die Fluoreszenz des Reporters unterdrückt.

Während der PCR-Reaktion kommt es zur Bindung der Sonde an ihre homologe Sequenz innerhalb der Zielsequenz der Primer. Während der Amplifikation der Zielsequenz kommt es nun zur Verdrängung der Sonde vom Matrizenstrang durch die DNA-Polymerase. Die Polymerase spaltet dann aufgrund ihrer 5'-3'-Exonuklease Aktivität die Sonde durch Hydrolyse. Es kommt dadurch zur räumlichen Trennung von Reporter und Quencher und damit zum Verlust des FET. Die Fluoreszenz des Reporters kann dann nach Anregung gemessen werden.

Die PCR-Quantifizierung mittels einer hydrolysierten Sonde bietet im Vergleich zur Quantifizierung mittels SYBR-Green eine höhere Spezifität der Signale. Neben der spezifischen Bindung der Primer an die Zielsequenz ist auch eine spezifische Bindung

der Sonde für die Entstehung des Fluoreszenzsignals erforderlich, da sich eine unspezifisch gebundene Sonde bereits vor Hydrolyse von dem Matrizenstrang löst.

Zur Normalisierung des PCR Signals wurde eine Sonde verwendet die spezifisch für myogenin Locus war und ebenfalls FAM als Reporter und Tamra als Quencher trug.

Die Sequenzen der Primer und der Sonden wurden aus der Literatur entnommen (Warburton et al., 1991; Becker et al., 2002). Die Synthese der Oligonucleotide soweit der Sonden wurde von MWG Biotech durchgeführt.

Reaktionsansatz:

1 µl DNA (200 ng/µl)

2 µl 10x Puffer

0,5 µl Primer (10 mM)

0,5 µl Taqman-Sonde (4µM)

0,5 µl MgCl<sub>2</sub> (8 mM)

0,5 µl dNTPs (je 2,5 mM)

0,1 µl Supertaq DNA-Polymerase (10U/µl)

15 µl Aqua dest.

**PCR-Programm:**

95 °C 10 min

95 °C 10 sek

60 °C 1 min

} x 35

**5.6.3. Quantifizierung der Donorsignale mittels Delta-Delta CT-Methode**

Die Auswertung der qPCR erfolgte mittels der Delta-Delta-CT ( $\Delta\Delta$ -Ct) Hierbei wurde wird die Amplifikation der humanen Zielsequenzen (hu- $\beta$ -Glob bzw. 17 $\alpha$ mod) in der gewonnen gDNA mit der Amplifikation des Referenzgenes Myogenin normalisiert ( $\Delta$ -

CtPr). In gleicher Weise wurde der  $\Delta$ -Ct einer Standard-gDNA, die aus 99,8 % murinen Milzzellen und 0,2 % humanen MSCs bestand errechnet ( $\Delta$ -CtStd).

Die normalisierte Signalstärke der Probe ( $\Delta$ -CtPr) wurde dann von der normalisierten Signalstärke der Standard gDNA subtrahiert ( $\Delta$ -CtStd). Daraus wurde dann der  $\Delta\Delta$ -Ct berechnet. Das Verhältnis (Ratio) der amplifizierten Sequenzen zwischen Probe und Standard gDNA wurde dann durch die Formel:  $Ratio = 1,9^{\Delta\Delta CT Pr - \Delta\Delta CT Std}$  bestimmt

#### **5.6.4. Western Blot**

Zum Nachweis der Expression des PCNA-Proteins wurden die MSCs 2x mit PBS gewaschen und je  $2 \times 10^5$  Zellen in Lämmli Puffer aufgenommen und zur Lyse bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Die Proben wurden dann für 5 min auf  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufgeheizt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte dann über Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese in 10 % Natriumdodecylsulfat-Gelen. Die aufgetrennten Proteine wurden dann auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Zum blocken unspezifischer Antikörperbindungsstellen wurde die Membran dann in 5 % Magermilchpulver PBS 0,1 % Tween20 für 30 min bei RT inkubiert. Die Färbung mit den primären Antikörper erfolgte dann für 2h bei RT unter samftem Schütteln in PBS 0,1 % Tween20. Der primäre Antikörper wurde dann durch Waschen entfernt. Anschließend wurde die Membran in mit einem sekundärem mit Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase, HRP) konjugiertem Antikörper (1:5000 in PBS 0,1 % Tween20) für 2h bei RT inkubiert. Die Proteine wurden dann über eine durch die HRP katalysierte Chemilumineszenz Reaktion und auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

## 6. Literaturverzeichnis

Adams GB, Scadden DT (2006) The hematopoietic stem cell in its place. *Nat Immunol* **7**(4): 333-337

Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, Goldstein S, Younglai EV, Futcher AB, Greider CW, Harley CB (1992) Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(21): 10114-10118

Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, Fike JR, Lee HO, Pfeffer K, Lois C, Morrison SJ, Alvarez-Buylla A (2003) Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* **425**(6961): 968-973

Alves H, Munoz-Najar U, de Wit J, Renard AJ, Hoeijmakers JH, Sedivy JM, van Blitterswijk C, de Boer J (2009) A link between the accumulation of DNA damage and loss of multipotency of human mesenchymal stromal cells. *J Cell Mol Med*

Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, Chiu C-P, Harris CP, Waknitz MA, Itskovitz-Eldor J, Thomson JA (2000) Clonally Derived Human Embryonic Stem Cell Lines Maintain Pluripotency and Proliferative Potential for Prolonged Periods of Culture. *Developmental Biology* **227**(2): 271-278

Asher DM (1999) Bovine sera used in the manufacture of biologicals: current concerns and policies of the U.S. Food and Drug Administration regarding the transmissible spongiform encephalopathies. *Dev Biol Stand* **99**: 41-44

Auletta JJ, Zale EA, Welter JF, Solchaga LA (2011) Fibroblast Growth Factor-2 Enhances Expansion of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells without Diminishing Their Immunosuppressive Potential. *Stem Cells Int* **2011**: 235176

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

Ayache S, Panelli MC, Byrne KM, Slezak S, Leitman SF, Marincola FM, Stroncek DF (2006) Comparison of proteomic profiles of serum, plasma, and modified media supplements used for cell culture and expansion. *J Transl Med* **4**: 40

Baker DEC, Harrison NJ, Maltby E, Smith K, Moore HD, Shaw PJ, Heath PR, Holden H, Andrews PW (2007) Adaptation to culture of human embryonic stem cells and oncogenesis in vivo. *Nat Biotech* **25**(2): 207-215

Ball SG, Shuttleworth AC, Kielty CM (2004) Direct cell contact influences bone marrow mesenchymal stem cell fate. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **36**(4): 714-727

- Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Osaki M, Kawamata M, Kato T, Okochi H, Ochiya T (2008) IFATS Collection: In Vivo Therapeutic Potential of Human Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cells After Transplantation into Mice with Liver Injury. *Stem Cells* **26**(10): 2705-2712
- Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Quinn G, Okochi H, Ochiya T (2007) Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes. *Hepatology* **46**(1): 219-228
- Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, Haegebarth A, Korving J, Begthel H, Peters PJ, Clevers H (2007) Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* **449**(7165): 1003-1007
- Baxter MA, Wynn RF, Jowitt SN, Wraith JE, Fairbairn LJ, Bellantuono I (2004) Study of Telomere Length Reveals Rapid Aging of Human Marrow Stromal Cells following In Vitro Expansion. *Stem Cells* **22**(5): 675-682
- Becker M, Nitsche A, Neumann C, Aumann J, Junghahn I, Fichtner I (2002) Sensitive PCR method for the detection and real-time quantification of human cells in xenotransplantation systems. *Br J Cancer* **87**(11): 1328-1335
- Beddington RS, Robertson EJ (1989) An assessment of the developmental potential of embryonic stem cells in the midgestation mouse embryo. *Development* **105**(4): 733-737
- Bernardo ME, Zaffaroni N, Novara F, Cometa AM, Avanzini MA, Moretta A, Montagna D, Maccario R, Villa R, Daidone MG, Zuffardi O, Locatelli F (2007) Human Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells Do Not Undergo Transformation after Long-term In vitro Culture and Do Not Exhibit Telomere Maintenance Mechanisms. *Cancer Res* **67**(19): 9142-9149
- Bibb LC, Holt JK, Tarttelin EE, Hodges MD, Gregory-Evans K, Rutherford A, Lucas RJ, Sowden JC, Gregory-Evans CY (2001) Temporal and spatial expression patterns of the CRX transcription factor and its downstream targets. Critical differences during human and mouse eye development. *Hum Mol Genet* **10**(15): 1571-1579
- Bieback K, Ha VA, Hecker A, Grassl M, Kinzibach S, Solz H, Sticht C, Kluter H, Bugert P (2010) Altered Gene Expression in Human Adipose Stem Cells Cultured with Fetal Bovine Serum Compared to Human Supplements. *Tissue Eng Part A*
- Bjornson CR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, Vescovi AL (1999) Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* **283**(5401): 534-537
- Blackburn EH (1991) Structure and function of telomeres. *Nature* **350**(6319): 569-573
- Blazer S, Khankin E, Segev Y, Ofir R, Yalon-Hacohen M, Kra-Oz Z, Gottfried Y, Larisch S, Skorecki KL (2002) High glucose-induced replicative senescence: point of no return and effect of telomerase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **296**(1): 93-101

Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE (1998) Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* **279**(5349): 349-352

Bonab MM, Alimoghaddam K, Talebian F, Ghaffari SH, Ghavamzadeh A, Nikbin B (2006) Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *BMC Cell Biol* **7**: 14

Bowen-Pope DF, Hart CE, Seifert RA (1989) Sera and conditioned media contain different isoforms of platelet-derived growth factor (PDGF) which bind to different classes of PDGF receptor. *J Biol Chem* **264**(5): 2502-2508

Bradley A, Evans M, Kaufman MH, Robertson E (1984) Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* **309**(5965): 255-256

Bungert J, DavÈ U, Lim KC, Lieuw KH, Shavit JA, Liu Q, Engel JD (1995) Synergistic regulation of human beta-globin gene switching by locus control region elements HS3 and HS4. *Genes & development* **9**(24): 3083

Camargo FD, Green R, Capetanaki Y, Jackson KA, Goodell MA (2003) Single hematopoietic stem cells generate skeletal muscle through myeloid intermediates. *Nat Med* **9**(12): 1520-1527

Caplan AI (1991) Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* **9**(5): 641-650

Caplan AI, Correa D (2011) The MSC: An Injury Drugstore. *Cell Stem Cell* **9**(1): 11-15

Capper R, Britt-Compton B, Tankimanova M, Rowson J, Letsolo B, Man S, Haughton M, Baird DM (2007) The nature of telomere fusion and a definition of the critical telomere length in human cells. *Genes Dev* **21**(19): 2495-2508

Chen QM, Tu VC, Catania J, Burton M, Toussaint O, Dilley T (2000) Involvement of Rb family proteins, focal adhesion proteins and protein synthesis in senescent morphogenesis induced by hydrogen peroxide. *J Cell Sci* **113 ( Pt 22)**: 4087-4097

Chierogato K, Castegnaro S, Madeo D, Astori G, Pegoraro M, Rodeghiero F (2011) Epidermal growth factor, basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor-bb can substitute for fetal bovine serum and compete with human platelet-rich plasma in the ex vivo expansion of mesenchymal stromal cells derived from adipose tissue. *Cytotherapy*

Childs CB, Proper JA, Tucker RF, Moses HL (1982) Serum contains a platelet-derived transforming growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**(17): 5312-5316

Cholewa D, Stiehl T, Schellenberg A, Bokermann G, Jousen S, Koch C, Walenda T, Pallua N, Marciniak-Czochra A, Suschek CV, Wagner W (2011) Expansion of Adipose Mesenchymal Stromal Cells is affected by Human Platelet Lysate and Plating Density. *Cell Transplant*

Chung N, Jeong D, Park S, Choi B, Cho B, Kim H, Chun C, Won J, Han C (2004) Cotransplantation of Marrow Stromal Cells May Prevent Lethal Graft-versus-Host



---

Disease in Major Histocompatibility Complex Mismatched Murine Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *International Journal of Hematology* **80**(4): 370-376

Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, Andriolo G, Sun B, Zheng B, Zhang L, Norotte C, Teng PN, Traas J, Schugar R, Deasy BM, Badylak S, Buhning HJ, Giacobino JP, Lazzari L, Huard J, Peault B (2008) A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* **3**(3): 301-313

d'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, Von Zglinicki T, Saretzki G, Carter NP, Jackson SP (2003) A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* **426**(6963): 194-198

d'Adda di Fagagna F, Teo S-H, Jackson SP (2004) Functional links between telomeres and proteins of the DNA-damage response. *Genes & development* **18**(15): 1781-1799

da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB (2008) In Search of the In Vivo Identity of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells* **26**(9): 2287-2299

da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB (2006) Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* **119**(Pt 11): 2204-2213

Dai W, Hale SL, Martin BJ, Kuang JQ, Dow JS, Wold LE, Kloner RA (2005) Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium: short- and long-term effects. *Circulation* **112**(2): 214-223

Dezawa M, Ishikawa H, Itokazu Y, Yoshihara T, Hoshino M, Takeda S-i, Ide C, Nabeshima Y-i (2005) Bone Marrow Stromal Cells Generate Muscle Cells and Repair Muscle Degeneration. *Science* **309**(5732): 314-317

Di Micco R, Fumagalli M, Cicalese A, Piccinin S, Gasparini P, Luise C, Schurra C, Garre M, Giovanni Nuciforo P, Bensimon A, Maestro R, Giuseppe Pelicci P, d'Adda di Fagagna F (2006) Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* **444**(7119): 638-642

Doherty MJ, Ashton BA, Walsh S, Beresford JN, Grant ME, Canfield AE (1998) Vascular pericytes express osteogenic potential in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res* **13**(5): 828-838

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

Duggal S, Brinchmann JE (2011) Importance of serum source for the in vitro replicative senescence of human bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Journal of Cellular Physiology*: n/a-n/a

Dürr M, Harder F, Merkel A, Bug G, Henschler R, Müller AM (2003) Chimaerism and erythroid marker expression after microinjection of human acute myeloid leukaemia cells into murine blastocysts. *Oncogene* **22**(57): 9185-9191

Evans MJ, Kaufman MH (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**(5819): 154-156

Farrington-Rock C, Crofts NJ, Doherty MJ, Ashton BA, Griffin-Jones C, Canfield AE (2004) Chondrogenic and adipogenic potential of microvascular pericytes. *Circulation* **110**(15): 2226-2232

Fehrer C, Brunauer R, Laschober G, Unterluggauer H, Reitingner S, Kloss F, Güllly C, Gaßner R, Lepperdinger G (2007) Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan. *Aging Cell* **6**(6): 745-757

Fougerousse F, Bullen P, Herasse M, Lindsay S, Richard I, Wilson D, Suel L, Durand M, Robson S, Abitbol M, Beckmann JS, Strachan T (2000) Human-mouse differences in the embryonic expression patterns of developmental control genes and disease genes. *Hum Mol Genet* **9**(2): 165-173

Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS (1970) The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* **3**(4): 393-403

Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV (1987) Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet* **20**(3): 263-272

Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV (1974) Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation* **17**(4): 331-340

Fukuhara S, Tomita S, Yamashiro S, Morisaki T, Yutani C, Kitamura S, Nakatani T (2003) Direct cell-cell interaction of cardiomyocytes is key for bone marrow stromal cells to go into cardiac lineage in vitro. *J Thorac Cardiovasc Surg* **125**(6): 1470-1480

Gaebel R, Furlani D, Sorg H, Polchow B, Frank J, Bieback K, Wang W, Klopsch C, Ong LL, Li W, Ma N, Steinhoff G (2011) Cell origin of human mesenchymal stem cells determines a different healing performance in cardiac regeneration. *PLoS One* **6**(2): e15652

Gang EJ, Bosnakovski D, Figueiredo CA, Visser JW, Perlingeiro RCR (2007) SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. *Blood* **109**(4): 1743-1751

Gardner RL (1968) Mouse Chimaeras obtained by the Injection of Cells into the Blastocyst. *Nature* **220**(5167): 596-597

Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA (2007) Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res* **100**(9): 1249-1260

Gregory CA, Reyes E, Whitney MJ, Spees JL (2006) Enhanced engraftment of mesenchymal stem cells in a cutaneous wound model by culture in allogenic species-specific serum and administration in fibrin constructs. *Stem Cells* **24**(10): 2232-2243

Grinnemo KH, Mansson A, Dellgren G, Klingberg D, Wardell E, Drvota V, Tammik C, Holgersson J, Ringden O, Sylven C, Le Blanc K (2004) Xenoreactivity and engraftment of human mesenchymal stem cells transplanted into infarcted rat myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg* **127**(5): 1293-1300

Gronthos S, Graves SE, Ohta S, Simmons PJ (1994) The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood* **84**(12): 4164-4173

Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, Buzney EA, Khan MK, Flint AF, Kunkel LM, Mulligan RC (1999) Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* **401**(6751): 390-394

Harder F, Henschler R, Junghahn I, Lamers MC, Muller AM (2002a) Human hematopoiesis in murine embryos after injecting human cord blood-derived hematopoietic stem cells into murine blastocysts. *Blood* **99**(2): 719-721

Harder F, Kirchhof N, Petrovic S, Schmittwolf C, Durr M, Muller AM (2002b) Developmental potentials of hematopoietic and neural stem cells following injection into pre-implantation blastocysts. *Ann Hematol* **81 Suppl 2**: S20-21

Harder F, Kirchhof N, Petrovic S, Wiese S, Muller AM (2004) Erythroid-like cells from neural stem cells injected into blastocysts. *Exp Hematol* **32**(7): 673-682

Harley CB, Futcher AB, Greider CW (1990) Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**(6274): 458-460

Hayflick L (1965) The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res* **37**: 614-636

Heiskanen A, Satomaa T, Tiitinen S, Laitinen A, Mannelin S, Impola U, Mikkola M, Olsson C, Miller-Podraza H, Blomqvist M, Olonen A, Salo H, Lehenkari P, Tuuri T, Otonkoski T, Natunen J, Saarinen J, Laine J (2007) N-Glycolylneuraminic Acid Xenoantigen Contamination of Human Embryonic and Mesenchymal Stem Cells Is Substantially Reversible. *Stem Cells* **25**(1): 197-202

Hennig T, Lorenz H, Thiel A, Goetzke K, Dickhut A, Geiger F, Richter W (2007) Reduced chondrogenic potential of adipose tissue derived stromal cells correlates with an altered TGF $\beta$  receptor and BMP profile and is overcome by BMP-6. *Journal of Cellular Physiology* **211**(3): 682-691

Herbig U, Jobling WA, Chen BPC, Chen DJ, Sedivy JM (2004) Telomere Shortening Triggers Senescence of Human Cells through a Pathway Involving ATM, p53, and p21CIP1, but Not p16INK4a. *Molecular cell* **14**(4): 501-513

Herrera B, Inman GJ (2009) A rapid and sensitive bioassay for the simultaneous measurement of multiple bone morphogenetic proteins. Identification and quantification of BMP4, BMP6 and BMP9 in bovine and human serum. *BMC Cell Biol* **10**: 20

Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, Sussman M, Orchard P, Marx JC, Pyeritz RE, Brenner MK (1999) Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med* **5**(3): 309-313

Hung SC, Pochampally RR, Chen SC, Hsu SC, Prockop DJ (2007) Angiogenic effects of human multipotent stromal cell conditioned medium activate the PI3K-Akt pathway in hypoxic endothelial cells to inhibit apoptosis, increase survival, and stimulate angiogenesis. *Stem Cells* **25**(9): 2363-2370

Issarachai S, Priestley GV, Nakamoto B, Papayannopoulou T (2002) Cells with hemopoietic potential residing in muscle are itinerant bone marrow-derived cells. *Exp Hematol* **30**(4): 366-373

James D, Noggle SA, Swigut T, Brivanlou AH (2006) Contribution of human embryonic stem cells to mouse blastocysts. *Developmental Biology* **295**(1): 90-102

Jang S, Cho HH, Cho YB, Park JS, Jeong HS (2010) Functional neural differentiation of human adipose tissue-derived stem cells using bFGF and forskolin. *BMC Cell Biol* **11**: 25

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 (2002) Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* **418**(6893): 41-49

Jin Y, Kato T, Furu M, Nasu A, Kajita Y, Mitsui H, Ueda M, Aoyama T, Nakayama T, Nakamura T (2009) Mesenchymal stem cells cultured under hypoxia escape from senescence via down-regulation of p16 and extracellular signal regulated kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*

Jones DL, Wagers AJ (2008) No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(1): 11-21

Jungebluth P, Alici E, Baiguera S, Blanc KL, Blomberg P, BozÛky B, Crowley C, Einarsson O, Grinnemo K-H, Gudbjartsson T, Guyader SL, Henriksson G, Hermanson O, Juto JE, Leidner B, Lilja T, Liska J, Luedde T, Lundin V, Moll G, Nilsson B, Roderburg C, Str^mblad S, Sutlu T, Teixeira AI, Watz E, Seifalian A, Macchiarini P (2011) Tracheobronchial transplantation with a stem-cell-seeded bioartificial nanocomposite: a proof-of-concept study. *The Lancet*

Kerkis I, Kerkis A, Dozortsev D, Stukart-Parsons GC, Gomes Massironi SM, Pereira LV, Caplan AI, Cerruti HF (2006) Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. *Cells Tissues Organs* **184**(3-4): 105-116

Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K (2006) Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* **24**(5): 1294-1301

- Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Lee CW, Barr S, Fuchs S, Epstein SE (2004) Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res* **94**(5): 678-685
- Kirchhof N, Harder F, Petrovic S, Schmittwolf C, Durr M, Muller AM (2002) Developmental potentials of hematopoietic and neural stem cells following injection into pre-implantation blastocysts. *Ann Hematol* **81 Suppl 2**: S20-21
- Kobayashi T, Watanabe H, Yanagawa T, Tsutsumi S, Kayakabe M, Shinozaki T, Higuchi H, Takagishi K (2005) Motility and growth of human bone-marrow mesenchymal stem cells during ex vivo expansion in autologous serum. *J Bone Joint Surg Br* **87-B**(10): 1426-1433
- Kobune M, Kawano Y, Ito Y, Chiba H, Nakamura K, Tsuda H, Sasaki K, Dehari H, Uchida H, Honmou O, Takahashi S, Bizen A, Takimoto R, Matsunaga T, Kato J, Kato K, Houkin K, Niitsu Y, Hamada H (2003) Telomerized human multipotent mesenchymal cells can differentiate into hematopoietic and cobblestone area-supporting cells. *Exp Hematol* **31**(8): 715-722
- Kocaoemer A, Kern S, Klöter H, Bieback K (2007) Human AB Serum and Thrombin-Activated Platelet-Rich Plasma Are Suitable Alternatives to Fetal Calf Serum for the Expansion of Mesenchymal Stem Cells from Adipose Tissue. *Stem Cells* **25**(5): 1270-1278
- Kolf CM, Cho E, Tuan RS (2007) Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther* **9**(1): 204
- Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG (1999) Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(19): 10711-10716
- Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis SJ (2001) Multi-Organ, Multi-Lineage Engraftment by a Single Bone Marrow-Derived Stem Cell. *Cell* **105**(3): 369-377
- Kuhn NZ, Tuan RS (2010) Regulation of stemness and stem cell niche of mesenchymal stem cells: implications in tumorigenesis and metastasis. *J Cell Physiol* **222**(2): 268-277
- Kuznetsov SA, Mankani MH, Robey PG (2000) Effect of serum on human bone marrow stromal cells: ex vivo expansion and in vivo bone formation. *Transplantation* **70**(12): 1780-1787
- Lakshmiopathy U, Verfaillie C (2005) Stem cell plasticity. *Blood Rev* **19**(1): 29-38
- Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, Lanino E, Sundberg B, Bernardo ME, Remberger M, Dini G, Egeler RM, Bacigalupo A, Fibbe W, Ringden O (2008) Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *The Lancet* **371**(9624): 1579-1586

Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Gøtherstrøm C, Hassan M, Uzunel M, Ringdén O (2004) Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *The Lancet* **363**(9419): 1439-1441

Lee JS, Lee MO, Moon BH, Shim SH, Fornace Jr AJ, Cha HJ (2009) Senescent growth arrest in mesenchymal stem cells is bypassed by Wip1-mediated downregulation of intrinsic stress signaling pathways. *Stem Cells* **27**(8): 1963-1975

Lee OK, Kuo TK, Chen W-M, Lee K-D, Hsieh S-L, Chen T-H (2004) Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* **103**(5): 1669-1675

Liang L, Bickenbach JR (2002) Somatic epidermal stem cells can produce multiple cell lineages during development. *Stem Cells* **20**(1): 21-31

Lindroos B, Aho KL, Kuokkanen H, Raty S, Huhtala H, Lemponen R, Yli-Harja O, Miettinen S, Suuronen R (2010) Differential gene expression in adipose stem cells cultured in allogeneic human serum versus fetal bovine serum. *Tissue Eng Part A*

Macchiarini P, Jungebluth P, Go T, Asnaghi MA, Rees LE, Cogan TA, Dodson A, Martorell J, Bellini S, Parnigotto PP, Dickinson SC, Hollander AP, Mantero S, Conconi MT, Birchall MA (2008) Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *The Lancet* **372**(9655): 2023-2030

Martin GR (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(12): 7634-7638

Martin MJ, Muotri A, Gage F, Varki A (2005) Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. *Nat Med* **11**(2): 228-232

McKinney-Freeman SL, Jackson KA, Camargo FD, Ferrari G, Mavilio F, Goodell MA (2002) Muscle-derived hematopoietic stem cells are hematopoietic in origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(3): 1341-1346

Moldovan G-L, Pfander B, Jentsch S (2007) PCNA, the Maestro of the Replication Fork. *Cell* **129**(4): 665-679

Moran EC, Kamiguti AS, Cawley JC, Pettitt AR (2002) Cytoprotective antioxidant activity of serum albumin and autocrine catalase in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* **116**(2): 316-328

Morrison RF, Farmer SR (1999) Role of PPARgamma in regulating a cascade expression of cyclin-dependent kinase inhibitors, p18(INK4c) and p21(Waf1/Cip1), during adipogenesis. *J Biol Chem* **274**(24): 17088-17097

Müller AM, Medvinsky A, Strouboulis J, Grosveld F, Dzierzakt E (1994) Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo. *Immunity* **1**(4): 291-301

Muraglia A, Cancedda R, Quarto R (2000) Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci* **113**: 1161

Ng F, Boucher S, Koh S, Sastry KS, Chase L, Lakshmiathy U, Choong C, Yang Z, Vemuri MC, Rao MS, Tanavde V (2008) PDGF, TGF-beta, and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages. *Blood* **112**(2): 295-307

Nimura A, Muneta T, Koga H, Mochizuki T, Suzuki K, Makino H, Umezawa A, Sekiya I (2008) Increased proliferation of human synovial mesenchymal stem cells with autologous human serum: comparisons with bone marrow mesenchymal stem cells and with fetal bovine serum. *Arthritis Rheum* **58**(2): 501-510

Nishio K, Inoue A, Qiao S, Kondo H, Mimura A (2001) Senescence and cytoskeleton: overproduction of vimentin induces senescent-like morphology in human fibroblasts. *Histochem Cell Biol* **116**(4): 321-327

Noël D, Caton D, Roche S, Bony C, Lehmann S, Casteilla L, Jorgensen C, Cousin B (2008) Cell specific differences between human adipose-derived and mesenchymal-stromal cells despite similar differentiation potentials. *Experimental Cell Research* **314**(7): 1575-1584

Noer A, Lindeman LC, Collas P (2009) Histone H3 modifications associated with differentiation and long-term culture of mesenchymal adipose stem cells. *Stem Cells Dev* **18**(5): 725-736

Noiseux N, Gnecci M, Lopez-Illasaca M, Zhang L, Solomon SD, Deb A, Dzau VJ, Pratt RE (2006) Mesenchymal stem cells overexpressing Akt dramatically repair infarcted myocardium and improve cardiac function despite infrequent cellular fusion or differentiation. *Mol Ther* **14**(6): 840-850

Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S (2007) Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* **448**(7151): 313-317

Okumura T, Wang SS, Takaishi S, Tu SP, Ng V, Ericksen RE, Rustgi AK, Wang TC (2009) Identification of a bone marrow-derived mesenchymal progenitor cell subset that can contribute to the gastric epithelium. *Lab Invest* **89**(12): 1410-1422

Oreffo RO, Viridi AS, Triffitt JT (1997) Modulation of osteogenesis and adipogenesis by human serum in human bone marrow cultures. *Eur J Cell Biol* **74**(3): 251-261

Owen M, Friedenstein AJ (1988) Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp* **136**: 42-60

Pereira RF, O'Hara MD, Laptev AV, Halford KW, Pollard MD, Class R, Simon D, Livezey K, Prockop DJ (1998) Marrow stromal cells as a source of progenitor cells for nonhematopoietic tissues in transgenic mice with a phenotype of osteogenesis imperfecta. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**(3): 1142-1147

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

Potten CS, Loeffler M (1990) Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* **110**(4): 1001-1020

Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A, Kon E, Marcacci M (2001) Repair of Large Bone Defects with the Use of Autologous Bone Marrow Stromal Cells. *New England Journal of Medicine* **344**(5): 385-386

Quirici N, Soligo D, Bossolasco P, Servida F, Lumini C, Delilieri GL (2002) Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Experimental Hematology* **30**(7): 783-791

Rheinwald JG, Hahn WC, Ramsey MR, Wu JY, Guo Z, Tsao H, De Luca M, Catricala C, O'Toole KM (2002) A two-stage, p16(INK4A)- and p53-dependent keratinocyte senescence mechanism that limits replicative potential independent of telomere status. *Mol Cell Biol* **22**(14): 5157-5172

Robles SJ, Adami GR (1998) Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. *Oncogene* **16**(9): 1113-1123

Rossant J (2001) Stem Cells from the Mammalian Blastocyst. *Stem Cells* **19**(6): 477-482

Rubio D, Garcia-Castro J, Martin MC, de la Fuente R, Cigudosa JC, Lloyd AC, Bernad A (2005) Spontaneous Human Adult Stem Cell Transformation. *Cancer Res* **65**(8): 3035-3039

Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T (2005) Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: Superiority of synovium as a cell source. *Arthritis & Rheumatism* **52**(8): 2521-2529

Sarah AW, Craig D, Patricia D-K, Claire R, Ben B, Jill MH (2003) Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *British Journal of Haematology* **121**(2): 368-374

Sato Y, Araki H, Kato J, Nakamura K, Kawano Y, Kobune M, Sato T, Miyanishi K, Takayama T, Takahashi M, Takimoto R, Iyama S, Matsunaga T, Ohtani S, Matsuura A, Hamada H, Niitsu Y (2005) Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood* **106**(2): 756-763

Schofield R (1978) The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* **4**(1-2): 7-25

Sgodda M, Aurich H, Kleist S, Aurich I, K^nig S, Dollinger MM, Fleig WE, Christ B (2007) Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from rat peritoneal adipose tissue in vitro and in vivo. *Experimental Cell Research* **313**(13): 2875-2886



Shahdadfar A, Fronsdal K, Haug T, Reinholt FP, Brinchmann JE (2005) In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability. *Stem Cells* **23**(9): 1357-1366

Shi S, Gronthos S (2003) Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res* **18**(4): 696-704

Shim WSN, Jiang S, Wong P, Tan J, Chua YL, Seng Tan Y, Sin YK, Lim CH, Chua T, Teh M, Liu TC, Sim E (2004) Ex vivo differentiation of human adult bone marrow stem cells into cardiomyocyte-like cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **324**(2): 481-488

Simmons PJ, Torok-Storb B (1991) Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* **78**(1): 55-62

Simonsen JL, Rosada C, Serakinci N, Justesen J, Stenderup K, Rattan SI, Jensen TG, Kassem M (2002) Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells. *Nat Biotechnol* **20**(6): 592-596

Siqueira da Fonseca SA, Abdelmassih S, de Mello Cintra Lavagnoli T, Serafim RC, Clemente Santos EJ, Mota Mendes C, de Souza Pereira V, Ambrosio CE, Miglino MA, Visintin JA, Abdelmassih R, Kerkis A, Kerkis I (2009) Human immature dental pulp stem cells' contribution to developing mouse embryos: production of human/mouse preterm chimaeras. *Cell Prolif* **42**(2): 132-140

Solchaga LA, Penick K, Porter JD, Goldberg VM, Caplan AI, Welter JF (2005) FGF-2 enhances the mitotic and chondrogenic potentials of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Cellular Physiology* **203**(2): 398-409

Sorrentino A, Ferracin M, Castelli G, Biffoni M, Tomaselli G, Baiocchi M, Fatica A, Negrini M, Peschle C, Valtieri M (2008) Isolation and characterization of CD146+ multipotent mesenchymal stromal cells. *Experimental Hematology* **36**(8): 1035-1046

Spees JL, Gregory CA, Singh H, Tucker HA, Peister A, Lynch PJ, Hsu S-C, Smith J, Prockop DJ (2004) Internalized Antigens Must Be Removed to Prepare Hypoimmunogenic Mesenchymal Stem Cells for Cell and Gene Therapy[ast]. *Mol Ther* **9**(5): 747-756

Spees JL, Olson SD, Ylostalo J, Lynch PJ, Smith J, Perry A, Peister A, Wang MY, Prockop DJ (2003) Differentiation, cell fusion, and nuclear fusion during ex vivo repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**(5): 2397-2402

Steinert S, Shay JW, Wright WE (2000) Transient expression of human telomerase extends the life span of normal human fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* **273**(3): 1095-1098

- Stolzing A, Coleman N, Scutt A (2006) Glucose-induced replicative senescence in mesenchymal stem cells. *Rejuvenation research* **9**(1): 31-35
- Stute N, Holtz K, Bubenheim M, Lange C, Blake F, Zander AR (2004) Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use. *Experimental Hematology* **32**(12): 1212-1225
- Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* **126**(4): 663-676
- Tamama K, Fan VH, Griffith LG, Blair HC, Wells A (2006) Epidermal Growth Factor as a Candidate for Ex Vivo Expansion of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells* **24**(3): 686-695
- Tang QQ, Otto TC, Lane MD (2003) CCAAT/enhancer-binding protein beta is required for mitotic clonal expansion during adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(3): 850-855
- Tangvoranuntakul P, Gagneux P, Diaz S, Bardor M, Varki N, Varki A, Muchmore E (2003) Human uptake and incorporation of an immunogenic nonhuman dietary sialic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(21): 12045-12050
- Tavassoli M, Crosby WH (1968) Transplantation of marrow to extramedullary sites. *Science* **161**(836): 54-56
- Tavazoie M, Van der Veken L, Silva-Vargas V, Louissaint M, Colonna L, Zaidi B, Garcia-Verdugo JM, Doetsch F (2008) A specialized vascular niche for adult neural stem cells. *Cell Stem Cell* **3**(3): 279-288
- Tio M, Tan KH, Lee W, Wang TT, Udolph G (2010) Roles of db-cAMP, IBMX and RA in aspects of neural differentiation of cord blood derived mesenchymal-like stem cells. *PLoS One* **5**(2): e9398
- Tisato V, Naresh K, Girdlestone J, Navarrete C, Dazzi F (2007) Mesenchymal stem cells of cord blood origin are effective at preventing but not treating graft-versus-host disease. *Leukemia* **21**(9): 1992-1999
- Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD (2002) Human Mesenchymal Stem Cells Differentiate to a Cardiomyocyte Phenotype in the Adult Murine Heart. *Circulation* **105**(1): 93-98
- Tormin A, Li O, Brune JC, Walsh S, Sch<sup>√</sup>etz B, Ehinger M, Ditzel N, Kassem M, Scheduling S (2011) CD146 expression on primary nonhematopoietic bone marrow stem cells is correlated with in situ localization. *Blood* **117**(19): 5067-5077
- Turrini P, Monego G, Gonzalez J, Cicuzza S, Bonanno G, Zelano G, Rosenthal N, Paonessa G, Laufer R, Padron J (2004) Human hepatocytes in mice receiving pre-immune injection with human cord blood cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **326**(1): 66-73

- Vassilopoulos G, Wang P-R, Russell DW (2003) Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* **422**(6934): 901-904
- Vukicevic V, Jauch A, Dinger TC, Gebauer L, Hornich V, Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, Müller AM (2010) Genetic instability and diminished differentiation capacity in long-term cultured mouse neurosphere cells. *Mechanisms of Ageing and Development* **131**(2): 124-132
- Wagner W, Horn P, Castoldi M, Diehlmann A, Bork S, Saffrich R, Benes V, Blake J, Pfister S, Eckstein V, Ho AD (2008) Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process. *PLoS One* **3**(5): e2213
- Warburton PE, Greig GM, Haaf T, Willard HF (1991) PCR amplification of chromosome-specific alpha satellite DNA: definition of centromeric STS markers and polymorphic analysis. *Genomics* **11**(2): 324-333
- Wersto RP, Chrest FJ, Leary JF, Morris C, Stetler-Stevenson M, Gabrielson E (2001) Doublet discrimination in DNA cell-cycle analysis. *Cytometry* **46**(5): 296-306
- WHO (1997) Medicinal and other products and human and animal transmissible spongiform encephalopathies: memorandum from a WHO meeting. *Bull World Health Organ* **75**(6): 505-513
- Wieser M, Stadler G, Böhm E, Borth N, Kättinger H, Grillari J, Voglauer R (2006) Nuclear flow FISH: isolation of cell nuclei improves the determination of telomere lengths. *Exp Gerontol* **41**(2): 230-235
- Winter A, Breit S, Parsch D, Benz K, Steck E, Hauner H, Weber RM, Ewerbeck V, Richter W (2003) Cartilage-like gene expression in differentiated human stem cell spheroids: A comparison of bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells. *Arthritis & Rheumatism* **48**(2): 418-429
- Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Byrd W, Shay JW (1996) Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet* **18**(2): 173-179
- Yokoo T, Ohashi T, Shen JS, Sakurai K, Miyazaki Y, Utsunomiya Y, Takahashi M, Terada Y, Eto Y, Kawamura T, Osumi N, Hosoya T (2005) Human mesenchymal stem cells in rodent whole-embryo culture are reprogrammed to contribute to kidney tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(9): 3296-3300
- Zhang Z-Y, Teoh S-H, Chong MSK, Schantz JT, Fisk NM, Choolani MA, Chan J (2009) Superior Osteogenic Capacity for Bone Tissue Engineering of Fetal Compared with Perinatal and Adult Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells* **27**(1): 126-137
- Zimmermann S, Voss M, Kaiser S, Kapp U, Waller CF, Martens UM (2003) Lack of telomerase activity in human mesenchymal stem cells. *Leukemia* **17**(6): 1146-1149
- Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH (2002) Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Mol Biol Cell* **13**(12): 4279-4295

**Andere Quellen:**

- Terese Winslow, Caitlin Duckwall 2001 in Stem Cell Information [World Wide Web Seite]. Bethesda, MD: National Institutes of Health (NIH), U.S. Department of Health and Human Services, 2009 [zitiert 9.12.2011]  
URL:<http://stemcells.nih.gov/info/2001report/2001report>
- Clinicaltrial.gov (elektronische Datenbank). U.S. National Library of Medicine Service der NIH zitiert 12.6.2010 URL: <http://clinicaltrials.gov/>
- <http://www.ema.europa.eu> [World Wide Web Seite] European Medicines Agency (EMA) (Doc. Ref. EMA/CHMP/410869/2006)

## 7. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Professor Albrecht Müller für die Überlassung des interessanten Themas und die großartige Chance in seiner Arbeitsgruppe zu lernen. Zudem danke ich ihm für seine wissenschaftliche Unterstützung während der Durchführungen und der Fertigstellung dieser Arbeit.

Weiterhin möchte ich Professor Ricardo Benavente für die Bereitschaft danken, diese Arbeit als Mitglied der biologischen Fakultät der Universität Würzburg zu begutachten.

Mein Dank geht auch an unsere Kooperationspartner Dr. Karen Bieback, Professor Harald Klüter und Andrea Hecker (Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie Mannheim) für die Bereitstellung der MSCs, aber auch für ihr großes Engagement und ihre wissenschaftliche Unterstützung. Ebenso möchte ich Dr. Heinrich Lannert und Professor Anthony D. Ho (Medizinische Klinik V, Universität Heidelberg) für die Bereitstellung der CD271-positiven Knochenmarkszellen danken.

Danken möchte ich auch Professor Thomas Raabe (Institut für Medizinische Strahlenkunde und Zellforschung Würzburg) für die Möglichkeit die Mikroskopausstattung seiner Arbeitsgruppe zu benutzen.

Ohne die finanzielle Unterstützung durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung im Rahmen des START-MSC Projektes hätte diese Arbeit nicht durchgeführt werden können.

Mein besonderer Dank geht an Veronika Hornich und Andrea Reusch für ihre Unterstützung, ihr Engagement und ihre wertvolle Expertise, ohne die ein Teil dieser Arbeit so nicht möglich gewesen wäre.

Danken möchte ich auch Dr. Timo Dinger und Ruhel Ahmad für die Anregungen und Ratschläge während des Schreibens dieser Doktorarbeit.

Allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Müller, mit denen ich zusammenarbeiten durfte, möchte ich für die große Hilfsbereitschaft, die Vielzahl

wertvoller Diskussionen und Anregungen sowie ihre Freundschaft danken: Andrea, Jenny, Kallal, Linda, Nadine, Ruhel, Soon, Timo, Vroni, Xiaoli, ihr seid die Besten.

Danken möchte ich auch dem wichtigsten Menschen in meinem Leben, meiner Frau Sabine, die mich immer unterstützt hat und immer an mich geglaubt hat.

## 8. Publikationen

2009 Buchkapitel "Möglichkeiten und Chancen der Stammzellforschung: Stammzellen für Alle?" in "Forschung contra Lebensschutz? Der Streit um die Stammzellforschung" Hilpert K (Ed.)  
Müller, A. M., Obier, N., Choi, S. W., Li, X., and **Brousos, N**  
Herder Verlag, ISBN: 978-3-451-02233-3

2008 Frantz S, Vallabhapurapu D, Tillmanns J, **Brousos N**, Wagner H, Henig K, Ertl G, Muller AM, Bauersachs J (2008) Impact of different bone marrow cell preparations on left ventricular remodelling after experimental myocardial infarction. *Eur J Heart Fail* 10(2): 119-124

### **Manuskript eingereicht:**

2011 Bieback, K., Hecker, A, Schlechter, T, Hofmann Ilse, **Brousos, N.**, Redmer T., Besser, D, Kluter H, Muller AM, Becker M Replicative aging and differentiation potential of human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells expanded in pooled human or fetal bovine serum

### **Kongressbeitrag:**

**Brousos, N.** et al. (2007) Developmental potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, cord blood and fat tissue. Vortrag auf dem 2nd Congress of the German Society for Stem Cell Research, Würzburg, 04.-06.10.2007

## 9. Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher, außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlichen Graden, keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben gesucht.

Ingolstadt, den 20.12.2011

Nikos Brousos