

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik – Innenstadt
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Wolf Mutschler

**Plastizität von schnell teilenden
humanen mesenchymalen Stammzellen auf Einzelzellebene**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Matthias Wierer
aus München

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Wolf Mutschler

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Eugen Faist

PD Dr. Mechthild Stöckelhuber

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. Matthias Schieker

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 08.10.2009

1. Einleitung	5
1.1 Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC)	5
1.2 Subpopulationen von hMSC	8
1.3 Schnell-teilende mesenchymale Stammzellen (RS-Zellen).....	9
1.4 Aufgabenstellung	12
2. Material und Methoden	13
2.1 Versuchsansatz	13
2.2 Zellkultur	14
2.2.1 Zellen	14
2.2.2 Kultivierung	15
2.2.3 Einzelzellisolierung.....	16
2.3 Differenzierungsansätze	17
2.3.1 Adipogene Differenzierung	17
2.3.2 Osteogene Differenzierung.....	17
2.3.3 Chondrogene Differenzierung	18
2.4 Histologische FärbeprozEDUREN	18
2.4.1 Oil-Red-O-Färbung.....	18
2.4.2 von Kossa-Färbung	19
2.4.3 Pelletfixierung und Schnitt-Technik.....	19
2.4.4 Toluidinblau-Färbung	19
2.4.5 Immunhistochemische Färbung gegen Kollagen Typ-II.....	20
2.4.6 Fluoreszenzmikroskopie.....	21
2.5 Morphometrie und Wachstumsverhalten	23
2.6 Statistische Analyse	23
2.7 Substanzen, Materialien und Geräte.....	23
3. Ergebnisse	26
3.1 Einzelzellisolierung unter Sicht	26
3.2 Morphologie und Wachstumsverhalten.....	28
3.3 Adipogene Differenzierung.....	39
3.4 Osteogene Differenzierung	40
3.5 Chondrogene Differenzierung.....	41
3.5.1 Toluidinblaufärbung	41
3.5.2 Immunhistochemische Färbung gegen Kollagen Typ-II.....	42

4. Diskussion	43
4.1 Diskussion der Methodik.....	43
4.2 Morphologie und Wachstumsverhalten.....	45
4.3 Differenzierung.....	49
4.3.1 Adipogene Differenzierung	49
4.3.2 Osteogene Differenzierung.....	50
4.3.3 Chondrogene Differenzierung	52
5. Ausblick	54
6. Zusammenfassung.....	55
7. Literaturverzeichnis	56
8. Anhang	72
8.1 Abkürzungsverzeichnis	72
8.2 Abbildungsverzeichnis	73
8.3 Tabellenverzeichnis.....	74
8.4 Danksagung.....	75
8.5 Lebenslauf	76

1. Einleitung

1.1 Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC)

Im menschlichen Organismus existieren die verschiedensten Populationen an Stamm- bzw. Vorläuferzellen. Bei den humanen mesenchymalen Stammzellen handelt es sich um adulte Stammzellen, die im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen aus verschiedenen Geweben erwachsener Menschen isoliert werden können.

Humane mesenchymale Stammzellen haben die Fähigkeit zur Selbstreplikation sowie zur Differenzierung in die verschiedensten Gewebetypen (Baksh et al. 2004, Jiang et al. 2002, Pittenger et al. 1999), was auch als Plastizität bezeichnet wird. Das bedeutet, dass sich diese Zellen theoretisch unbegrenzt vermehren und in spezialisierte Zellen wie z.B. Osteoblasten differenzieren können. Diese Fähigkeiten sind besonders für das *tissue engineering* von Knochen von herausragender Bedeutung (Bianco et al. 2001). Die Vorstellung dem Patienten körpereigene hMSCs zu entnehmen, diese im Labor unter optimalen Bedingungen zu vermehren, anschließend an eine Leitschiene zu koppeln und nach Induzierung der osteogenen Differenzierung als Knochenersatz zu replantieren, erscheint Erfolg versprechend. Damit könnte der hohe Bedarf an Knochenersatzmaterial mit Hilfe des *tissue engineering*s gedeckt werden.

Die Differenzierbarkeit in verschiedene Gewebetypen ist wie bereits oben erwähnt eine wichtige und grundlegende Eigenschaft von mesenchymalen Stammzellen. Im Gegensatz zu den embryonalen Stammzellen, die die Fähigkeit zur Differenzierung in alle Gewebetypen aufweisen (Totipotenz), geht diese Eigenschaft im Lauf der Entwicklung im menschlichen Körper bei den hMSCs verloren. Sie sind damit nur multipotent und können in mehrere, aber nicht in alle Richtungen differenzieren. Durch Zugabe von bestimmten Stoffen in das Nährmedium sind die Zellen *in vitro* in der Lage, sich zu bestimmten Zellarten zu entwickeln. Für hMSCs konnte *in vitro* als auch *in vivo* die Differenzierbarkeit in verschiedene Gewebe mesodermalen Ursprungs nachgewiesen werden. Als Beispiele seien Knochen (Aslan et al. 2006, Bruder et al. 1998b, Haynesworth et al. 1992), Knorpel (Bernardo et al. 2007, Yoo et al. 1998, Wakitani et al. 1994), Fett (Prockop 1997), Skelettmuskel (Dezawa et al. 2005, De Bari et al. 2003, Ferrari et al. 1998), Herzmuskel (Antonitsis et al. 2008, Makino et al. 1999), Knochenmark (Majumdar et al. 1998), sowie Sehnen und Bänder (Awad et al. 1999, Young et al. 1998) genannt (siehe auch Abbildung 1). Andere Studien zeigen darüber hinaus die Möglichkeit, dass bestimmte mesenchymale Knochenmarks-

stammzellen auch keimblattübergreifend in ektodermales und endodermales Gewebe differenzieren können (Korbling et al. 2003, Jiang et al. 2002). Nachgewiesen wurde die Differenzierbarkeit von hMSCs in endodermales Gewebe in Form von Hepatozyten (Ong et al. 2006, Kang et al. 2005), Endothelzellen (Reyes et al. 2001), Hautzellen (Deng et al. 2005), Thymuszellen (Liechty et al. 2000), Inselzellen des Pankreas (Janus et al. 2003), Pneumozyten (Krause et al. 2001), daneben auch in ektodermales Gewebe in Form von Neuronen und Gliazellen (Schwartz et al. 2002, Jiang et al. 2002).

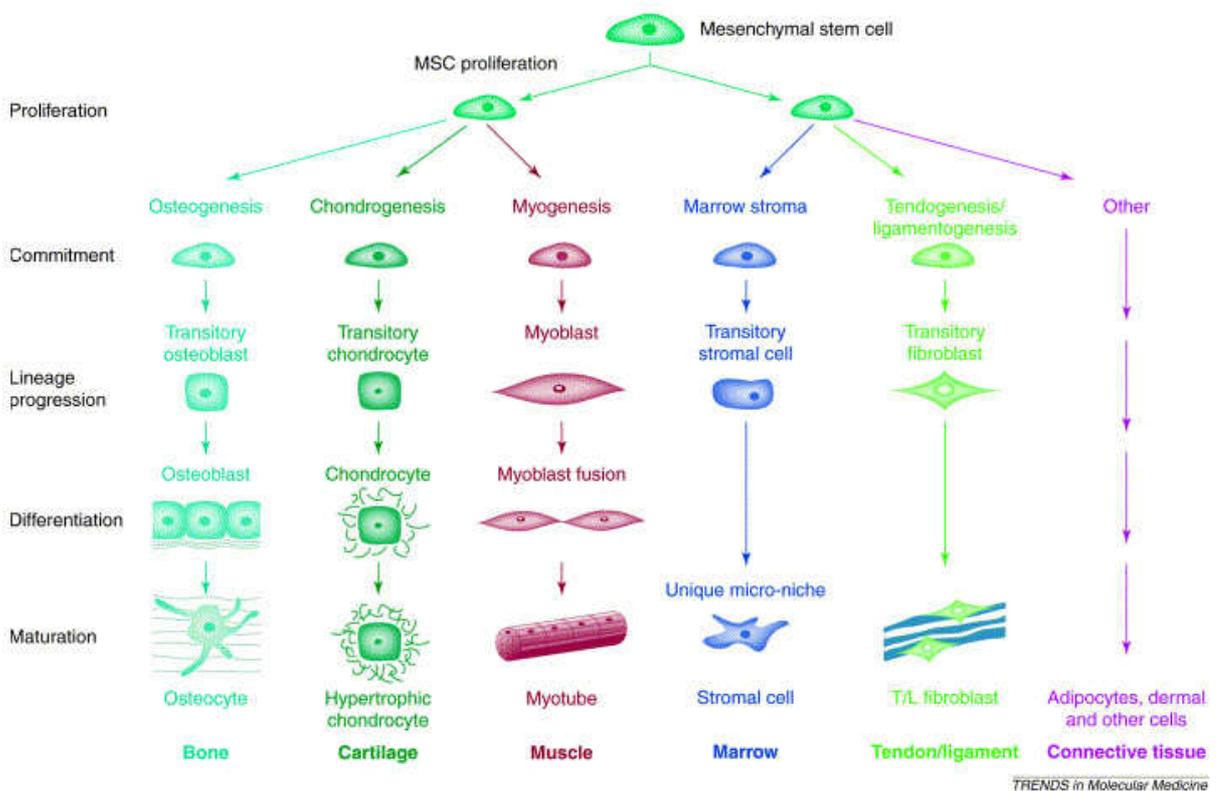


Abb. 1: Darstellung der Plastizität humaner mesenchymaler Stammzellen (Caplan et al. 2001) anhand einer Differenzierungskaskade

Humane mesenchymale Stammzellen können auf relativ einfache Weise aus verschiedenen Gewebetypen gewonnen werden. Neben dem klassischen Entnahmestort Knochenmark (Pittenger et al. 1999, Friedenstein et al. 1974, Friedenstein et al. 1966), wurden weitere Quellen wie Fettgewebe (Cowan et al. 2004, Zuk et al. 2002), Muskelgewebe (Peng et al. 2004), Periost (De Bari et al. 2006, Nakahara et al. 1991), Zahnpulpa (Gronthos et al. 2000), zirkulierendes Blut (Kassis et al. 2006, Kuznetsov et al. 2001), Synovia (De Bari et al. 2001), Haut (Young et al. 2001), tra-

bekulärer Knochen (Noth et al. 2002), Nabelschnurblut (Romanov et al. 2003, Rosada et al. 2003), Nabelschnur (Secco et al. 2008, Karahuseyinoglu et al. 2007, Wang et al. 2004), Lunge (in 't Anker et al. 2003), Amnionflüssigkeit (De Coppi et al. 2007), sowie die Plazenta (Battula et al. 2007) erschlossen. Dennoch bleibt die klinische Anwendung bis heute schwierig. Die spezifische Identifikation von hMSC stellt dabei ein großes Problem dar. Es wurde bisher noch kein charakteristischer Marker gefunden, der spezifisch für hMSC ist, wie er z.B. für die hämatopoetische Stammzelle mit CD 34 nachgewiesen wurde (Buhring et al. 2007, Kassem 2006, Kemp et al. 2005, Barry et al. 2004, Javazon et al. 2004, Jiang et al. 2002, Bianco et al. 2000, Conget et al. 1999). Die Anzahl der Marker zum Nachweis von hMSCs steigt zwar beständig an und es wurden etliche Versuche unternommen hMSC mittels Antigenen gegen Oberflächenproteine zu charakterisieren (Gang et al. 2007, Honczarenko et al. 2006, Kemp et al. 2005, Otto et al. 2004, Gronthos et al. 2003, Majumdar et al. 2003, Jiang et al. 2002, Bruder et al. 1998c, Haynesworth et al. 1992). Jedoch wird keiner dieser Marker allein durch hMSC exprimiert. Zudem ist die Vergleichbarkeit der einzelnen Studien schwierig. Die Arbeiten unterscheiden sich in den verschiedenen Arbeitsgruppen im Entnahmeort, der Isolierungstechnik wie z.B. Adhärenz an Zellkulturplastikoberflächen oder FACS, den Kulturbedingungen und den verschiedenen Methoden der Auswertung. Auch zur Unterscheidung zwischen hMSCs und Osteoprogenitorzellen gibt es keinen spezifischen Marker, so dass der gleichzeitige Nachweis mehrerer Antigene auf einer einzelnen Zelle eine sinnvolle Methode zur besseren Charakterisierung der Zellen darstellt (Schieker et al. 2007, Kemp et al. 2005, Schieker et al. 2004).

In der Praxis haben sich die folgenden drei Eigenschaften zur Definition von mesenchymalen Stammzellen durchgesetzt: Selbstreplikationsfähigkeit, Plastizität und Hierarchie. Die Selbstreplikation beschreibt die zumindest theoretische bestehende Möglichkeit zur unendlichen Zellteilung. Bei der Plastizität handelt es sich um die bereits beschriebene Fähigkeit zur Differenzierung in bestimmte Gewebetypen, wobei für hMSCs *in vitro* mindestens die Differenzierung in die drei Richtungen Fett, Knochen und Knorpel gefordert werden (Raimondo et al. 2006b, Jaiswal et al. 2000). Die Hierarchie ist definiert durch eine nicht vorhandene Fähigkeit der differenzierten Zelle in die Stammzelle rezudifferenzieren. Es gibt aber bereits erste Meinungen, dass diese Charakteristika, die ihren Ursprung in Beobachtungen der klassischen hämatopoetischen Stammzelle haben, besonders in Bezug auf die Selbstreplikation und die Hierarchie nicht notwendigerweise auf alle Stammzelltypen anzuwenden ist (Zipori

2005). Als die wichtigste Eigenschaft für hMSC wird deshalb die Plastizität erachtet, während Selbstreplikation und Hierarchie nicht essentiell sind (Delorme et al. 2006). In Zusammenfassung der bisherigen Erkenntnisse hat die Internationale Gemeinschaft für Zelltherapie (ISCT) zudem eine Definition für hMSC mit den Minimal Kriterien der Plastikadhärenz, der Expression bestimmter Oberflächenantigene wie z.B. CD105 (Endoglin) und die Differenzierbarkeit in Osteoblasten, Adipozyten und Chondrozyten vorgeschlagen (Dominici et al. 2006, Horwitz et al. 2005). In der Praxis wird der Nachweis von hMSC in den meisten Studien indirekt über die Eigenschaft der Plastizität geführt (Raimondo et al. 2006a, Schieker et al. 2004, Pittenger et al. 1999, Bruder et al. 1998a, Jaiswal et al. 1997). Diese Prozedur zur Erkennung der hMSC stellt sich allerdings als Problem für das *tissue engineering* dar. Durch den Vorgang der Differenzierung verlieren die Zellen die Fähigkeit zur Selbstreplikation (Aubin 1998) und können nur noch begrenzt für die Anwendung *in vivo* vermehrt werden.

1.2 Subpopulationen von hMSC

In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass hMSC, ausgehend von einzelnen Zellen, *in vitro* Kolonien bilden können (Owen et al. 1988, Mets et al. 1981, Castro-Malaspina et al. 1980). Diese Zellkolonien wurden in ihrem Erscheinungsbild als heterogen beschrieben und enthielten zumindest zwei morphologisch verschiedene Zelltypen: spindelige fibroblastenähnliche Zellen und große abgeflachte Zellen (Kuznetsov et al. 1997, Bruder et al. 1997). Weiterführende Studien konnten bei der Beschreibung der unterschiedlich konfigurierten hMSC signifikante Unterschiede in der Proliferationskapazität nachweisen (Lee et al. 2006, Prockop et al. 2001). Innerhalb der humanen mesenchymalen Stammzellen existieren also verschiedene Subpopulationen. Weiterführende Studien zeigten zudem das Vorkommen einer dritten Gruppe, den sogenannten rapidly self renewing cells (RS-Zellen). Diese treten auf, wenn die Zellen in sehr geringen Dichtegradien kultiviert werden (Sekiya et al. 2004, Sekiya et al. 2002, Colter et al. 2001, Colter et al. 2000). Jedoch enthalten Kolonien, die aus einer Zelle entstanden sind, auch Zellen mit dem bereits zuvor beschriebenen Phänotyp und sind somit in ihrer Morphologie heterogen (siehe Abbildung 2).



Abb. 2: Die unterschiedlichen Subtypen von hMSCs: (RS) rapidly self-renewing cells = RS-Zellen, (SS) spindle shaped cells = spindelige fibroblastenähnliche Zellen, (FC) flat cells = große, abgeflachte Zellen. Messbalken = 100 μ m (Schieker 2007)

1.3 Schnell teilende mesenchymale Stammzellen (RS-Zellen)

RS-Zellen sind im Vergleich zu den beiden anderen Subpopulationen (SS- und FC-Zellen) sehr klein und teilen sich sehr schnell. Dies spiegelt sich auch in der Morphologie wider. Die kleinen Zellen mit einem maximalen Durchmesser von ca. 100 μ m in Adhärenz haben ausgeprägte Membranverdickungen im Sinne von Lamellipodienbildung als Zeichen der Zell-Bewegung (siehe Abbildung 3 und 4).

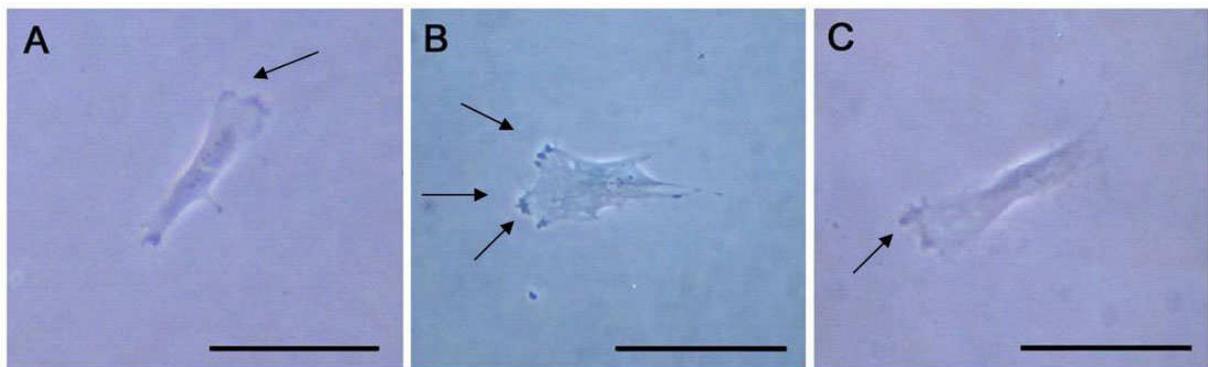


Abb. 3: (A-C) Typische Zellmorphologien von RS-Zellen nach Einzelzellisolierung aus einer heterogenen hMSC-Zellkultur mit ausgeprägten Membranverdickungen (Lamellipodia, \rightarrow) als Zeichen ihrer Migrationsaktivität. Messbalken = 50 μ m (Schieker 2007)

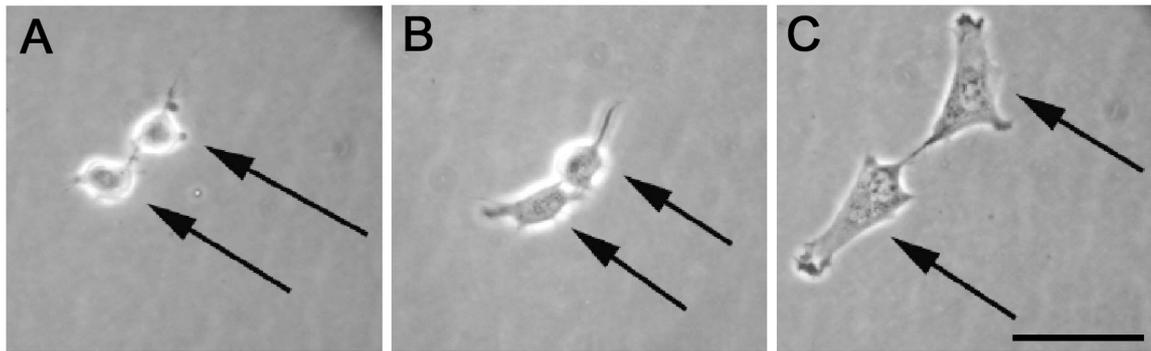


Abb. 4: (A-C) Zeitreihenaufnahme zweier RS-Zellen (\rightarrow) während der Zellteilung (A), nach 10 min (B) und nach 110 min (C). Die Zellen wandern entlang ihrer Membranverdickungen (Lamillipodia) auseinander. Messbalken = 50 μ m (Schieker 2007)

Zudem besitzen RS-Zellen ein erhöhtes Potential zur Differenzierung in verschiedene Richtungen (Smith et al. 2004, Colter et al. 2001). So konnte ausgehend von Einzelzellen, die durch FACS isoliert wurden, eine Differenzierung in die adipogene und osteogene Richtung gezeigt werden.

Das Problem der genauen Identifikation stellt sich auch hier. Erste Versuche haben für die RS-Zellen im Vergleich mit älteren hMSCs einige Oberflächenantigene wie VEGF, Transferrin-Rezeptor oder Annexin II als selektiv beschrieben. Jedoch zeigten sich bei diesen Untersuchungen nur ein Teil der Zellen als positiv gefärbt (Colter et al. 2001), so dass diese Marker nicht zur definitiven Unterscheidung herangezogen werden können. Unter 200 getesteten kommerziell erhältlichen Antikörpern konnte bei Untersuchungen an durch FACS isolierten hMSCs kein Antikörper gefunden werden, der kleine Zellen von größeren Zellen trennen konnte. Deshalb scheint es kein bekanntes Oberflächenantigen zu geben, um RS-Zellen in verschiedenen Ansätzen von älteren Zellen zu unterscheiden (Smith et al. 2004).

Wenn man einen Vergleich zum hämatopoetischen Zellsystem zieht, könnte es sich bei den RS-Zellen auch um vorübergehend auftretende Zellen handeln, die durch ihr schnelles Teilungsverhalten die Vermehrung der Gesamtzellzahl besonders vorantreiben. Die Existenz eben solcher Zellen wurden von Eaves und Wagers in der hämatopoetischen Zellreihe beobachtet (Wagers et al. 2002, Eaves et al. 2001). Somit wären die RS-Zellen vermutlich nicht die frühestens Vorläuferzellen in der Entwicklungslaufbahn, sondern folgen auf eine Vorläuferzelle (siehe Abbildung 5).

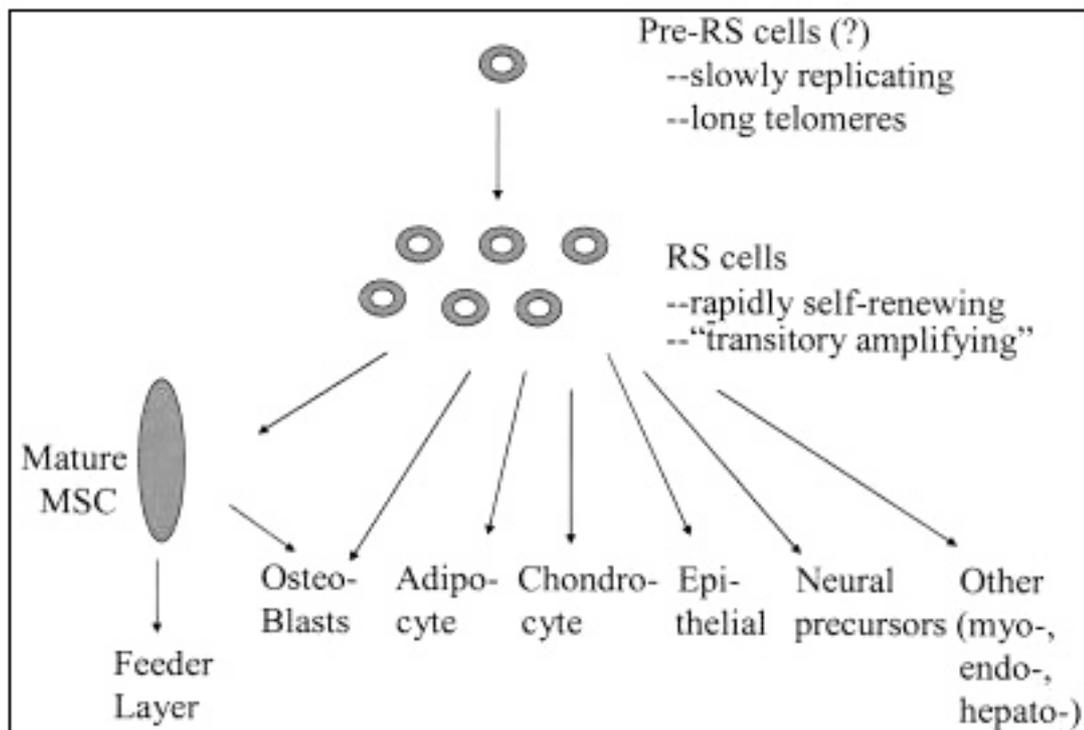


Abb. 5: Schematische Zusammenfassung der Beziehung zwischen Subpopulationen von hMSC und ihrer Differenzierung in spezifische Zelltypen. In Analogie zum hämatopoetischen Zellsystem könnten die RS-Zellen nur vorübergehend aus einer Vorläuferzelle entstehen, um das Wachstum der Gesamtpopulation bei Bedarf zu beschleunigen. (Prockop et al. 2003)

Für das *tissue engineering* sind die RS-Zellen von hohem Interesse, da sie mit den Eigenschaften des schnellen Wachstums und ihrer Multipotenz die idealen Voraussetzungen für die Gewinnung großer differenzierbarer Zellmengen bieten. Dies setzt allerdings eine genauere Charakterisierung dieser Zellen voraus, die eine Untersuchung des Wachstumsverhaltens, der Morphologie und deren Differenzierungseigenschaften einschließt.

1.4 Aufgabenstellung

Isolierte humane mesenchymale Stammzellen weisen das bereits beschriebene heterogene Erscheinungsbild auf. Um einzelne RS-Zellen auf Einzelzellebene zu untersuchen, musste zunächst der Vorgang der Einzelzellisolierung optimiert werden. Nach Isolierung einzelner Zellen unter Sicht stand die Kultivierung auf eine zur Differenzierung ausreichende Zellzahl im Vordergrund. Desweiteren sollten die Zellen nach der Einzelzellgewinnung unmittelbar nach Adhärenz und im weiteren Kultivierungsverlauf in Bezug auf ihre Größe morphologisch untersucht werden. Zudem bestand die Aufgabe darin zu untersuchen, ob die Einzelzellen in Abhängigkeit von ihrer Zellgröße ein unterschiedliches Wachstumsverhalten zeigen. Die ausführliche Charakterisierung der RS-Zellen sah auch die Differenzierung in verschiedene mesenchymale Richtungen vor. Bis dato wurde die Differenzierungsfähigkeit für RS-Zellen ausgehend von einer einzelnen Zelle nur für die adipogene und osteogene Richtung gezeigt (Smith et al. 2004). Der Nachweis der chondrogenen Differenzierung wurde lediglich für ein Zellgemisch aus kleinen hMSCs erbracht, die in geringer Zelldichte kultiviert wurden (Sekiya et al. 2002). Da das Stammzellkriterium der Plastizität aber die Differenzierung in mindestens drei Richtungen vorschreibt, sollte in dieser Arbeit neben der Differenzierung in Richtung Fett und Knochen ausgehend von einer einzelnen Zelle auch die Differenzierung in Knorpel gezeigt werden. Die Hauptziele dieser Arbeit waren es somit, die RS-Zellen in ihrer Morphologie und ihrem Wachstumsverhalten genauer zu untersuchen und die Stammzeleigenschaften einzelner RS-Zellen erstmals nach Isolierung aus einem heterogenen Zellpool an hMSCs nachzuweisen.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchsansatz

Aus einem heterogenen Zellpool humaner mesenchymaler Stammzellen wurden mittels Einzelzellisolierung einzelne Zellen unter Sicht selektioniert und bis zu einer Zellzahl von ca. 1 Mio. Zellen expandiert. Anschließend wurden die Zellen gemäß der unten aufgeführten Protokolle differenziert und histologisch gefärbt. Die Versuche wurden stets mit einer parallelen Kontrollgruppe bestehend aus Zellen des heterogenen Zellpools durchgeführt (siehe Abbildung 6). Diese Verfahren wurden innerhalb von 5 Versuchsreihen durchgeführt.

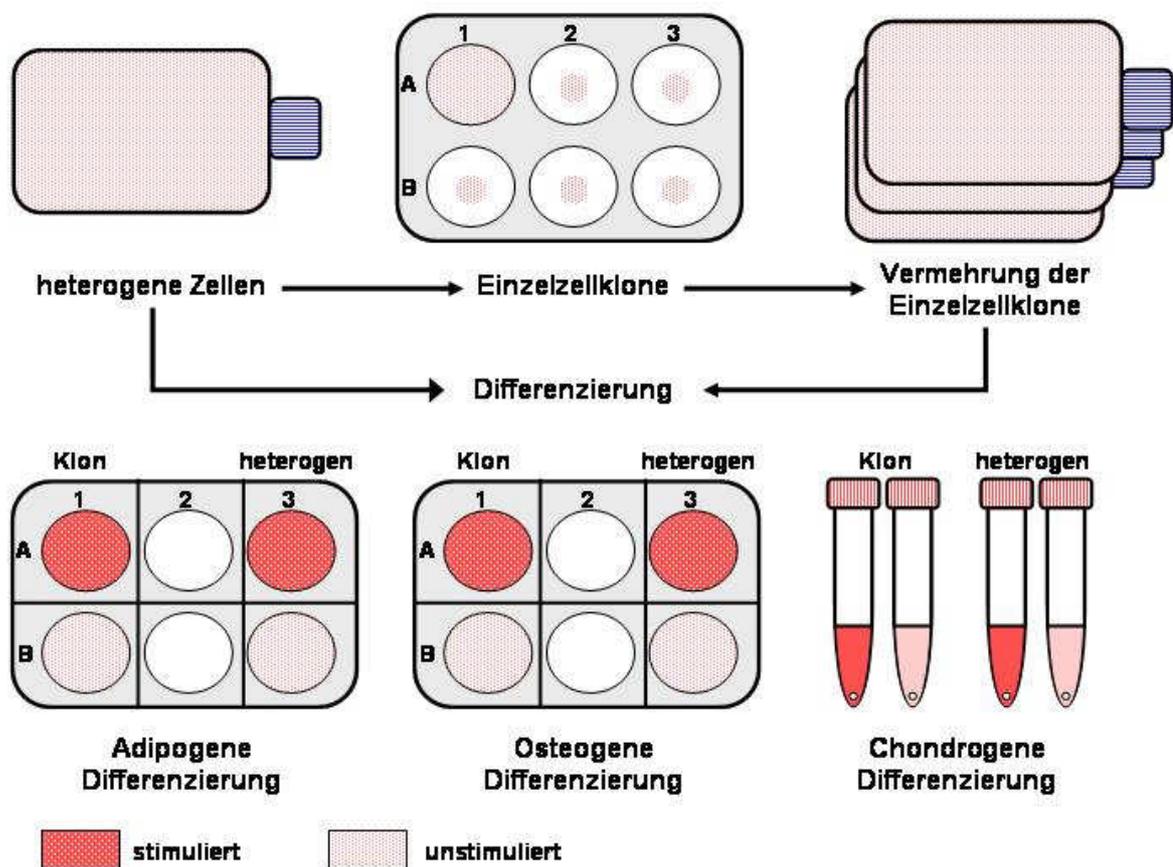


Abb. 6: Schematische Darstellung des Versuchsansatzes: Aus dem heterogenen Zellpool wurden die Einzelzellen mittels Einzelzellpickens isoliert und klonal expandiert. Nach Erreichen einer Zellzahl von ca. 1 Million Zellen wurde der Differenzierungsansatz begonnen. Differenziert wurden jeweils die Einzelzellklone und ein heterogenes Zellgemisch im Vergleich zu ihren unstimulierten Kontrollen.

2.2 Zellkultur

2.2.1 Zellen

Für sämtliche Versuche wurden humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) der Firma Cambrex (jetzt Lonza), USA verwendet (Poietics™ Human Mesenchymal Stem Cells). Diese wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation und selektiver Kultur-techniken aus dem Knochenmark gesunder Spender isoliert. Die Zellen sind vom Hersteller mittels Durchflusszytometrie auf ihren Reinheitsgrad getestet worden. Zudem wurden die Zellen mit der Durchflusszytometrie auf verschiedene Oberflächenantigene untersucht. Die Zellen sind positiv für CD105, CD166, CD29 und CD44; negativ dagegen für CD14, CD34 and CD45 (siehe Tabelle 1). Die genannten Zellen haben eine hohe Proliferationsrate und konnten u.a. von Pittenger (Pittenger et al. 1999) in drei mesenchymale Richtungen differenziert werden. Somit verfügen diese Zellen über Stammzeleigenschaften.

	CD Antigen	Alternativer Name	Funktion in der Zelle
Positiv	CD105	Endoglin	a) Teil des TGF- β -Rezeptorkomplexes b) Modulator der zellulären Antwort mit TGF- β 1
	CD166	<i>activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM)</i>	Ligand für CD6
	CD29	Integrin β 1 / Fibronectin Rezeptor	Zelladhäsion und -wiedererkennung
	CD44	<i>homing-associated cell adhesion molecule (H-CAM)</i>	a) Rezeptor für Hyaluronsäure b) Interaktion mit Osteopontin, Kollagenen, und Matrix Metalloproteinasen (MMPs)
Negativ	CD14	Lipopolysaccharid (LPS)- Rezeptor	Bindet LPS und apoptotische Zellen
	CD34	gp105-120	a) Zell-Zell Adhäsion b) Inhibierung der hämatopoetischen Differenzierung c) Expression auf humanen hämatopoetischen Progenitorzellen
	CD45	a) <i>leukocyte common antigen (LCA)</i> b) Protein Tyrosinphosphatase Rezeptor Typ C	Signalmolekül der Regulation von Zellwachstum, Mitose und onkogener Transformation

Tab. 1: Darstellung der von der Fa. Cambrex durchflusszytometrisch nachgewiesenen Oberflächenantikörper und ihrer Funktion in der Zelle

2.2.2 Kultivierung

Die Zellen wurden in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt kultiviert. Als Nährmedium wurde einerseits das von der Fa. Cambrex gelieferte *Mesenchymal Stem Cell Growth Medium* verwendet. Andererseits wurde ein *Dulbecco's Modified Eagle Medium* der Fa. Gibco zum Anzüchten der Zellen benutzt, welches 10% (v/v) FBS, 40 IU/ml Penicillin, 40 µg/ml Streptomycin sowie 5 ng/ml bFGF-2 enthält. Dabei wurde nur bei der ersten Versuchsreihe ausschließlich das Cambrex Medium genutzt. Im Weiteren wurden stets beide Medien verwendet, um einen Vergleich in Bezug auf das Wachstumsverhalten der Zellen in unterschiedlichen Medien untersuchen zu können. Die nachfolgend beschriebenen Vorgehensweisen zur Anzüchtung der Zellen wurden alle unter einer mikrobiologischen Werkbank durchgeführt, die durch einen stetigen laminaren Luftstrom ein steriles Arbeiten ermöglichte. Die Medienwechsel erfolgten während der Anzuchtungsphase alle drei bis vier Tage, während der Differenzierungsansätze je nach Protokoll der einzelnen Differenzierungen (siehe 2.3 Differenzierungsansätze). Dabei wurde das Medium mittels Vakuumpumpe und steriler Glaspipetten aus den Flaschen bzw. Wellplatten entfernt und durch frisches Medium ersetzt. Passagiert wurden die Zellen in der Kontrollgruppe bei Erreichen einer Konfluenz von ca. 80%. Bei den Klonen erfolgte die Passagierung bereits bei einer Konfluenz von ca. 30%. Im folgenden sind die einzelnen Arbeitsschritte der Passagierung aufgeführt: Es wurde zunächst das Medium aus den Flaschen bzw. Wellplatten mittels der Vakuumpumpe und Glaspipette entfernt. Anschließend wurden die Zellen mit PBS-Lösung für 30 sec gewaschen. Je nach Kulturgefäß wurden dabei unterschiedliche Volumina an PBS verwendet (6-Wellplatte 1 ml / T25: 2 ml / T75: 3 ml). Nach Absaugen des PBS-Puffers wurden die Zellen mittels Trypsin/EDTA-Lösung vom Boden abgelöst. Auch hier wurden von der Größe des Kulturgefäßes abhängig verschiedene Mengen verwendet (6-Wellplatte 0,1 ml / T25: 1 ml / T75: 2 ml). Die mikroskopische Kontrolle, ob sich alle Zellen vom Boden gelöst hatten, erfolgte nach 3-5 min. Noch adhärente Zellen wurden durch sanftes Klopfen am Kulturgefäß abgelöst. Zur Neutralisierung der Trypsin/EDTA-Lösung wurde mindestens die doppelte Menge an frischem Medium zugegeben. Bei großen Volumina wurde die Suspension zuerst bei 500g für 5 min zentrifugiert und anschließend der Überstand abgesaugt. Das so erhaltene Zellpellet wurde im Kulturmedium resuspendiert. Aus dieser Zellsuspension wurden 100 µl in ein Eppendorfgefäß überführt. 10 µl dieser Suspension wurden mit 5 µl Trypanblaulösung in einem neuen Ep-

pendorfgefäß vermennt. Daraus wurde ein ca. 10 µl großer Tropfen für die Zellzählung in der Neubauer Zählkammer verwendet. (siehe Abbildung 7).

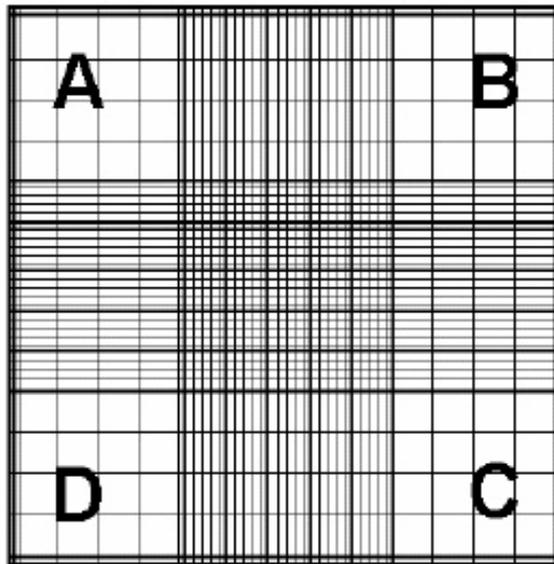


Abb. 7: Funktionsweise der Neubauer Zählkammer: Für die Zellzählung wurde die Zellzahl in den 4 Eckquadraten A, B, C und D ermittelt. Dabei wurden die sich in den jeweils 16 Kleinquadraten sowie die sich auf den oberen und linken Begrenzungslinien der Kleinquadrate befindlichen Zellen gezählt. Diese Anzahl wurde durch 4 geteilt, um einen Mittelwert pro Eckquadrat zu erhalten. Unter Einbeziehung des Volumens der Kammer (Faktor 10) und der Verdünnung durch Trypanblau (Faktor 1,5) errechnete sich die Zellzahl pro µl wie folgt: $(A+B+C+D)/4 \times 10 \times 1,5 = \text{Zellzahl}/\mu\text{l}$

Die Trypanblaufärbung diente als Marker für bereits abgestorbene Zellen. In die Zellzählung gingen nur die nicht blau markierten Zellen ein. Anhand der ermittelten Zellzahl wurden die Zellen in einer Dichte von 1000 Zellen pro cm² in Zellkulturflaschen mit 75 cm² Fläche (T75) überführt.

2.2.3 Einzelzellisolierung

Für die Herstellung von isogenetischen Zellkulturklonen ist es notwendig, eine Zellkultur von einer einzelnen Zelle aus zu starten. Dafür wurde das Verfahren der Einzelzellisolierung etabliert. Durch Vorversuche stellte sich folgendes Vorgehen als das effektivste heraus: Die Zellen wurden fünf Tage vor dem Picken in einer Konzentration von 75 Zellen pro cm² in einer Kulturflasche mit 25 cm² Fläche (T25) ausgesetzt. Am eigentlichen Tag des Picken wurden zunächst 100 µl Mediumtropfen in der Mitte der Wells A2-A3, sowie B1-B3 einer 6-Well-Schale vorgelegt und diese bis zu ihrer Verwendung im Brutschrank inkubiert (siehe auch Abbildung 6). Nun wurden die Zellen nach oben beschriebenem Protokoll von der Flasche abgelöst und in 5 ml Medi-

um aufgenommen. Anschließend wurde das Trypsinat 1:10 mit PBS verdünnt. 5 ml dieser Verdünnung wurden dann in eine Petrischale pipettiert. Aus dieser wurden unter lichtmikroskopischer Kontrolle mittels einer 10 µl Pipette einzelne Zellen herausgepickt und in die Mediumtropfen der 6-Well-Schale überführt. Nach Beendigung des Pickvorganges wurden zum Schluss 2 ml des restlichen Trypsinats als Kontrolle in das Well A1 pipettiert. Nach ca. 3 bis 4 Stunden wurden jeweils 2 ml Medium vorsichtig in die Wells mit den Einzelzellen hinzugegeben. Nach dieser Wartezeit waren die Zellen an den Wellböden adhärent und wurden durch Zugabe des Mediums nicht vom Boden abgelöst. Anschließend erfolgte das Aufsuchen der Zellen mit Hilfe des Mikroskops Axiovert S100 (Zeiss) und Dokumentation mittels einer auf dem Mikroskop montierten 3,3 Megapixel CCD Farbkamera (Cybershot DSC S75, Fa. Sony). Dafür wurde zunächst die richtige Fokussierungsebene mit Hilfe der Kontrollzellen im Well A1 aufgesucht und dann auf die anderen Wells gewechselt.

2.3 Differenzierungsansätze

2.3.1 Adipogene Differenzierung

Für die adipogene Differenzierung wurden die Zellen in einer Verdünnung von 10000 Zellen pro cm^2 in 12-Well-Schalen ausgesetzt. Mit der Differenzierung nach einem modifizierten Protokoll von Janderova et al. (Janderova et al. 2003) wurde bei Erreichen einer 100%igen Konfluenz begonnen. Die Zellen wurden 5 Tage in einem adipogenen Induktionsmedium (DMEM high-glucose, 1 µM Dexamethason, 0,2 mM Indomethacin, 0,1 mg/ml Insulin, 1 mM IBMX, 10% FBS, 40 IU/ml Penicillin/Streptomycin) und die folgenden 2 Tage in einem adipogenen Erhaltungsmedium (DMEM high-glucose, 0,1 mg/ml Insulin, 10% FBS, 40 IU Penicillin/Streptomycin) inkubiert. Dieser Zyklus wurde dreimal hintereinander durchgeführt, so dass sich eine Differenzierungsdauer von 21 Tagen ergab. Glutamin musste dem Medium nicht hinzugefügt werden, da das ausgewählte DMEM bereits 0,862 mg Glutamin pro ml Medium enthielt.

2.3.2 Osteogene Differenzierung

Die osteogene Differenzierung wurde ebenfalls in einer 12-Well-Schale durchgeführt. Auch hier betrug die initiale Zellkonzentration 10000 Zellen pro cm^2 . Nach dem Erreichen einer Konfluenz von 100% wurde die osteogene Differenzierung nach dem Protokoll von Jaiswal et al. (Jaiswal et al. 1997) durchgeführt. Die Zellen wurden dabei in

einem osteogenen Induktionsmedium (DMEM high-glucose, 100 nM Dexamethason, 10 mM β -Glycerophosphat, 0,05 mM L-Ascorbinsäure-2-Phosphat) inkubiert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 3-4 Tage mit dem Induktionsmedium. Die Differenzierungszeit betrug ebenfalls 21 Tage.

2.3.3 Chondrogene Differenzierung

Die chondrogene Differenzierung wurde in Zellpellets von ca. 400000 Zellen nach einem modifiziertem Protokoll von Johnstone et. al. (Johnstone et al. 1998) durchgeführt. Dafür wurden die Zellen mittels einer Zentrifuge (150g, 5 min) zu einem Pellet verdichtet und der Überstand abgesaugt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 ml inkompletem chondrogenen Induktionsmedium (DMEM high-glucose, 0,1 μ M Dexamethason, 1 mM Natriumpyruvat, 0,1 mM L-Ascorbinsäure-2-Phosphat, 0,35 mM Prolin, ITS (6,25 μ g/ml Insulin, 6,25 μ g/ml Transferrin, 6,25 μ g/ml Selensäure), 5,33 μ g/ml Linolsäure, 1,25 mg/ml BSA, 40 IU/ml Penicillin/Streptomycin) und erneute Zentrifugation. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Pellets im kompletten Induktionsmedium (Mediumzusammensetzung wie oben + 0,01 μ g/ml TGF- β_3) resuspendiert und im Brutschrank inkubiert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage. Die Zugabe von TGF- β_3 zum Induktionsmedium erfolgte unmittelbar vor dem Mediumwechsel. Die Differenzierungsdauer betrug 5 Wochen.

2.4 Histologische FärbeprozEDUREN

2.4.1 Oil-Red-O-Färbung

Zum Nachweis der adipogenen Differenzierung wurde eine Färbung mit Oil Red O (SIGMA) durchgeführt. Eine 0,3%ige Vorratslösung wurde durch Einwaage von 150 mg Oil Red O und Lösung in 50 ml 2-Propanol hergestellt. Diese wurde unmittelbar vor den Färbungen zu einer 0,2%igen Arbeitslösung mit destilliertem Wasser verdünnt und zur Entfernung grober Farbpigmente filtriert. Die Zellen wurden zunächst mit Formalin für 2 Minuten bei -20°C fixiert und im Anschluss mit 50%igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurde die Arbeitslösung auf die Zellen aufgebracht und nach einer Einwirkzeit von 20 min mit Hilfe einer Pipette abgesaugt. Es folgte ein erneutes Waschen mit 50%igem Ethanol. Nach Absaugen wurden die Zellen mit destilliertem Wasser unter leichtem Schwenken der 6-Well-Platte gewaschen.

2.4.2 von Kossa-Färbung

Die osteogen differenzierten Zellen wurden mit der Methode nach von Kossa gefärbt. Die in -20°C gekühltem Methanol fixierten Zellen wurden zu Beginn für 20 Minuten mit destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 5%iger Silbernitratlösung, die unter Verdunkelung mittels Styropordeckels für 5 Minuten auf den Zellen belassen wurde. Nach zweimaligem dreiminütigem Waschen mit destilliertem Wasser erfolgte dann die Zugabe von 1%iger Pyrogallussäure. Nach einer Einwirkzeit von 5 Minuten wurden die Zellen erneut mit destilliertem Wasser 3 Minuten lang gewaschen. Zur Fixierung wurde 5%ige Natronlauge über 4 Minuten verwendet. Danach folgten zuerst zwei Waschvorgänge mit Leitungswasser für jeweils 3 Minuten und ein Waschvorgang mit destilliertem Wasser. Nun folgte die Färbung mit einer Maygrünwaldlösung für 10 Minuten. Zuletzt wurden die Zellen erneut ausgiebig mit destilliertem Wasser gewaschen.

2.4.3 Pelletfixierung und Schnitt-Technik

Die Zellpellets des chondrogenen Differenzierungsansatzes wurden nach Beendigung der Kultivierungsphase zur Fixierung in 100%igen Methanol überführt. Zur Vorbereitung für die immunhistochemischen Färbungen wurden die Zellpellets mittels eines Kryostaten gefriergeschnitten. Dafür wurden die Proben zunächst am Vortag des Schneidevorgangs in einer Lösung aus PBS mit Tween und 5%iger Saccharose im Kühlschrank aufbewahrt. Das Einbettmedium wurde in die Mitte eines Stempels aufgetragen und in die Gefriervorrichtung bei -21°C gestellt. Das Zellpellet wurde anschließend in das noch flüssige Medium gelegt und endgültig geforen. Die vollständig gefrorene Probe wurde mittels Stempel in die Schneidevorrichtung eingespannt und in einer Schichtdicke von $50\ \mu\text{m}$ angeschnitten. Nach Erreichen der richtigen Schnittebene wurde die Schnittstärke auf $12\ \mu\text{m}$ gestellt. Die einzelnen Schnitte wurden anschließend auf sterile, unbeschichtete Glasobjektträger aufgebracht und luftgetrocknet. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -20°C gelagert.

2.4.4 Toluidinblau-Färbung

Die Kryoschnitte der Zellpellets wurden mit Hilfe von Toluidinblau gefärbt. Zunächst wurde eine 1%ige Färbelösung hergestellt. Dafür wurde 1 g Toluidinblau mit 1g Natriumteteraborat versetzt und in 100 ml destilliertem Wasser gelöst und vor Gebrauch zweimal filtriert. Die Färbelösung wurde für 3 Minuten auf den Objektträ-

gern belassen, bevor diese 120 Minuten in einer Wanne mit Leitungswasser gewaschen wurden. Anschließend wurden die Objektträger auf Filterpapier abgetropft und sofort mit Neomaunt eingedeckelt.

2.4.5 Immunhistochemische Färbung gegen Kollagen Typ-II

Zur Fixierung der Pelletschnitte wurde 100%iger Methanol verwendet, wobei die Objektträger für 8 min bei -20°C im Methanolbad belassen wurden. Um mehrere Pelletschnitte auf einem Glasobjektträger mit verschiedenen Antikörpern behandeln zu können, wurden die Objektträger mit einem Fettstift in mehrere Felder unterteilt. So konnte in einige Felder lediglich der Primärantikörper aufgetragen werden, ohne dass er in die jeweiligen Kontrollfelder ohne Primärantikörper auslaufen konnte. Diese Kontrollfelder wurden nur mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Nach der Fixierung mussten die Pelletschnitte in PBS mit Zusatz von Tween rehydriert werden. Daran schloss sich der Reaktionsschritt des Blockens mit 1%igem BSA an. Damit wurden negativ geladene Molekülgruppen der Pelletschnitte abgesättigt, um unspezifische Bindungen des Primärantikörpers zu minimieren. Als nächstes folgte das Aufbringen des Primärantikörpers für Kollagen Typ-II (C1IC1). Dieser von der Maus stammende Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:6 auf die jeweiligen Felder aufgebracht. Die Objektträger wurden dann für 30 min in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und anschließend erneut mit PBS gewaschen. Als Sekundärantikörper wurde ein vom Esel stammender Anti-Maus-Antikörper in einer Verdünnung von 1:100 verwendet, der mit Rhodamin Rot konjugiert war. Die Objektträger wurden nun erneut in der Feuchtkammer inkubiert und danach in PBS gewaschen. Als letzter Schritt der Färbung erfolgte das Auftragen des Fluoreszenzmarkers DAPI in einer Verdünnung von 1:10000, der durch eine Interkalierung in DNA-Abschnitte die Zellkerne in den Pelletschnitten sichtbar machte. Dieser Schritt machte es zum einen möglich die Pelletschnitte unter dem Mikroskop leichter auffindig zu machen, zum anderen diente er als Marker für die Kontrollfelder, in die nur Sekundärantikörper aufgetragen wurde und somit kein positives Signal durch Rhodamin Rot erwartet wurde. Es folgten wieder die Schritte der Inkubierung und des Waschens. Schließlich wurden die Objektträger mit DPX und Deckgläsern eingedeckelt, nachdem die Flüssigkeit zum größten Teil von den Objektträgern abgeklopft wurde. Nach einer Aushärtungsphase von ca. 3 h bei 4°C in Dunkelheit konnten die Färbungen unter dem Mikroskop (Axioskop 2000, Zeiss) ausgewertet werden. Dieses Verfahren wird im nächsten Punkt ausführlich dargestellt.

2.4.6 Fluoreszenzmikroskopie

In der Fluoreszenzmikroskopie werden die Präparate mit sogenannten Fluorochromen wie z.B. DAPI behandelt. Diese Moleküle sind in der Lage Licht einer bestimmten Wellenlänge zu absorbieren, um sie kurze Zeit später wieder mit einer 20 bis 50 Nanometer größeren Wellenlänge zu emittieren (siehe Abbildung 8). Diese Verschiebung wird nach ihrem Entdecker als Stokes-Verschiebung bezeichnet.

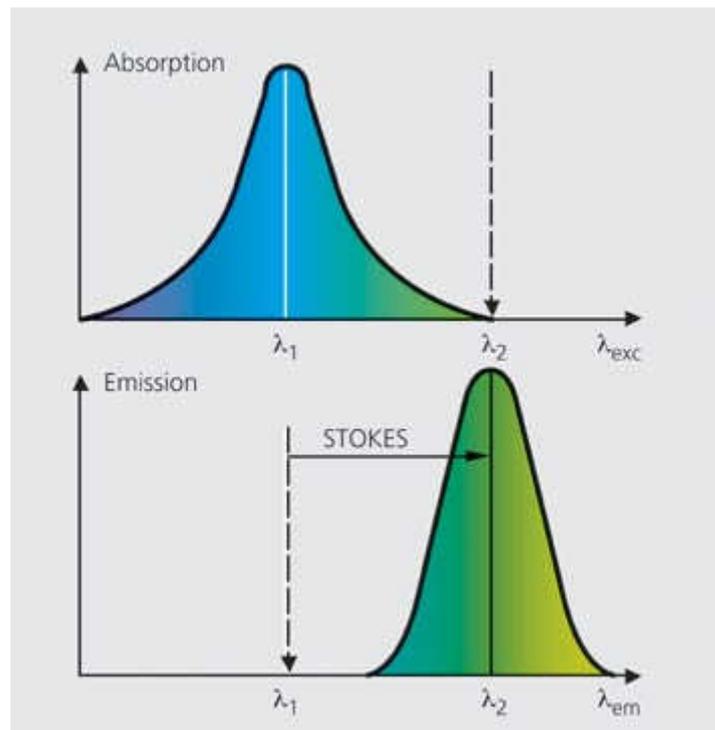


Abb. 8: Spektrale Lage vor Absorption und Emission bei Fluoreszenz (Quelle: www.zeiss.de)

Als Lichtquelle wurde eine 75 Watt Xenon Kurzbogenlampe verwendet, die nach dem Prinzip der Gasentladung arbeitet und damit kein kontinuierliches, sondern ein diskretes Lichtspektrum aufweist. Dabei wird die abgestrahlte Lichtenergie bei bestimmten Wellenlängen konzentriert (siehe Abbildung 9).

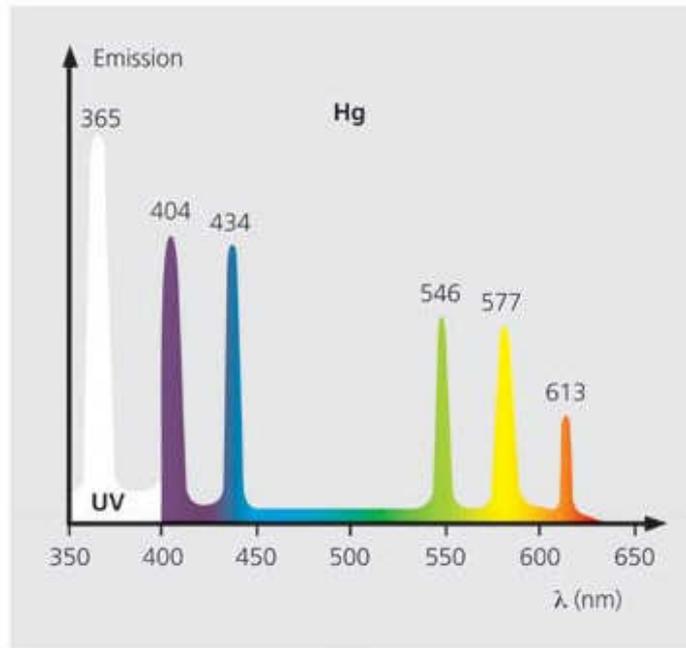


Abb. 9: Lichtspektrum einer Quecksilberhochdrucklampe: Die sog. „Quecksilberlinien“ sind durch die einzelnen Kurvenspitzen dargestellt. (Quelle: www.zeiss.de) Die verwendete Xenon Kurzbogenlampe hat ein ähnliches Lichtspektrum.

Der Vorteil dieses Linienstrahlers liegt im Wechsel von intensiven Linien und schwachen Spektralbereichen, den man sich bei der Fluoreszenz zu Nutze macht. Die Anregung erfolgt im Bereich einer Linie und die Fluoreszenz kann bei einer Wellenlänge beobachtet werden, bei der die Leuchte durch ihr Licht wenig stört. Auf diese Weise wird das Fluorochrom DAPI bei einer Wellenlänge von 359 nm angeregt. Dies entspricht in Abbildung 9 der weißen Quecksilberlinie. Emittiert wird das Licht bei einer Wellenlänge von 461 nm, also in einem schwachen Spektralbereich. Für Rhodamin Rot liegen die Wellenlängen bei 573 nm für die Anregung und bei 591 nm für die Emission. Durch einen speziellen Filtersatz mit Kombinationen aus Strahlteilerreflektor und Sperrfilter wird lediglich das emittierte Fluoreszenzlicht zum Objektiv hindurchgelassen. Für die vorliegende Arbeit wurden die passenden Filtersätze 01 und 15 der Fa. Zeiss verwendet.

2.5 Morphometrie und Wachstumsverhalten

Für eine morphometrische Untersuchung wurden die einzelzellisolierten Zellen nach Adhäsion und Mediumzugabe in Phasenkontrastmikroskopie mit einer Digitalkamera fotografiert. Die Bilder wurden anschließend mit Hilfe eines Bildanalyse-Systems (KS 400, Fa. Zeiss) ausgewertet, in dem die Zellen mit der Maus markiert wurden. Die Analyse beinhaltete die Berechnung der Zellfläche und des maximalen Zelldurchmessers.

Die Anzahl der im Well vorhandenen Zellen wurde bei allen gepickten Zellen an Tag 1, 4 und 8 dokumentiert. Bei den 4 Klonen, die eine ausreichende Zellzahl erreichten, wurden außerdem die Tage 15, 21 und 29 berücksichtigt, um Wachstumskurven über einen Zeitraum von 4 Wochen erstellen zu können.

2.6 Statistische Analyse

Die statistische Analyse beinhaltete die Berechnung des arithmetischen Mittelwertes sowie der Standardabweichungen der Teilungsraten an Tag 4 und Tag 8 beim Vergleich der beiden Medien auf ihr Wachstumsverhalten. Zudem erfolgte eine Testung der Korrelation in Bezug auf Zellgröße, Zelldurchmesser, Zellzahl am Tag 4 und Zellzahl am Tag 8 und Anzahl der RS-Zellen an der Gesamtzahl der Zellen an Tag 4 und Tag 8. Die Auswertung wurde mit dem Programm *Stat View 5.0.1* (SAS Inst. Inc., NC, USA) durchgeführt.

2.7 Substanzen, Materialien und Geräte

In den folgenden Tabellen sind die verwendeten Substanzen, Materialien und Geräte mit Typen- und Herstellerbezeichnung aufgeführt, die für die Durchführung der Versuche dieser Arbeit benutzt wurden.

Antikörper	Verdünnung	Spezies	Typ	Hersteller
Kollagen Typ 2	1:6	Maus	CIIC1	Developmental Studies Hybridoma Bank
Rhodamine Red- X	1:100	Esel	715-295-150	Dianova
DAPI	1:10000		D-1306	Molecular Probes

Tab. 2: Übersicht über die verwendeten Antikörper und Kernfarbstoff DAPI

Materialien	Typ	Hersteller
Kulturflaschen T25	156367	Nunc, USA
Kulturflaschen T75	156499	Nunc, USA
Multischale 6-Well	140675	Nunc, USA
Multischale 12-Well	150628	Nunc, USA
Serologische Pipetten 2 ml	86.1252.025	Sarstedt, Deutschland
Serologische Pipetten 5 ml	86.1253.025	Sarstedt, Deutschland
Serologische Pipetten 10 ml	86.1254.025	Sarstedt, Deutschland
Serologische Pipetten 25 ml	86.1685.020	Sarstedt, Deutschland
Pasteurpipetten	9411020	Wagner und Kunz, Deutschland
Sterilfilter	SLGP033RB	Millipore, Irland
Glasobjektträger	AA00000112E	Menzel-Gläser, Deutschland
Deckgläser	BB024060A1	Menzel-Gläser, Deutschland
Reaktionsgefäße	759705	Eppendorf, Deutschland
Petrischalen	82.1473	Sarstedt, Deutschland
Pipettenspitzen D10	F161631	Gilson, USA
Pipettenspitzen DL10	F161451	Gilson, USA
Pipettenspitzen D200	F161931	Gilson, USA
Pipettenspitzen D1000	F161671	Gilson, USA
Fettstift	S2002	Dako, Deutschland
Eindeckmedium DPX	44581	Sigma-Aldrich, USA
Reagenzröhren 50 ml	62.548.004	Sarstedt, Deutschland
Reagenzröhren 15 ml	62.554.001	Sarstedt, Deutschland
Kryostatklingen	R35	Feather, Japan

Tab. 3: Übersicht über die verwendeten Materialien

Chemikalien und Reagenzien	Typ	Hersteller
DMEM	31966-021	Gibco / Invitrogen, USA
MSCGM	PT-3001	Cambrex, USA
D-PBS	14190-094	Gibco / Invitrogen, USA
FBS	F 7524	Sigma-Aldrich, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	15140-122	Gibco / Invitrogen
Trypanblau 0,4%	15250-061	Gibco / Invitrogen
Dexamethason	D-2915	Sigma-Aldrich, Deutschland
Sodiumpyruvat	S-8636	Sigma-Aldrich, Deutschland
L-Ascorbinsäure	A-8960	Sigma-Aldrich, Deutschland
L-Prolin	P-5607	Sigma-Aldrich, Deutschland
ITS	I-3146	Sigma-Aldrich, Deutschland
Linolsäure	L-5900	Sigma-Aldrich, Deutschland

BSA	A-9418	Sigma-Aldrich, Deutschland
rhTGF- β_3	243-B3	Sigma-Aldrich, Deutschland
Insulin	I-0516	Sigma-Aldrich, Deutschland
β -Glycerophosphat	G-9891	Sigma-Aldrich, Deutschland
Indomethacin	I-5879	Sigma-Aldrich, Deutschland
IBMX	I-7378	Sigma-Aldrich, Deutschland
Oil Red O	O-0625	Sigma-Aldrich, Deutschland
Toluidinblau	52040	Sigma-Aldrich, Deutschland
Silbernitratlösung 5%		Apotheke Klinikum Innenstadt
Pyrogallussäure 1%	P 0121	AKJ
Maygrünwaldlösung	1.01424.0500	Merck, Deutschland
2-Propanol		Apotheke Klinikum Innenstadt
Formaldehyd		Apotheke Klinikum Innenstadt
Ethanol 70%		Apotheke Klinikum Innenstadt
Ethanol pro analysi	100983	Merck, Deutschland
Methanol pro analysi	1.06009.2500	Merck, Deutschland

Tab. 4: Übersicht über die verwendeten Chemikalien und Reagenzien

Geräte	Typ	Hersteller
Autoklav	Zirbus LTA400	Apparate u. Maschinenbau GmbH, Deutschland
Bildanalysesystem	KS 400 Version 3.0	Zeiss, Deutschland
Brutschrank	IG 150	Jouan, Frankreich
Digitalkamera		Sony, Japan
Laborwaage	Typ 770	Kern, Deutschland
Mikrobiolog. Werkbank	Biohit	Antares, Deutschland
Mikroskop	Axiovert S 100	Zeiss, Deutschland
Mikroskop	Axioskop 2000	Zeiss, Deutschland
Mikroskop	Axiophot	Zeiss, Deutschland
Pipettierhilfe	Pipettus akku	Hirschmann, Deutschland
Schüttler	Typ VM4	CAT, Deutschland
Zentrifuge	CT 422	Jouan, Frankreich
Zentrifuge	Universal 16 R	Hettich, Deutschland
Neubauer Zählkammer	717805	Brand, Deutschland
Schlauchpumpe	IPC 8	Ismatec, Deutschland
Kryostat Vacutome	HM 200 OM	Microm, Deutschland

Tab. 5: Übersicht über die verwendeten Geräte

3. Ergebnisse

3.1 Einzelzellisolierung unter Sicht

Nach Optimierung des Protokolls zur Einzelzellisolierung war es möglich eine einzige Zelle unter mikroskopischer Sichtkontrolle in die Pipettenspitze einzusaugen. Die folgende Bildsequenz zeigt diesen Vorgang. Man erkennt deutlich wie die einzelne Zelle, die mit einem roten Kreis und Pfeil markiert ist, in die Pipettenspitze eingesaugt wird.

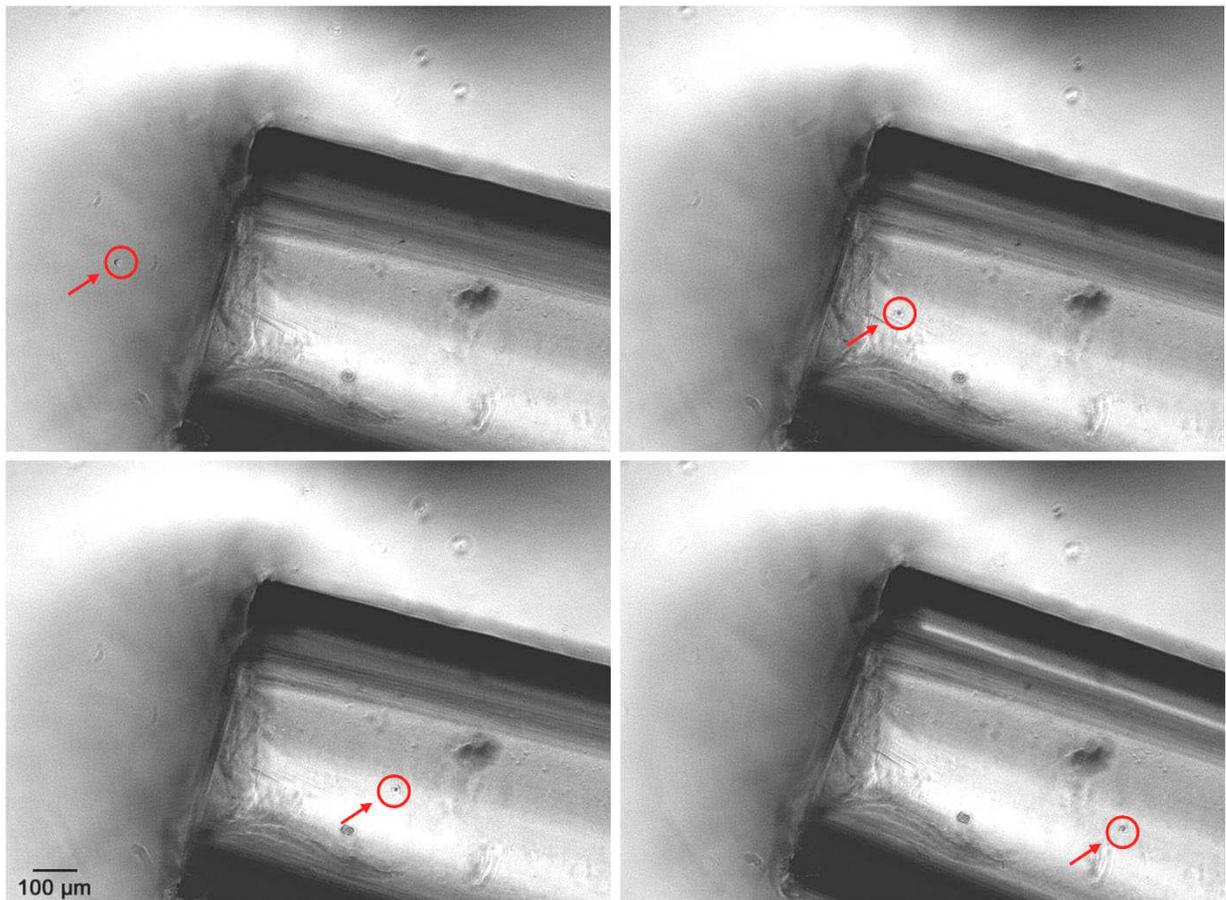


Abb. 10: Vorgang der Einzelzellisolierung: Die Markierungen mit Kreis und Pfeil zeigen die einzelne Zelle, während sie in die 10 µl Pipettenspitze eingesaugt wird.

Die einzelnen Zellen wurden in einen vorbereiteten 100 µl Mediumtropfen pipettiert. Als zusätzlichen Kontrollschritt zum Nachweis einer einzelnen Zelle wurden die Zellen nach vier Stunden Inkubation im Brutschrank unter dem Mikroskop aufgesucht und mit der Digitalkamera fotografiert. Durch die Kontrolle bei der Isolierung unter Sicht und der folgenden Kontrolle nach vier Stunden Inkubation und Adhärenz der Zelle am Wellboden konnte sicher gestellt werden, dass sich lediglich eine einzelne

Zelle in dem Well befand. Zudem konnte die Morphologie der Zelle zu Beginn der Expansion erfasst und dokumentiert werden. Die nachfolgende Abbildung 11 zeigt eine solche Einzelzelle.



*Abb. 11: Bild einer Einzelzelle nach erfolgter Adhärenz vier Stunden nach dem Isoliervorgang.
Messbalken = 100 μ m*

3.2 Morphologie und Wachstumsverhalten

Der Zellpool der hMSC ist durch die beschriebenen Subpopulationen heterogen. In der Auswertung der fotografierten Einzelzellen konnten erwarteter Weise die bereits von anderen Autoren beschriebenen drei verschiedenen Zelltypen nachgewiesen werden. Es fanden sich kleine rundliche bis trianguläre Zellen von einer maximalen Größe von 100 μm , die in ihrer Morphologie mit phasenkontrastdichten Membranabschnitten den RS-Zellen entsprachen. Ferner konnten spindelförmige fibroblastenähnliche Zellen und große flache Zellen beobachtet werden. (siehe Abbildung 12).

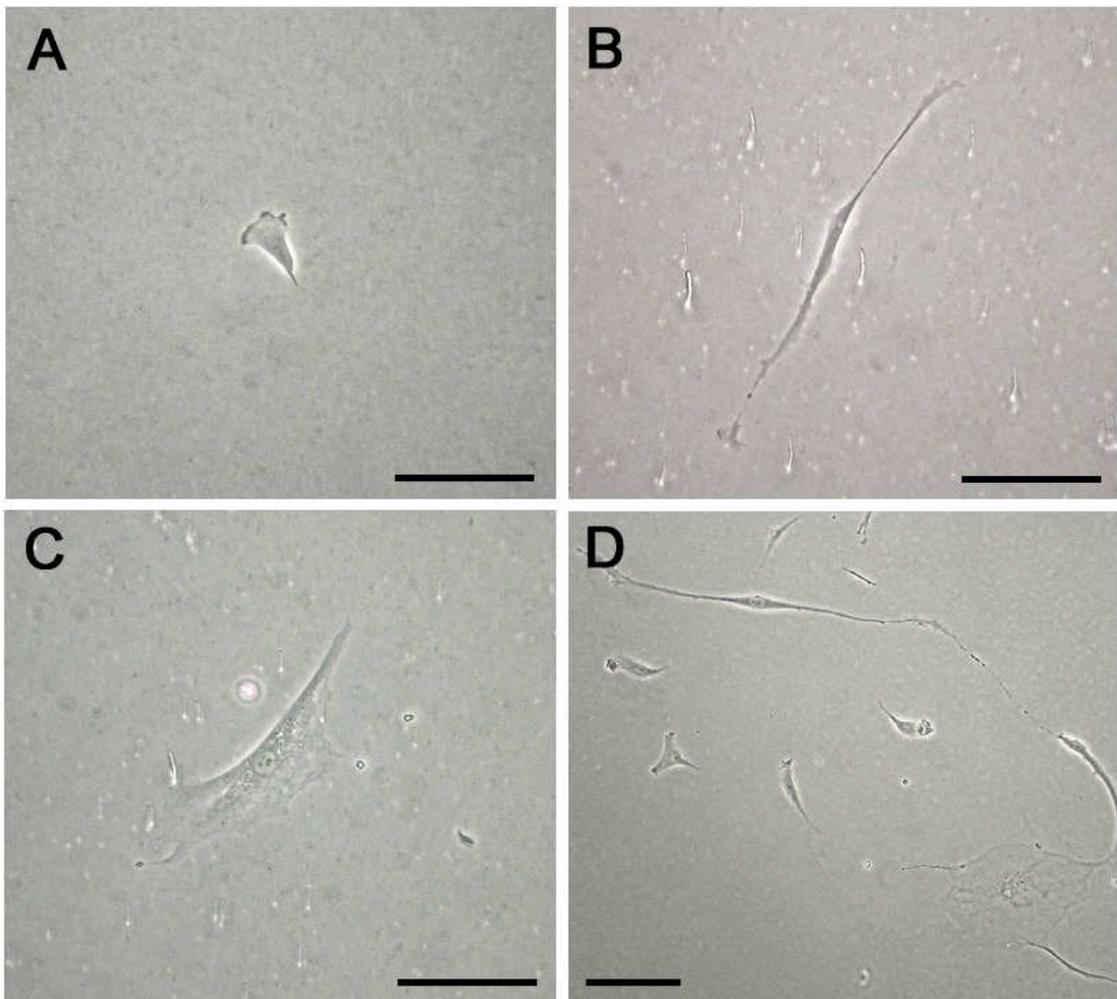


Abb. 12: Subpopulationen von hMSC; (A) kleine rundlich bis trianguläre RS-Zelle; (B) lange spindelförmige Zelle; (C) große flache Zelle; (D) Auftreten aller drei Subpopulationen nach 2 Wochen Expansion ausgehend von einer Einzelzelle. Messbalken = 100 μm

Doch auch innerhalb dieser drei Subpopulationen stellen sich die Zellen unterschiedlich dar. Abbildung 13 vermittelt anhand von 16 einzellisolierten Zellen einen Eindruck über die verschiedenartige Morphologie innerhalb der Subgruppen.

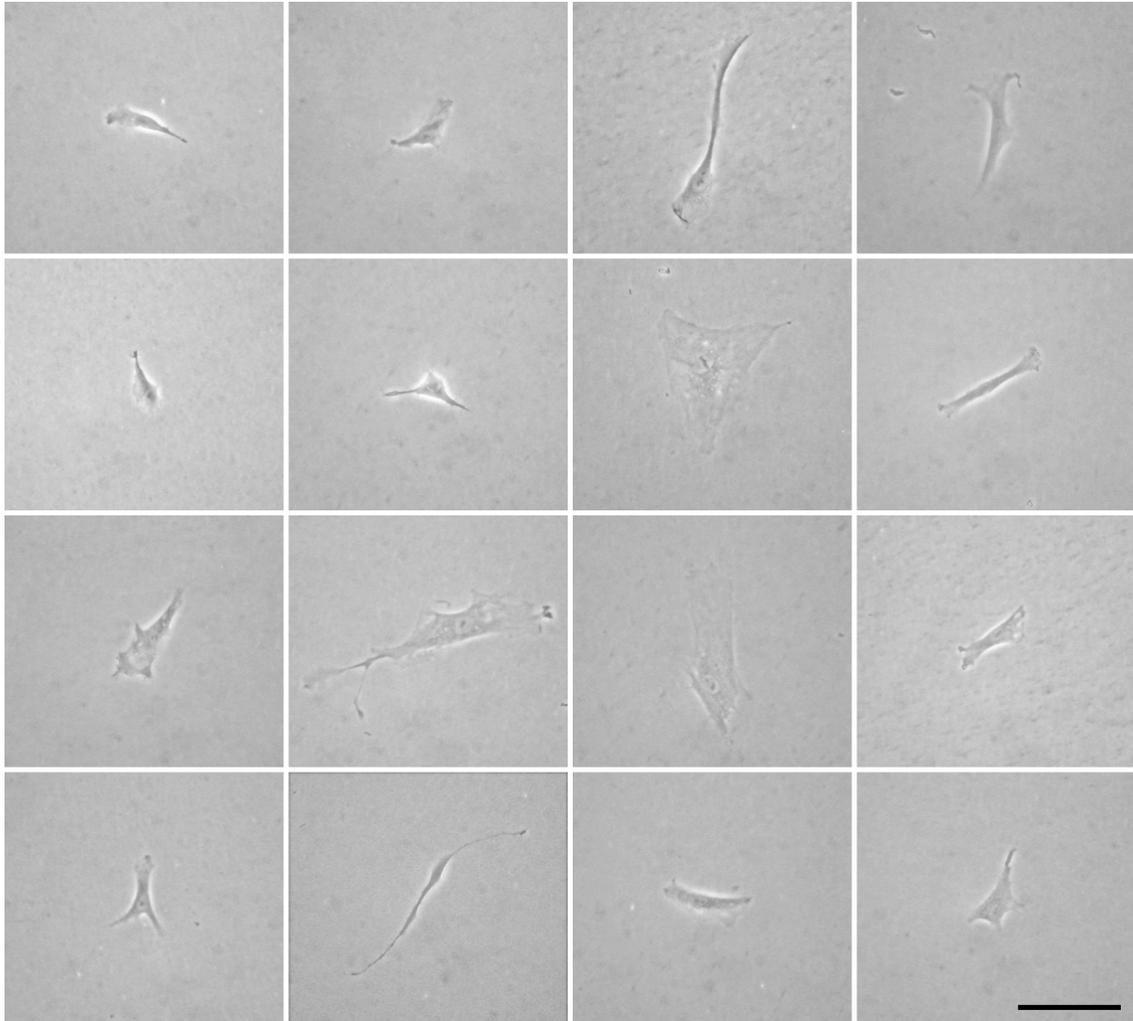


Abb. 13: Übersicht über 16 Einzelzellen und deren unterschiedliche Morphologie

Die kleinen RS-Zellen wuchsen im Vergleich mit den spindelzelligen oder abgeflachten Zellen schneller; hatten also eine höhere Verdopplungsrate als die anderen Zelltypen. Hierdurch war das Erreichen einer hohen Zellzahl nur bei den kleinen Zellen zu erwarten, so dass die spindelzelligen und abgeflachten Zellen nach Einstellung bzw. Verringerung ihrer Vermehrungsrate verworfen wurden. Die Flaschen, die hauptsächlich kleine Zellen enthielten, wurden weiter kultiviert. In diesen Klonen kam es im weiteren Verlauf bei den meisten zu einer Änderung der Morphologie, ohne dass die Kulturbedingungen verändert wurden oder äußere Einflüsse eine Rolle ge-

spielt hätten. So nahm die Zellgröße beständig zu und es entwickelten sich aus den anfangs kleinen RS-Zellen spindelförmige Zellen oder große flache Zellen. Auch der Zeitpunkt der Morphologieänderung war bei allen Klonen unterschiedlich. Die meisten Zellen eines Klons beispielsweise änderten auf oben genannte Weise bereits nach einer Woche ihr Aussehen. Die Zellen eines anderen zeigten bis zur dritten Woche eine hohe Proliferationskapazität, um sich innerhalb weniger Tage in größere Zellen zu verwandeln und das Wachstum auf ein Minimum zu reduzieren.

Vier Klone (siehe Abbildung 14) konnten bis zu einer Zellzahl von ca. 1 Mio. Zellen expandiert werden.

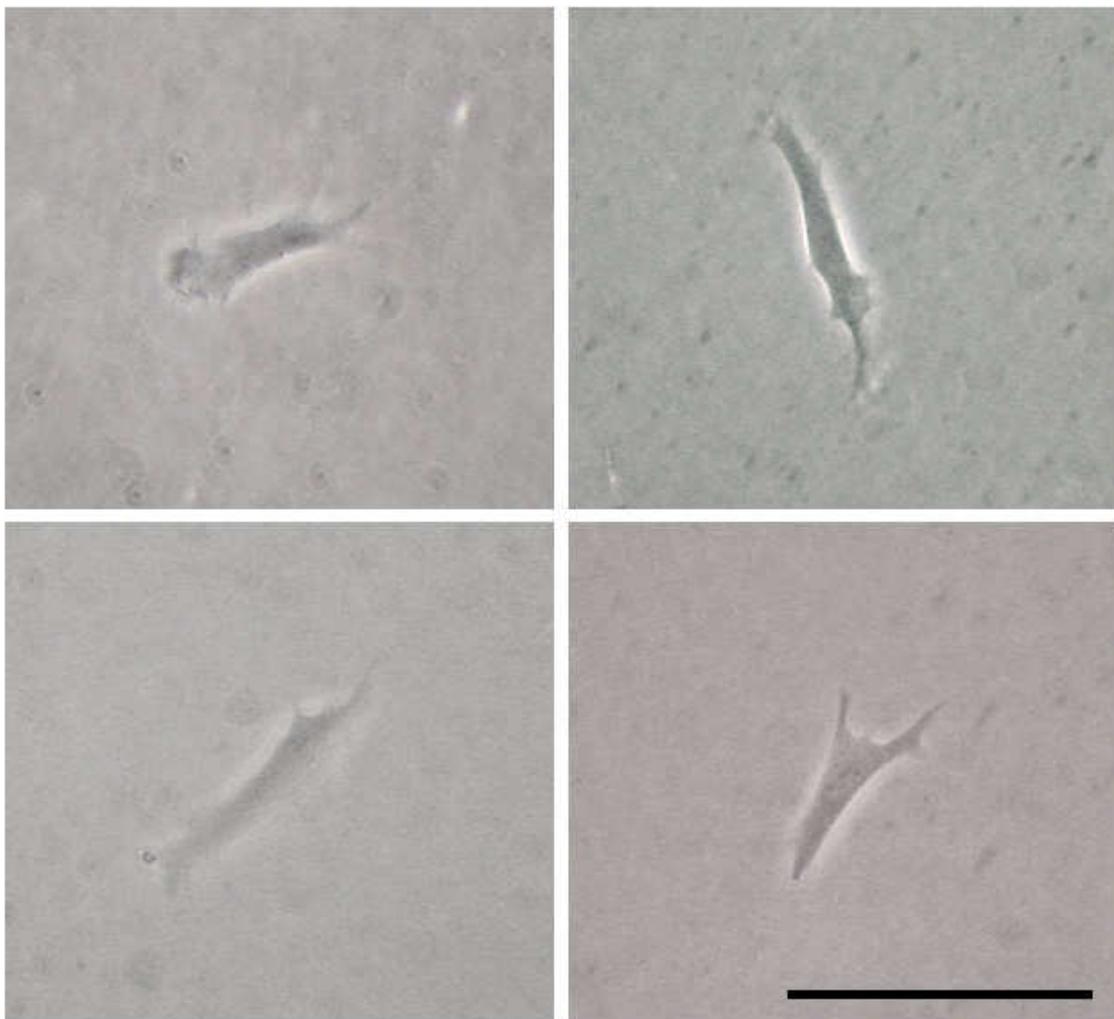


Abb. 14: Darstellung der 4 Klone, die sich bis auf eine Zellzahl von ca. 1 Million Zellen expandieren ließen, ohne dass sich die Morphologie der meisten Zellen änderte. Messbalken = 100 μ m

Die Morphologie der Zellen änderte sich während dieser Expansion bei den meisten Zellen jedoch nicht. Die folgenden Bilder zeigen exemplarisch Aufnahmen des ersten Klons an den Tagen 1, 8 und 29. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Zellen auch

nach dieser Zeit klein sind und sich in ihrem Aussehen nicht bzw. nur geringfügig von der Ausgangszelle unterscheiden.

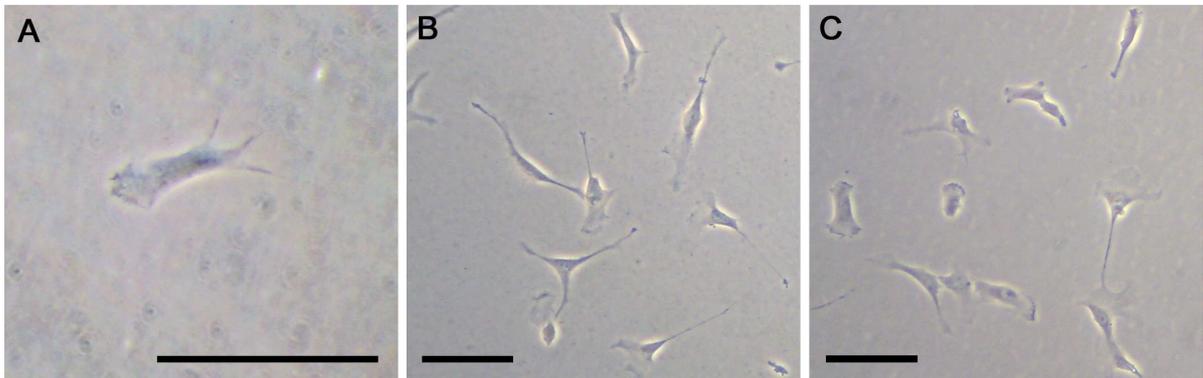


Abb. 15: (A) Einzelzelle 4h nach der Einzelzellisolierung; (B) Zellklon 1 an Tag 8; (C) Zellklon 1 an Tag 29. Die Zellen, die aus der Einzelzelle in (A) entstanden sind, haben auch an Tag 8 und Tag 29 die Morphologie von RS-Zellen.

Zur genaueren Untersuchung der Morphologie und des Wachstumsverhaltens der einzelnen isolierten Zellen wurde die Anzahl der im Well vorhandenen Zellen und ihre Morphologie am Tag 1, 4 und 8 dokumentiert. Die Zellen wurden in die drei bereits genannten Zelltypen eingeteilt und erfasst. Die nachfolgenden Tabellen 6 bis 8 zeigen den auf diese Weise gewonnen Datensatz, der als Basis für die statistische Analyse verwendet wurde.

Tag 1								
Well	P	Feld	Fläche	Durchm.	RS	SS	FC	Gesamt
Cambrex 1 / P1	4	A2	1169,57	182,21	1	0	0	1
Cambrex 1 / P1	4	B2	2848,37	152,51	1	0	0	1
Cambrex 1 / P1	4	B3	4396,94	120,77	1	0	0	1
Cambrex 1 / P2	4	A2	1980,40	84,64	1	0	0	1
Cambrex 2 P1	4	B1	1567,47	122,17	1	0	0	1
Cambrex 2 P1	4	B2	2037,33	225,11	1	0	0	1
Cambrex 2 P1	4	B3	1218,30	78,53	1	0	0	1
Cambrex 2 P2	4	A2	1599,38	228,86	1	0	0	1
Cambrex 2 P2	4	A3	1034,22	137,50	1	0	0	1
Cambrex 2 P2	4	B3	1521,54	212,49	0	1	0	1
DMEM 2 P1	4	A2	1101,28	81,82	1	0	0	1
DMEM 2 P1	4	B2	7368,37	240,14	0	0	1	1
DMEM 2 P1	4	B3	906,86	96,68	1	0	0	1
DMEM 2 P2	4	A2	1517,81	76,14	1	0	0	1
DMEM 2 P2	4	A3	1453,62	161,47	1	0	0	1
DMEM 2 P2	4	B1	2610,25	140,50	1	0	0	1
DMEM 2 P2	4	B2	1894,58	237,61	1	0	0	1
DMEM 2 P2	4	B3	1102,87	190,13	1	0	0	1
Cambrex 3 P1	5	A2	2589,76	164,79	1	0	0	1
Cambrex 3 P1	5	A3	2173,24	156,59	1	0	0	1
Cambrex 3 P1	5	B1	1337,32	97,90	1	0	0	1
Cambrex 3 P2	5	A2	2936,06	138,03	1	0	0	1
Cambrex 3 P2	5	A3	3933,41	211,83	1	0	0	1
Cambrex 3 P2	5	B1	2094,90	266,42	1	0	0	1
DMEM 3 P1	5	A2	2150,17	114,12	1	0	0	1
DMEM 3 P1	5	B1	2394,41	184,18	1	0	0	1
DMEM 3 P1	5	B2	1455,99	106,70	1	0	0	1
DMEM 3 P1	5	B3	1343,72	58,71	1	0	0	1
DMEM 3 P 2	5	A2	1716,61	115,35	1	0	0	1
DMEM 3 P 2	5	A3	4052,01	158,31	1	0	0	1
DMEM 3 P 2	5	B1	1883,44	107,19	1	0	0	1
DMEM 3 P 2	5	B2	2500,06	182,65	1	0	0	1
Cambrex 4 P1	6	B2	2185,75	317,71	0	1	0	1
Cambrex 4 P1	6	B3	1168,34	101,22	1	0	0	1
Cambrex 4 P2	6	B2	1391,23	195,93	0	1	0	1
Cambrex 4 P2	6	B3	1851,38	170,24	0	1	0	1
DMEM 5 P1	4	A2	832,47	65,25	1	0	0	1
DMEM 5 P1	4	A3	2757,59	214,70	0	1	0	1
DMEM 5 P1	4	B2	984,05	84,95	1	0	0	1
DMEM 5 P2	4	A2	447,64	59,89	1	0	0	1
DMEM 5 P2	4	B1	8957,26	160,09	0	0	1	1
DMEM 5 P2	4	B3	767,06	82,76	1	0	0	1
DMEM 5 P3	4	A2	1356,66	75,40	1	0	0	1
DMEM 5 P3	4	A3	2341,15	115,61	1	0	0	1
DMEM 5 P3	4	B1	1024,23	231,52	1	0	0	1
DMEM 5 P3	4	B2	1985,14	88,69	1	0	0	1
DMEM 5 P3	4	B3	1216,36	83,57	1	0	0	1
DMEM 5 P4	4	A2	2138,89	127,72	1	0	0	1
DMEM 5 P4	4	A3	1341,85	87,96	1	0	0	1
DMEM 5 P4	4	B1	1353,57	115,47	1	0	0	1
DMEM 5 P4	4	B3	7750,46	202,31	0	0	1	1
DMEM 5 P5	4	A2	6906,56	261,52	0	0	1	1
DMEM 5 P5	4	A3	1480,00	89,60	1	0	0	1
DMEM 5 P5	4	B1	1308,86	106,09	1	0	0	1
DMEM 5 P5	4	B2	654,86	68,72	1	0	0	1
DMEM 5 P5	4	B3	1921,60	143,28	1	0	0	1
DMEM 5 P6	4	A2	1014,53	62,69	0	0	1	1
DMEM 5 P6	4	B1	3750,27	152,47	1	0	0	1
DMEM 5 P6	4	B2	1479,93	158,48	1	0	0	1
DMEM 5 P6	4	B3	1303,83	112,78	1	0	0	1
DMEM 5 P7	4	A2	2703,18	117,16	1	0	0	1
DMEM 5 P7	4	B2	2385,35	201,16	1	0	0	1
DMEM 5 P7	4	B3	3677,97	107,96	0	0	1	1
DMEM 5 P8	4	A2	1855,19	138,61	1	0	0	1
DMEM 5 P8	4	A3	1031,20	101,85	1	0	0	1
DMEM 5 P8	4	B2	1428,03	95,94	1	0	0	1
DMEM 5 P8	4	B3	1151,53	159,38	1	0	0	1
Mittelwert			2176,03	141,65	0,84	0,07	0,09	
Standardabweichung			1639,03	58,22	0,37	0,26	0,29	

Tab. 6: Zelldokumentation an Tag 1 vier Stunden nach Einzelzellisolierung. Aufgeführt sind die Wellplatte und das verwendete Medium, die Passagezahl (P), das Feld in der Wellplatte, die gemessene Zellfläche und der gemessene Zelldurchmesser. Zudem wurden die Zellen nach morphologischen Kriterien in die drei verschiedenen Zelltypen unterschieden.

Tag 4								
Weil	P	Feld	RS	SS	FC	Gesamt	Teilungsrate	Zellteilung alle h
Cambrex 1 / P1	4	A2	5	0	0	5	2,32	31,01
Cambrex 1 / P1	4	B2	13	0	0	13	3,70	19,46
Cambrex 1 / P1	4	B3	3	0	0	3	1,58	45,43
Cambrex 1 / P2	4	A2	7	0	0	7	2,81	25,65
Cambrex 2 P1	4	B1	8	0	0	8	3,00	24,00
Cambrex 2 P1	4	B2	3	1	1	5	2,32	31,01
Cambrex 2 P1	4	B3	0	1	0	1	0,00	0,00
Cambrex 2 P2	4	A2	11	0	0	11	3,46	20,81
Cambrex 2 P2	4	A3	6	0	0	6	2,58	27,85
Cambrex 2 P2	4	B3	6	0	0	6	2,58	27,85
DMEM 2 P1	4	A2	7	0	0	7	2,81	25,65
DMEM 2 P1	4	B2	0	1	0	1	0,00	0,00
DMEM 2 P1	4	B3	3	0	0	3	1,58	45,43
DMEM 2 P2	4	A2	10	0	0	10	3,32	21,67
DMEM 2 P2	4	A3	4	0	3	7	2,81	25,65
DMEM 2 P2	4	B1	5	2	0	7	2,81	25,65
DMEM 2 P2	4	B2	2	0	1	3	1,58	45,43
DMEM 2 P2	4	B3	4	4	0	8	3,00	24,00
Cambrex 3 P1	5	A2	0	1	3	4	2,00	36,00
Cambrex 3 P1	5	A3	10	0	2	12	3,58	20,08
Cambrex 3 P1	5	B1	14	0	0	14	3,81	18,91
Cambrex 3 P2	5	A2	12	0	0	12	3,58	20,08
Cambrex 3 P2	5	A3	0	1	3	4	2,00	36,00
Cambrex 3 P2	5	B1	0	1	2	3	1,58	45,43
DMEM 3 P1	5	A2	6	0	0	6	2,58	27,85
DMEM 3 P1	5	B1	6	1	2	9	3,17	22,71
DMEM 3 P1	5	B2	9	0	0	9	3,17	22,71
DMEM 3 P1	5	B3	7	0	0	7	2,81	25,65
DMEM 3 P 2	5	A2	6	1	0	7	2,81	25,65
DMEM 3 P 2	5	A3	0	0	1	1	0,00	0,00
DMEM 3 P 2	5	B1	7	0	0	7	2,81	25,65
DMEM 3 P 2	5	B2	7	2	1	10	3,32	21,67
Cambrex 4 P1	6	B2	0	0	1	1	0,00	0,00
Cambrex 4 P1	6	B3	4	0	0	4	2,00	36,00
Cambrex 4 P2	6	B2	0	1	0	1	0,00	0,00
Cambrex 4 P2	6	B3	0	2	1	3	1,58	45,43
DMEM 5 P1	4	A2	7	0	0	7	2,81	25,65
DMEM 5 P1	4	A3	0	0	1	1	0,00	0,00
DMEM 5 P1	4	B2	0	0	1	1	0,00	0,00
DMEM 5 P2	4	A2	7	0	0	7	2,81	25,65
DMEM 5 P2	4	B1	0	0	1	1	0,00	0,00
DMEM 5 P2	4	B3	18	0	0	18	4,17	17,27
DMEM 5 P3	4	A2	12	0	0	12	3,58	20,08
DMEM 5 P3	4	A3	3	0	3	6	2,58	27,85
DMEM 5 P3	4	B1	3	0	0	3	1,58	45,43
DMEM 5 P3	4	B2	0	0	2	2	1,00	72,00
DMEM 5 P3	4	B3	8	0	0	8	3,00	24,00
DMEM 5 P4	4	A2	0	0	1	1	0,00	0,00
DMEM 5 P4	4	A3	0	0	2	2	1,00	72,00
DMEM 5 P4	4	B1	0	1	1	2	1,00	72,00
DMEM 5 P4	4	B3	0	0	1	1	0,00	0,00
DMEM 5 P5	4	A2	0	0	1	1	0,00	0,00
DMEM 5 P5	4	A3	14	0	0	14	3,81	18,91
DMEM 5 P5	4	B1	10	0	0	10	3,32	21,67
DMEM 5 P5	4	B2	8	0	0	8	3,00	24,00
DMEM 5 P5	4	B3	0	0	1	1	0,00	0,00
DMEM 5 P6	4	A2	0	0	1	1	0,00	0,00
DMEM 5 P6	4	B1	0	0	4	4	2,00	36,00
DMEM 5 P6	4	B2	22	0	0	22	4,46	16,15
DMEM 5 P6	4	B3	17	0	0	17	4,09	17,61
DMEM 5 P7	4	A2	0	0	2	2	1,00	72,00
DMEM 5 P7	4	B2	21	0	0	21	4,39	16,39
DMEM 5 P7	4	B3	0	0	3	3	1,58	45,43
DMEM 5 P8	4	A2	0	0	1	1	0,00	0,00
DMEM 5 P8	4	A3	3	0	6	9	3,17	22,71
DMEM 5 P8	4	B2	14	0	0	14	3,81	18,91
DMEM 5 P8	4	B3	9	0	0	9	3,17	22,71
Mittelwert			5,39	0,30	0,79	6,48	2,16	24,34
Standardabweichung			5,59	0,69	1,19	5,05	1,37	17,97

Tab. 7: Zelldokumentation an Tag 4 nach Einzelzellisolierung. Aufgeführt sind zusätzlich zu den in Tab. 6 genannten Werten die Teilungsrate pro 24 Stunden sowie die Zellteilungsrate in fortlaufenden Stunden.

Tag 8								
Weil	P	Feld	RS	SS	FC	Gesamt	Teilungsrate	Zellteilung alle h
Cambrex 1 / P1	4	A2				26	4,70	35,74
Cambrex 1 / P1	4	B2				66	6,04	27,79
Cambrex 1 / P1	4	B3				16	4,00	42,00
Cambrex 1 / P2	4	A2				65	6,02	27,90
Cambrex 2 P1	4	B1	70	1	1	72	6,17	27,23
Cambrex 2 P1	4	B2	0	0	5	5	2,32	72,35
Cambrex 2 P1	4	B3	0	0	1	1	0,00	0,00
Cambrex 2 P2	4	A2	142	0	0	142	7,15	23,50
Cambrex 2 P2	4	A3	59	1	0	60	5,91	28,44
Cambrex 2 P2	4	B3	1	6	0	7	2,81	59,84
DMEM 2 P1	4	A2	138	0	0	138	7,11	23,63
DMEM 2 P1	4	B2	0	0	1	1	0,00	0,00
DMEM 2 P1	4	B3	48	0	0	48	5,58	30,08
DMEM 2 P2	4	A2	111	1	1	113	6,82	24,63
DMEM 2 P2	4	A3	8	4	4	16	4,00	42,00
DMEM 2 P2	4	B1	75	0	5	80	6,32	26,57
DMEM 2 P2	4	B2	0	1	6	7	2,81	59,84
DMEM 2 P2	4	B3	21	9	1	31	4,95	33,91
Cambrex 3 P1	5	A2	0	0	4	4	2,00	84,00
Cambrex 3 P1	5	A3	44	3	5	52	5,70	29,47
Cambrex 3 P1	5	B1	147	0	0	147	7,20	23,33
Cambrex 3 P2	5	A2	66	1	8	75	6,23	26,97
Cambrex 3 P2	5	A3	0	0	5	5	2,32	72,35
Cambrex 3 P2	5	B1	0	2	3	5	2,32	72,35
DMEM 3 P1	5	A2	45	0	1	46	5,52	30,42
DMEM 3 P1	5	B1	17	3	10	30	4,91	34,24
DMEM 3 P1	5	B2	162	0	0	162	7,34	22,89
DMEM 3 P1	5	B3	94	0	0	94	6,55	25,63
DMEM 3 P 2	5	A2	21	5	11	37	5,21	32,25
DMEM 3 P 2	5	A3	0	0	1	1	0,00	0,00
DMEM 3 P 2	5	B1	75	0	3	78	6,29	26,73
DMEM 3 P 2	5	B2	43	0	13	56	5,81	28,93
Cambrex 4 P1	6	B2	0	1	1	2	1,00	168,00
Cambrex 4 P1	6	B3	200	0	2	202	7,66	21,94
Cambrex 4 P2	6	B2	4	0	1	5	2,32	72,35
Cambrex 4 P2	6	B3	0	0	1	1	0,00	0,00
DMEM 5 P1	4	A2	170	0	0	170	7,41	22,67
DMEM 5 P1	4	A3	0	0	1	1	0,00	0,00
DMEM 5 P1	4	B2	0	1	0	1	0,00	0,00
DMEM 5 P2	4	A2	31	0	3	34	5,09	33,02
DMEM 5 P2	4	B1	0	0	1	1	0,00	0,00
DMEM 5 P2	4	B3	290	0	0	290	8,18	20,54
DMEM 5 P3	4	A2	28	0	10	38	5,25	32,01
DMEM 5 P3	4	A3	5	0	23	28	4,81	34,95
DMEM 5 P3	4	B1	15	0	3	18	4,17	40,29
DMEM 5 P3	4	B2	0	0	2	2	1,00	168,00
DMEM 5 P3	4	B3	110	0	0	110	6,78	24,77
DMEM 5 P4	4	A2	0	0	1	1	0,00	0,00
DMEM 5 P4	4	A3	0	0	2	2	1,00	168,00
DMEM 5 P4	4	B1	0	0	2	2	1,00	168,00
DMEM 5 P4	4	B3	0	0	1	1	0,00	0,00
DMEM 5 P5	4	A2	0	0	1	1	0,00	0,00
DMEM 5 P5	4	A3	87	2	5	94	6,55	25,63
DMEM 5 P5	4	B1	40	1	5	46	5,52	30,42
DMEM 5 P5	4	B2	150	0	0	150	7,23	23,24
DMEM 5 P5	4	B3	0	0	1	1	0,00	0,00
DMEM 5 P6	4	A2	0	0	1	1	0,00	0,00
DMEM 5 P6	4	B1	0	0	5	5	2,32	72,35
DMEM 5 P6	4	B2	410	0	0	410	8,68	19,36
DMEM 5 P6	4	B3	350	0	0	350	8,45	19,88
DMEM 5 P7	4	A2	0	1	1	2	1,00	168,00
DMEM 5 P7	4	B2	218	0	7	225	7,81	21,50
DMEM 5 P7	4	B3	0	0	3	3	1,58	106,00
DMEM 5 P8	4	A2	0	0	1	1	0,00	0,00
DMEM 5 P8	4	A3	0	2	7	9	3,17	53,00
DMEM 5 P8	4	B2	340	0	0	340	8,41	19,98
DMEM 5 P8	4	B3	200	0	0	200	7,64	21,98
Mittelwert			64,05	0,71	2,86	66,16	4,09	39,57
Standardabweichung			95,59	1,62	3,96	91,89	2,85	42,72

Tab. 8: Zelldokumentation an Tag 8 nach Einzelzellisolierung. Aufgeführt sind die bereits in Tab. 6 und Tab. 7 genannten Werte.

Für die statistische Auswertung wurden 67 Einzelzellen bezüglich ihrer Fläche und ihres Durchmessers morphometrisch analysiert und im weiteren Verlauf der Kultivierung hinsichtlich ihres Aussehens und der erreichten Zellzahl nach 8 Tagen weiter beobachtet. Die ermittelten Werte für Fläche und Durchmesser wurden mit der erreichten Zellzahl am Tag 8 korreliert (siehe Abbildungen 16 und 17). Es zeigte sich sowohl für die Fläche als auch für den Durchmesser eine negative Korrelation. Für den Durchmesser war diese statistisch signifikant. Dies lässt bei den kleinen RS-Zellen auf eine höhere Proliferationsrate schließen.

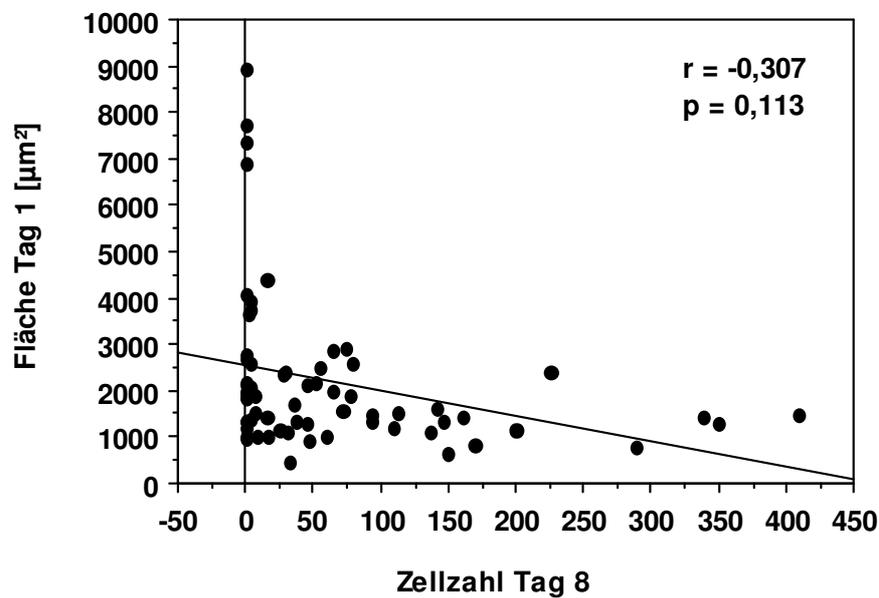


Abb. 16: Korrelation zwischen Zellfläche am Tag 1 in μm^2 und erreichter Zellzahl am Tag 8: Es besteht keine statistisch signifikante negative Korrelation zwischen der Zellfläche und der Zellzahl am Tag 8.

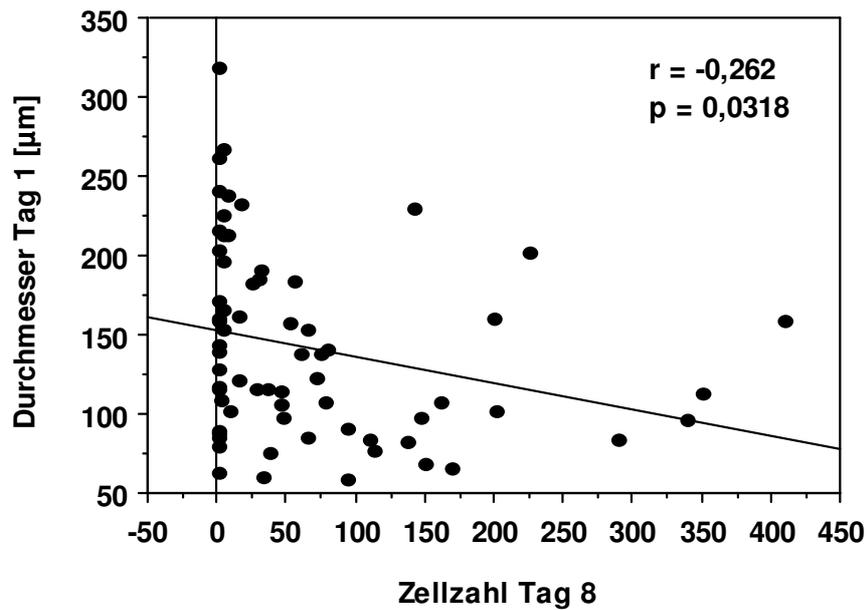


Abb. 17: Korrelation zwischen Zelldurchmesser am Tag 1 in μm und erreichter Zellzahl am Tag 8: Es besteht eine statistisch signifikante negative Korrelation zwischen dem Zelldurchmesser und der Zellzahl am Tag 8.

Dennoch korreliert die Zellzahl am Tag 4, die der Proliferationskapazität entspricht, sehr gut mit der Zellzahl am Tag 8 (siehe Abbildung 18).

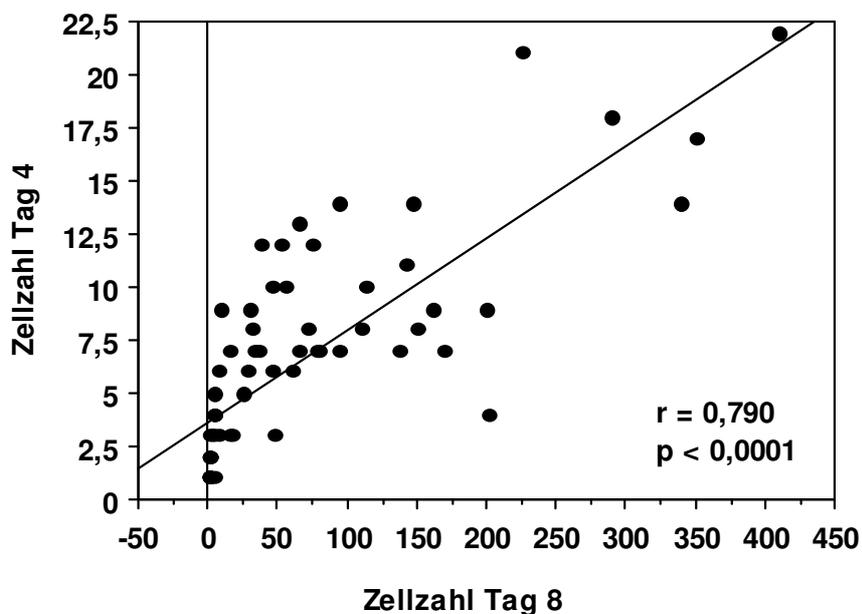


Abb. 18: Korrelation zwischen Zellzahl am Tag 4 und der erreichten Zellzahl am Tag 8: Es besteht eine statistisch signifikante positive Korrelation.

Ebenso kann von der Anzahl der RS-Zellen am 4. Tag auf die zu erwartende Zellzahl am Tag 8 geschlossen werden. (siehe Abbildung 19)

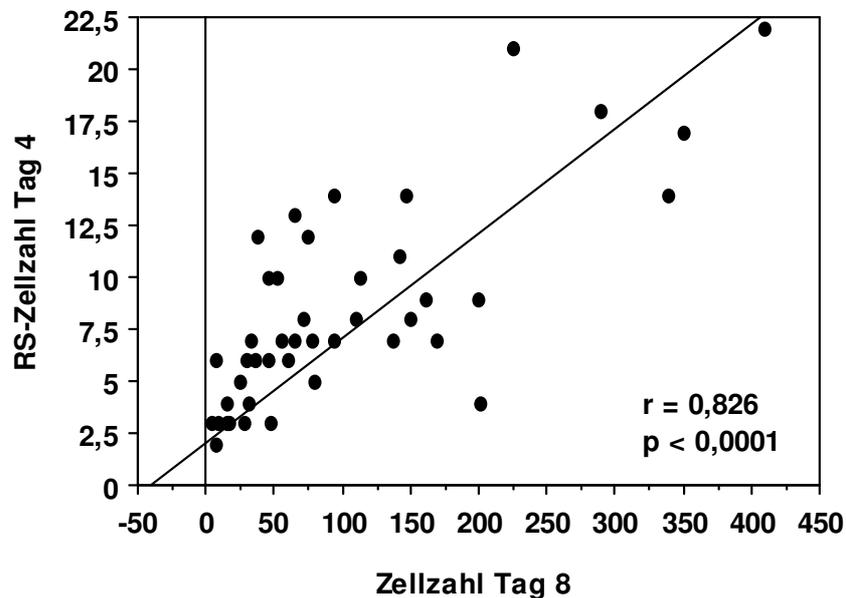


Abb. 19: Korrelation zwischen RS-Zellzahl am Tag 4 und der erreichten Zellzahl am Tag 8: Es besteht eine statistisch signifikante Korrelation.

Die bereits angesprochene große Schwankungsbreite der Proliferationskapazität innerhalb der einzelnen Ansätze ist in Abbildung 20 dargestellt. Sowohl die Teilungsrate an Tag 4 als auch die Teilungsrate an Tag 8 als Maß für die Proliferationskapazität wiesen eine breite Streuung auf. Zudem ist ein Vergleich zwischen dem speziell für hMSC entwickelten Mediums der Fa. Cambrex und dem Standard Zellkulturmedium DMEM unter Zugabe von FBS und Wachstumsfaktor FGF-2 dargestellt. Die Vermehrungsrate war nicht abhängig vom verwendeten Medium.

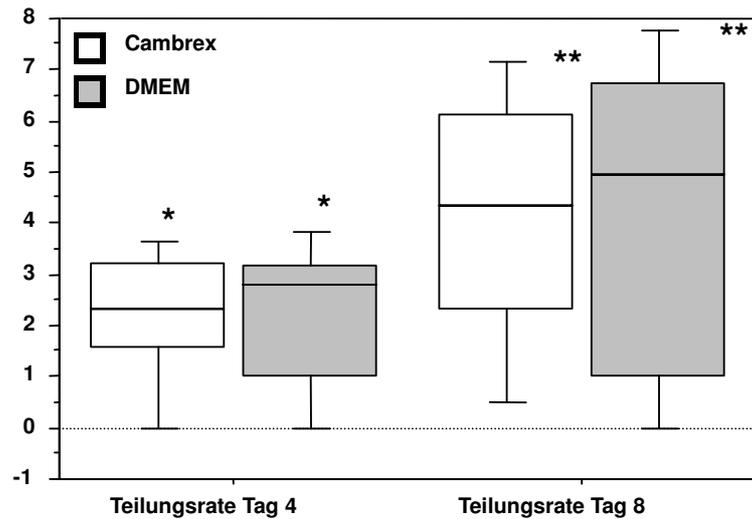


Abb. 20: Vergleich zwischen beiden Kultivierungsmedien (Spezialmedium der Fa. Cambrex und Standardmedium DMEM) in Bezug auf die Teilungsraten der Zellen: Es besteht kein signifikanter Unterschied im Vergleich der beiden Medien mit der Proliferationskapazität; * $p = 0,7885$, ** $p = 0,9974$

Aus 67 isolierten Einzelzellklonen konnten insgesamt 4 Klone gewonnen werden, die in einem Zeitraum von 4 Wochen auf eine Zellzahl von ca. 1 Mio. Zellen vermehrt werden konnten. Diese hohe Zellzahl wurde für die Differenzierungsansätze in die adipogene, osteogene und chondrogene Richtung benötigt (siehe Abbildung 21).

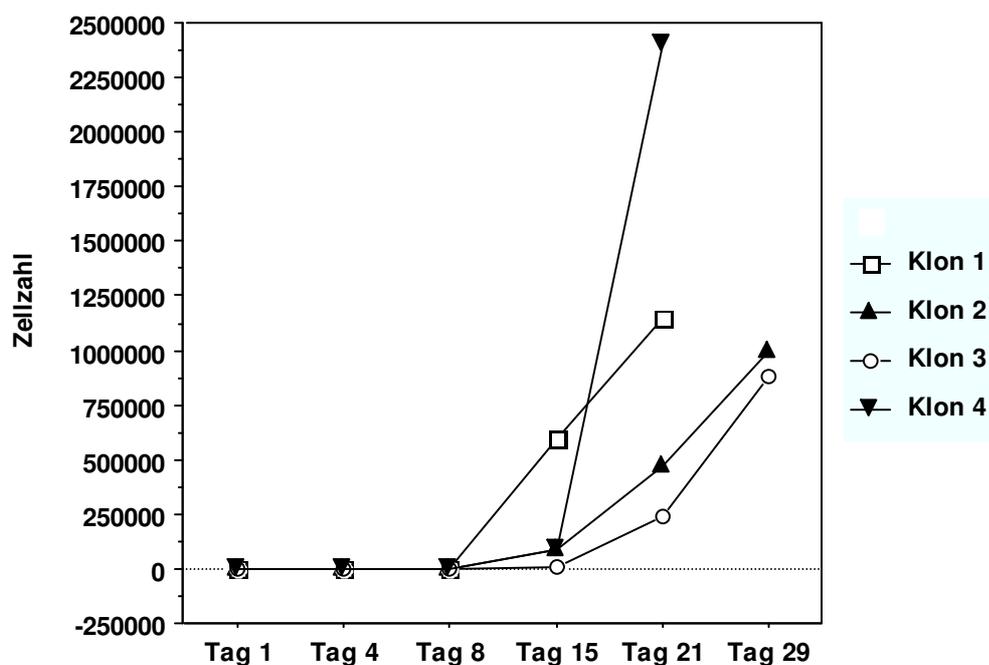


Abb. 21: Zellzahl der für die Differenzierungsansätze verwendeten Klone im zeitlichen Verlauf von 4 Wochen.

3.3 Adipogene Differenzierung

Bei den adipogen differenzierten Zellen konnten sowohl im stimulierten Klon als auch in der heterogenen Kontrollgruppe Fettvakuolen nachgewiesen werden, die sich in der Oil-Red-O-Färbung rot darstellten. Diese roten Markierungen fanden sich weder in den Zellen des unstimulierten Klons, noch in den Zellen der unstimulierten heterogenen Kontrollgruppe.

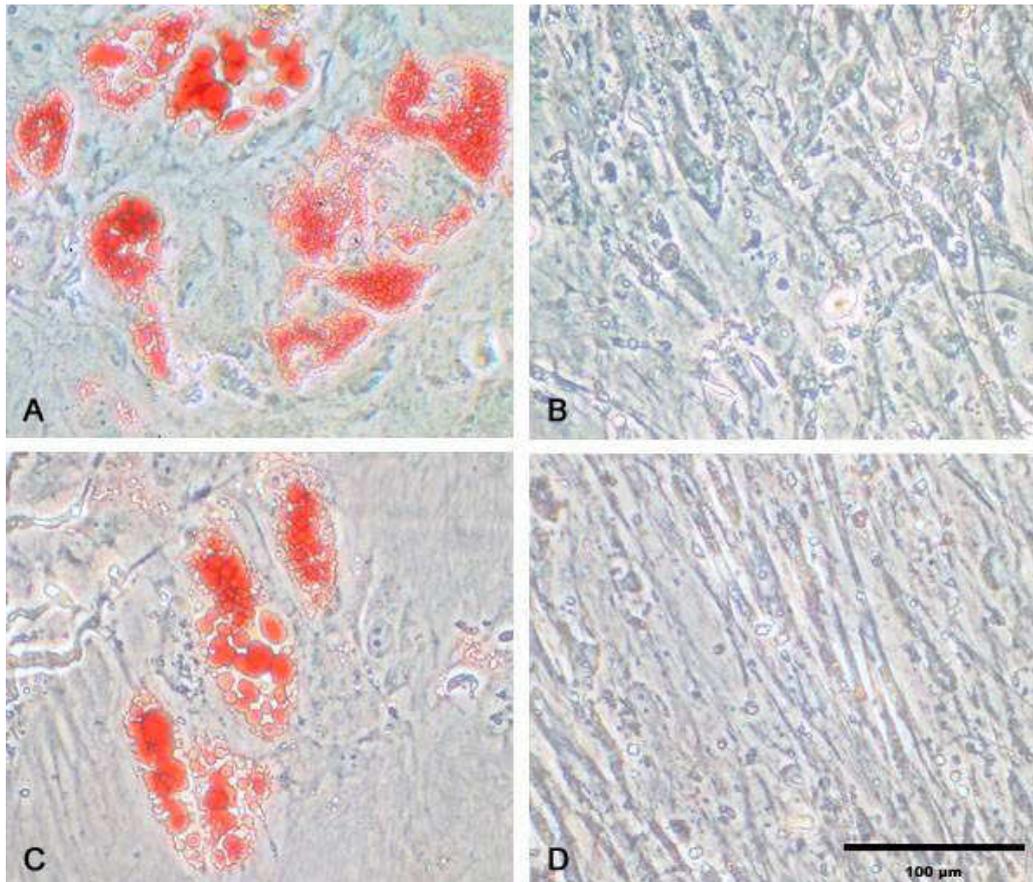


Abb. 22: Oil-Red-O-Färbung zur Darstellung der adipogenen Differenzierung nach 21 Tagen: Die Bilder (A) und (C) zeigen die stimulierten Zellen, die Bilder (B) und (D) die unstimulierten Kontrollen. Sowohl im Klon (A) als auch in der heterogenen Kontrolle (C) zeigen sich rot gefärbte Fettvakuolen. Dagegen finden sich im unstimulierten Klon (B) und in der unstimulierten heterogenen Kontrolle (D) keine Färbungen.

3.4 Osteogene Differenzierung

Die osteogene Differenzierung wurde mit der Färbung nach von Kossa nachgewiesen. Diese Methode ist ein Marker für mineralische Ablagerungen, die sich in den Bildern schwarz darstellen. In den stimulierten Klonzellen konnte man diese Ablagerungen gut erkennen, ebenso in den stimulierten heterogenen Kontrollzellen. Keinerlei schwarze Anfärbungen waren in den unstimulierten Zellen enthalten.

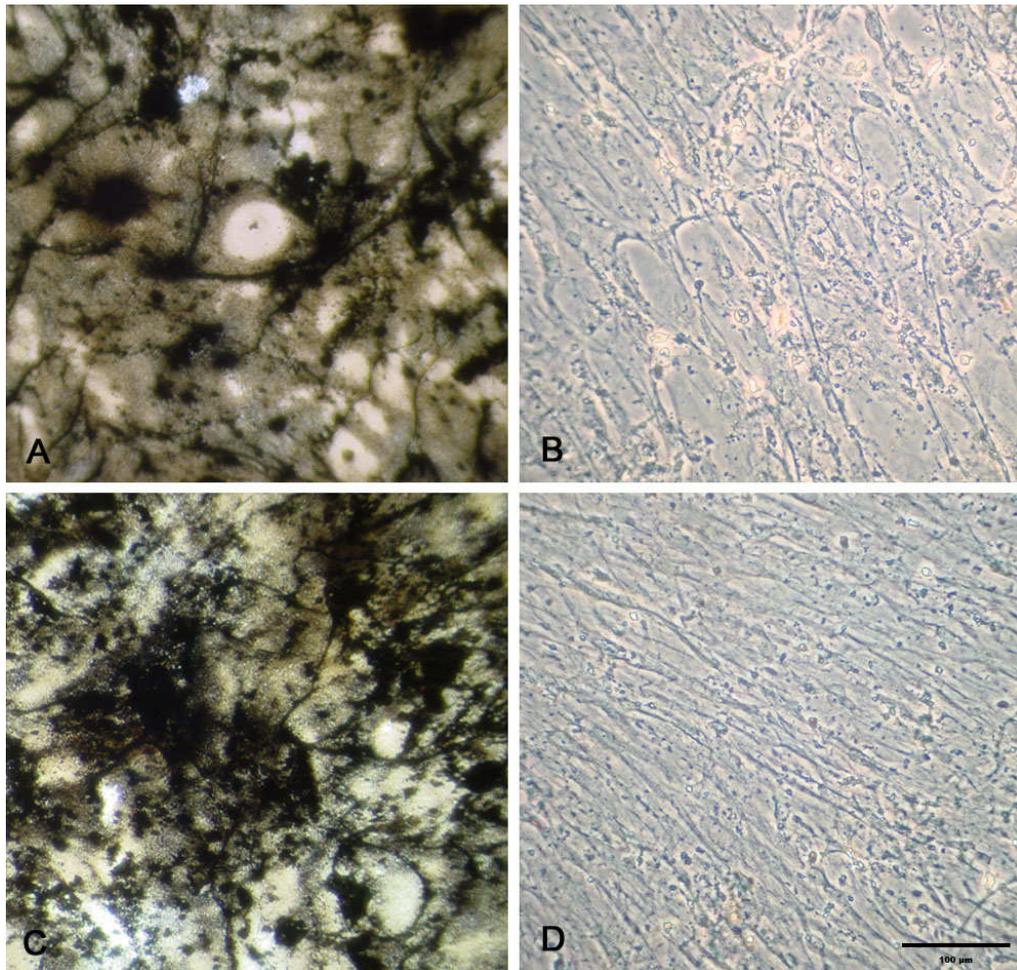


Abb. 23: von-Kossa-Färbung zur Darstellung der osteogenen Differenzierung nach 21 Tagen
Die Bilder (A) und (C) zeigen die stimulierten Zellen, die Bilder (B) und (D) die unstimulierten Kontrollen. Sowohl im Klon (A) als auch in der heterogenen Kontrolle (C) zeigen sich schwarz gefärbte mineralische Ablagerungen. Dagegen finden sich im unstimulierten Klon (B) und in der unstimulierten heterogenen Kontrolle (D) keine Färbungen.

3.5 Chondrogene Differenzierung

Die chondrogene Differenzierung wurde mit der Toluidinblaufärbung und mit einer immunhistochemischen Färbung gegen Kollagen Typ-II nachgewiesen.

3.5.1 Toluidinblaufärbung

Die Toluidinblaufärbung ist eine metachromatische Färbemethode, die Glykosaminoglykane der Knorpelgrundsubstanz violett anfärbt. Diese Markierungen sind sehr stark im stimulierten Klon und in der stimulierten heterogenen Kontrolle vertreten. Dagegen zeigen die Kontrollen keine bzw. nur eine sehr geringe Anfärbung.

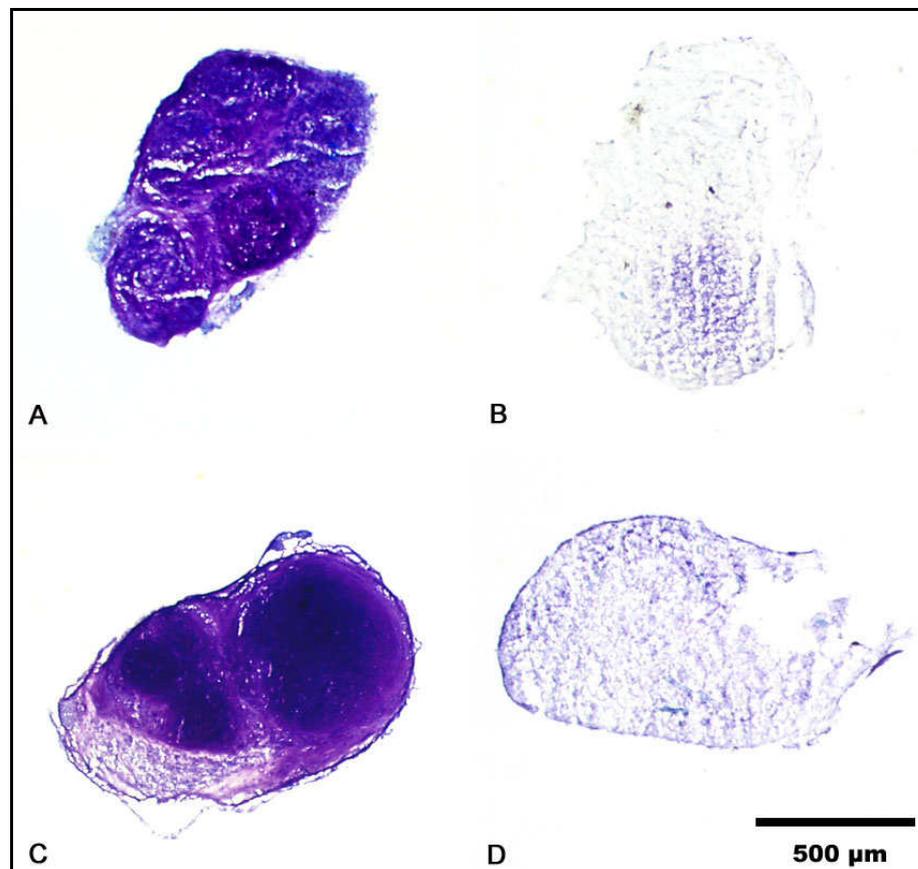


Abb. 24: Toluidinblau-Färbung zur Darstellung der chondrogenen Differenzierung nach 35 Tagen: Die Bilder (A) und (C) zeigen die stimulierten Zellepellets, die Bilder (B) und (D) die unstimulierten Kontrollen. Sowohl im Klon (A) als auch in der heterogenen Kontrolle (C) zeigen sich violette Anfärbungen. Dagegen finden sich im unstimulierten Klon (B) und in der unstimulierten heterogenen Kontrolle (D) nur geringe Färbungen.

3.5.2 Immunhistochemische Färbung gegen Kollagen Typ-II

Als weiteren Nachweis der chondrogenen Differenzierung wurde eine immunhistochemische Färbung gegen Kollagen Typ-II durchgeführt. Im stimulierten Zellpellet des Klons und in der stimulierten heterogenen Kontrolle sind die roten Anfärbungen für Kollagen Typ-II deutlich erkennbar. In den unstimulierten Zellen des Klons und den unstimulierten Zellen der heterogenen Kontrolle sind dagegen keine Anfärbungen erkennbar.

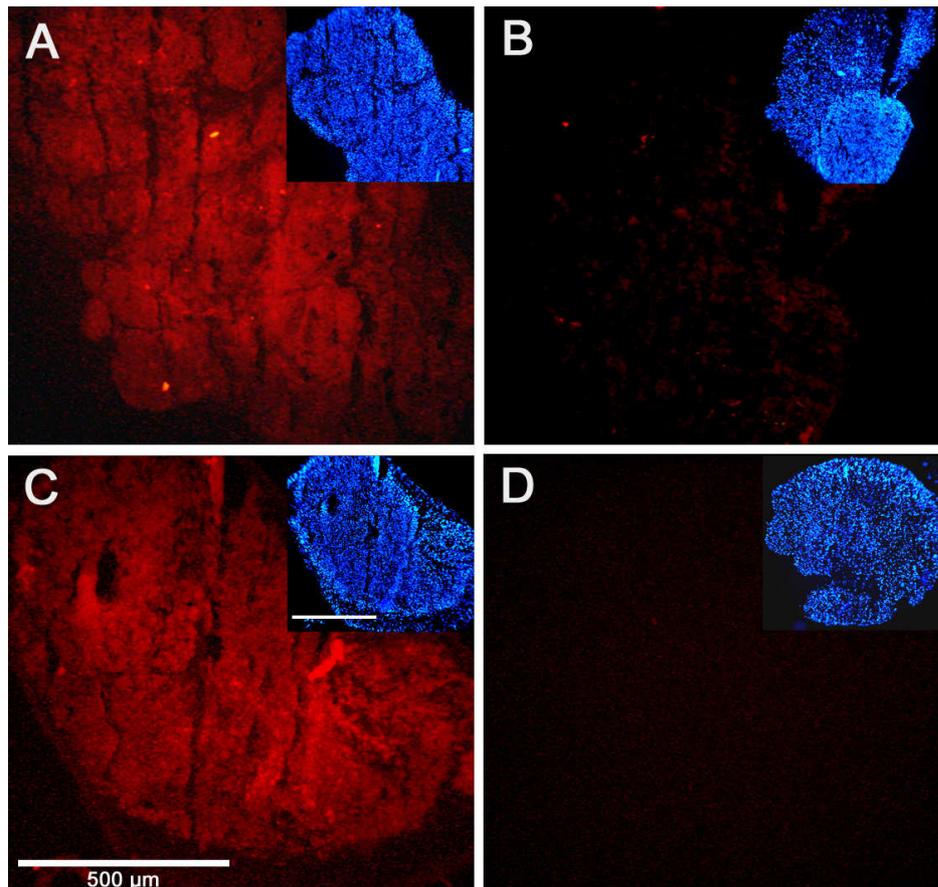


Abb. 25: Immunhistochemische Färbung gegen Kollagen Typ-II

Die Bilder (A) und (C) zeigen die stimulierten Zellpellets, die Bilder (B) und (D) die unstimulierten Kontrollen. Sowohl im Klon (A) als auch in der heterogenen Kontrolle (C) ist ein stark positives Signal erkennbar. Dagegen finden sich im unstimulierten Klon (B) und in der unstimulierten heterogenen Kontrolle (D) nur Hintergrundfärbungen. In den rechten oberen Ecken befinden sich zur Kontrolle die DAPI-Kernfärbungen.

In den Feldern A bis D sind in der rechten oberen Ecke die DAPI-Kernfärbungen als Kontrollen eingefügt. Da Kollagen Typ-II nur in Knorpelgewebe nachweisbar ist, ist diese Färbung als spezifisch für die Differenzierung in die chondrogene Richtung anzusehen.

4. Diskussion

4.1 Diskussion der Methodik

Zellen

Mesenchymale Stammzellen lassen sich auf verschiedene Arten aus dem menschlichen Körper isolieren. Humane mesenchymale Stammzellen können z.B. über Dichtegradienten aus dem Knochenmark (Prockop 1997), aus trabekulärem Knochen mit Hilfe mechanischer Verfahren (Tuli et al. 2003), aus der Synovialmembran (De Bari et al. 2001) und aus dem Periost (De Bari et al. 2006) gewonnen werden. Jedoch erhält man bei diesen verschiedenen Verfahren auch eine geringe Menge an anderen Zellen wie z.B. Fibroblasten, die die Zellsuspensionen von hMSC gewissermaßen „verunreinigen“ (Jonsson et al. 1999). Derzeit gibt es kein Standardprotokoll zur Gewinnung von hMSC, und auch bei der Gewinnung der Zellen aus dem Knochenmark wurden die ursprünglichen Protokolle in mehrfacher Weise variiert. Daher sind Vergleiche zwischen Studien unterschiedlicher Arbeitsgruppen nur bedingt möglich. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit kommerziell erhältliche Zellen der Fa. Cambrex ausgewählt, die nach standardisierten Protokollen und etablierten Methoden gewonnen wurden. Auf diese Weise steht ein Zellpool zur Verfügung, der einen sehr hohen Anteil an hMSC enthält (Pittenger et al. 1999).

Medium

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Zellkulturmedien verwendet. Zum einen das speziell für die Anzucht von hMSC hergestellte Mesenchymal Stem Cell Growth Medium der Fa. Cambrex und zum anderen ein Standardkulturmedium DMEM unter Zusatz von FBS und Wachstumsfaktor FGF-2. Ein Unterschied bezüglich der Vermehrungsrate konnte in unseren Versuchen nicht dargestellt werden wie in Abb. 10A dargestellt. Ein großer Unterschied besteht jedoch im Anschaffungspreis. Während das angesetzte DMEM mit den oben genannten Zusätzen 8,30 € pro 500 ml kostet, schlägt das Medium der Fa. Cambrex mit 156,00 € pro 500 ml zu Buche. Aufgrund unserer Ergebnisse stellt das zusammengesetzte Medium deshalb eine preiswertere Alternative dar. In anderen Studien stellte sich ein *alpha Minimum Essential Medium* unter Zusatz von Glutamax als die beste Alternative in Bezug auf die Proliferation der hMSC heraus (Sotiropoulou et al. 2006). Grund für diese Untersuchungen sind klinische Studien und Protokolle in denen bei der Anzucht auf das

MSCGM verzichtet werden muss, da es nur für in vitro Versuche zugelassen ist. Die steigende Zahl klinischer Protokolle, die hMSC benutzen, setzen allerdings auch einen Verzicht auf FBS voraus. In letzter Zeit wurde die Persistenz xenogener Proteine in hMSC, die in FBS expandiert wurden intensiv untersucht. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass nach intravenöser Applikation von autologen hMSC der Ratte, die in FBS expandiert wurden, humorale Immunantworten gegen FBS Proteine im Empfänger nachgewiesen werden konnten (Spees et al. 2004). Andere Studien zeigen, dass eine Expansion in autologem Serum in Abwesenheit von FBS und ohne Zytokine genauso effektiv ist wie die Ergänzung von FBS zum Kulturmedium (Abdallah et al. 2006, Shahdadfar et al. 2005, Stute et al. 2004) bzw. mit einem speziellen Verfahren zur Gewinnung des autologen Serums sogar effektiver (Mizuno et al. 2006). Dem Medium wurde der Wachstumsfaktor FGF-2 hinzugefügt, um die Proliferationsfähigkeit der Zellen zu steigern. FGF-2 supprimiert zudem die zelluläre Seneszenz durch eine Herunterregulation von TGF-beta2 (Ito et al. 2007). Da es sich lediglich um eine Supprimierung handelt, kann auf diese Weise der Vorgang der Zellalterung und die damit verbundene Abnahme der Proliferationskapazität lediglich hinausgezögert werden. Dies ließ sich in der vorliegenden Studie nicht nachweisen, da die isolierten Zellen entweder mit DMEM und FGF-2 oder mit dem MSCGM der Fa. Cambrex, das eine patentierte Zusammensetzung an wachstumsfördernden Substanzen enthält, kultiviert wurden. In den meisten Ansätzen kam es zu einer Abnahme der Proliferationskapazität (siehe 4.2). Dennoch ist nicht auszuschließen, dass die Zellvermehrung ohne FGF-2 schon zu früheren Zeitpunkten abgenommen hätte.

Einzelzellisolierung unter Sicht

Zur Gewinnung einzelner Zellen wurde das bereits beschriebene Verfahren der Einzelzellisolierung verwendet. Damit war es möglich die einzelnen Zellen nach unmittelbarer Adhärenz der Zellen auf dem Boden der Kultivierungsschale morphologisch auf Ihr Aussehen zu untersuchen. Ebenso konnte auf diese Weise bereits nach ca. 2 Stunden kontrolliert werden, ob sich überhaupt eine Zelle oder gar mehrere Zellen im Well befinden. Mit dieser Methode konnte jedoch nicht zwischen großen und kleinen RS-Zellen differenziert werden, da sich die Zellen im trypsinierten Zustand unter dem Mikroskop nicht unterscheiden ließen. Andere Methoden zur Gewinnung von Einzelzellen stellen die limitierende Verdünnung und die Trennung der Zellen mittels Durch-

flusszytometrie dar. Bei der limitierenden Verdünnung werden die Zellen in einer Dichte von 0,5 Zellen/Well in einer 96-Well-Schale ausgesetzt (De Bari et al. 2006). Die Wahrscheinlichkeit klonale Populationen aus einer einzelnen Zelle zu erhalten ist nach der Statistik von Poisson nahezu 95% (Taswell 1981). Bei dieser Methode ist eine Betrachtung und Beschreibung der Morphologie der Einzelzellen nach zwei Stunden aufgrund des kleinen Durchmessers der Wells unter dem Mikroskop aber nicht möglich, da es an den Rändern und Wänden der Wellschale zu Lichtbrechungen kommt. Dafür müsste man die Zellen wie bei der Einzelzellisolierung in eine 12- oder 6-Well-Schale pipettieren. Für die unmittelbare morphologische Untersuchung müsste man zudem auch einen Mediumtropfen vorlegen, um die Zelle in der Mitte des Wells ausfindig machen zu können. Zudem befinden sich die Zellen während der Erstellung der Verdünnungsreihe für längere Zeit nicht in der optimalen Umgebung. Die durchflusszytometrische Sortierung der Zellen mittels FACS bietet den Vorteil, dass die RS-Zellen, die sich als klein und wenig granuliert darstellen, bereits im Vorfeld von den großen und granulierten Zellen getrennt werden können (Lee et al. 2006, Smith et al. 2004). Somit stehen für die Expansion nur die RS-Zellen zur Verfügung. Nachteile bestehen bei diesem Verfahren sowohl in der notwendigen Eichung des Gerätes auf die jeweiligen Zellgrößen sowie durch den mechanischen Stress, dem die Zellen bei den Aufreinigungsschritten ausgesetzt sind. Bei der Einzelzellisolierung werden die Zellen unmittelbar nach dem Ablösen vom Flaschenboden mittels Trypsin/EDTA-Lösung mit der Pipette eingesaugt und sofort in den Mediumtropfen überführt, so dass sich die Zellen bereits nach kurzer Zeit wieder in der optimalen Umgebung befinden.

4.2 Morphologie und Wachstumsverhalten

Durch die Einzelzellisolierung aus einer Zellsuspension trypsinierter hMSC ist es möglich einzelne Zellen zu separieren und nach anschließender Adhärenz unter dem Auflichtmikroskop bezüglich ihrer Morphologie zu untersuchen. Dabei konnten verschiedene Zellformen und Zellgrößen nachgewiesen werden. Dies führte auch andere Autoren zu dem Versuch, den Zellpool der mesenchymalen Stammzellen in verschiedene Untergruppen zu unterteilen (Smith et al. 2004, Sekiya et al. 2002, Colter et al. 2001, Prockop et al. 2001, Colter et al. 2000). Die typische Morphologie der hMSC wurde als spindelzellig bzw. fibroblastenähnlich beschrieben. Neben diesen Zellen konnten aber auch kleine Zellen gezeigt werden, die zudem eine hohe Tei-

lungsrates aufwies, so dass sich der Begriff der „rapidly self renewing cells“ bzw. RS-Zellen durchsetzte. Diese RS-Zellen waren Ausgangspunkt der dieser Arbeit zugrunde liegenden Versuche.

Aus der primären hMSC-Kultur wurden mittels Einzelzellisolierung über 67 Einzelzellen gewonnen. Da es sich bei den hMSCs um einen heterogenen Zellpool handelt, konnten in der mikroskopischen Kontrolle große flache Zellen, spindelzellige Zellen und auch kleine RS-Zellen beobachtet werden. Im weiteren Verlauf konnten 4 Klone bis zu einer für die Differenzierungsansätze in die adipogene, osteogene und chondrogene Richtung notwendigen Zellzahl expandiert werden. Diese Expansion der Zellen gestaltete sich aufgrund der für das Experiment notwendigen Zellzahl schwierig, da für die chondrogene Differenzierung Zellpellets von mindestens 200000 Zellen von Nöten waren und der Versuchsansatz eine zeitgleiche Untersuchung von entsprechenden Kontrollen voraussetzte. Dies begründete eine Expansion der Zellzahl auf über 1 Mio., was einer Verdopplungsrate von ca. 20 Zellteilungen entspricht und nur bei 4 Klonen erreicht wurde. Dabei zeigte sich in diesen Versuchsansätzen auch nach 4 Wochen Kultivierungsdauer noch die Morphologie der RS-Zellen.

In der statistischen Analyse von 67 Einzelzellen konnte aufgrund der Zellmorphologie keine sichere Aussage über die Proliferationskapazität einzelner Zellen getroffen werden. Die Korrelation der Zellgröße bzw. des Durchmessers der Einzelzellen zur erreichten Zellzahl am 8. Tag ergab, dass bei zu Beginn kleinen Zellen im weiteren Verlauf eine höhere Zellzahl erlangt werden konnte als bei Zellen, die zu Beginn der Expansion eine größere Zellfläche bzw. einen größeren Durchmesser aufwiesen. Zwar sind die Ergebnisse mit p-Werten von $p < 0,0113$ (Fläche) und $p < 0,0318$ (Durchmesser) statistisch signifikant, jedoch kann damit nicht prospektiv eine Aussage auf das Proliferationsverhalten einzelner Zellen gemacht werden. Somit ist es nicht möglich aufgrund der Zellgröße eine sichere Prognose über die Proliferationskapazität einer einzelnen Zelle abzugeben. Im Gegensatz dazu ist die Korrelation beim Vergleich der Zellzahl an Tag 4 mit der Zellzahl an Tag 8 sehr hoch. Auch die Korrelation zwischen der Anzahl der RS-Zellen und der Zellzahl am 8. Tag ist signifikant. Daraus folgt, dass man bereits nach 4 Tagen Kultivierung eine Aussage darüber treffen kann, inwieweit sich die Zelle in der weiteren Kultivierung replizieren wird. Dadurch besteht die Möglichkeit, die Anzahl der Versuchsansätze bereits zu diesem Zeitpunkt zu reduzieren. Die große Streubreite bei diesen Versuchen könnte ebenfalls auf die Heterogenität der hMSC zurückzuführen sein. Die Zellen könnten un-

terschiedliche Zeiten bis zur erneuten Adhärenz nach der Einzelzellisolierung aufweisen. Zudem ist nicht geklärt wie lange einzelne Zellen nach erfolgter Adhärenz brauchen bis sie wieder ihre ursprüngliche Morphologie annehmen. Auf diese Weise ließe sich erklären, warum als klein eingestufte Zellen im weiteren Verlauf keine oder nur eine geringe Proliferationskapazität zeigten. Diese Zellen könnten zu früh als klein klassifiziert worden sein. Etliche Zellen die zuvor als kleine RS-Zelle klassifiziert worden waren, zeigten zu einem späteren Zeitpunkt der Expansion ein anderes Aussehen. Die Morphologie änderte sich zu spindelzelligen oder großen flachen Zellen. Bei der Expansion der Zellen konnte im weiteren Verlauf beobachtet werden, dass die Zellen, die aufgrund ihrer Morphologie subjektiv als kleine RS-Zellen eingeschätzt wurden, auch eine höhere Vermehrungsfähigkeit besaßen, was sich in einer höheren Teilungsrate ausdrückte. Zugleich kam es bei den meisten Ansätzen ohne erkennbare Gründe zu einer Änderung der Morphologie. Dies geschah ohne Unterschied in den Kulturbedingungen oder den Abläufen bei Waschen, Trypsinierung und Aussetzen, da all diese Schritte sowohl stets nach dem Standardprotokoll als auch immer von der gleichen Person ausgeführt wurden. Auch konnte kein bestimmter Zeitpunkt der Morphologieänderung ausgemacht werden, da dieser bei einigen Klonen bereits nach Tagen, bei anderen erst nach Wochen statt fand. Die RS-Zellen veränderten dabei ihr Aussehen zu großen und flachen Zellen und stellten daraufhin ihre weitere Teilung ein. Eine Veränderung der Morphologie von RS-Zellen in spindelzellige oder in flache, große Zellen konnte sehr häufig nachgewiesen werden. Aus einer RS-Zelle konnten sowohl erneut RS-Zellen, spindelzellige oder große, flache Zellen entstehen. Jedoch kam es nie zu einer erneuten Änderung des Aussehens, sobald die Zelle in ihrer Morphologie groß und flach war. Unsere Vermutung, dass diese Zellen in die Apoptose übergehen, konnten wir jedoch nicht bestätigen. In FACS-Analysen (in dieser Arbeit nicht dargestellt) konnten beim Vergleich einer heterogenen Zellsuspension mit einer Zellsuspension großer flacher Zellen mehr apoptotische Zellen bzw. eine größere Menge an Zellen, die sich auf dem Weg in die Apoptose befanden, gezeigt werden. Jedoch konnten mittels TUNEL-Testung (in dieser Arbeit nicht dargestellt) als Nachweis toter Zellen und in der Transmissionselektronenmikroskopie nur vereinzelte apoptotische Zellen unter dieser Zellart gezeigt werden. Weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet sollen klären, ob die hoch proliferativen RS-Zellen als große flache Zellen in ein seneszenten Stadium übergehen. Eine Zunahme der Zellgröße ist oft mit Seneszenz verbunden (Dimri et al. 1995, HAYFLICK et al. 1961). In anderen

Studien wurde mit zunehmendem Alter ein Rückgang der kleinen Zellen und eine Steigerung der Zellzahl der großen flachen Zellen im menschlichen Knochenmark nachgewiesen (D'Ippolito et al. 1999), was zu der Annahme führen könnte, dass die kleinen hoch proliferativen Zellen in vivo durch die großen flachen Zellen ersetzt werden, bzw. sich die kleinen Zellen im Laufe des Lebens in die großen flachen umwandeln. Andere Autoren beschrieben in vitro gealterte hMSC ebenso als größer als ihre jüngeren Vorfahren (Baxter et al. 2004, Mauney et al. 2004, Stenderup et al. 2003). Demnach könnte es sich bei den Zellen, die in unseren Versuchen bereits relativ früh einen Morphologiewechsel durchmachten, um ältere Zellen aus dem heterogenen Zellpool des Knochenmarks handeln. Die kleinen RS-Zellen, die bis zum Schluss der Expansionsphase diese Morphologie beibehielten, wären dann eher jüngeren Zellen zuzuschreiben. DiGirolamo und Kollegen kamen in ihrer Arbeit zu dem Schluss, dass die langsam wachsenden Zellen nach Isolierung vermutlich mehrere Zellteilungen durchgeführt hatten, bis sie für die Experimente zur Verfügung standen und damit ihre Proliferationskapazität abgenommen hatte (DiGirolamo et al. 1999). Zu erwähnen ist auch, dass MSC-Zelllinien, die durch Überexpression von sv40 (Negishi et al. 2000) oder Telomerase (Kobune et al. 2003) immortalisiert wurden, beträchtlich kleiner waren als diejenigen Zellen, aus denen sie entstanden waren. Zudem konnte in einem Beobachtungszeitraum von über zwei Jahren an einem hTERT transduzierten Zellklon gezeigt werden, dass auch nach dieser Zeit keine großen flachen Zellen in der Kultur auftraten (Bocker et al. 2008).

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass es aufgrund der Zellmorphometrie am Tag 1 nicht sicher möglich ist, auf die Proliferationskapazität und die zu erwartende Zellzahl am Tag 8 zu schließen. Dennoch reicht die Kultivierung bis zum Tag 4 aus, um Aussagen über das Zellvorkommen am Tag 8 machen zu können. Im Vergleich der beiden Kultivierungsmedien zeigte sich, dass mit beiden Medien vergleichbare Ergebnisse erzielt werden konnten. Die Tatsache, dass nur 4 Klone bis zu einer für die Differenzierung ausreichenden Zellzahl kultiviert werden konnten, spricht für die Heterogenität des Zellpools und einen geringen prozentualen Ansatz an RS-Zellen.

4.3 Differenzierung

Humane mesenchymale Stammzellen exprimieren keine spezifischen Oberflächenmoleküle ähnlich wie hämatopoetische Stammzellen z.B. den Marker CD34 mit Hilfe derer eine Isolierung und Charakterisierung eindeutig möglich wäre. Auch für die Untergruppe der RS-Zellen gibt es keinen spezifischen Marker, der eine Trennung von den restlichen Zellen z.B. mittels Durchflusszytometer ermöglicht (Smith et al. 2004). Somit bleibt als Beweis der Stammzeleigenschaft der RS-Zellen die hohe Proliferationskapazität wie sie weiter oben bereits beschrieben wurde und die Plastizität in verschiedene Richtungen (Dominici et al. 2006, Pittenger et al. 1999). In der vorliegenden Arbeit wurden die 4 Klone, die auf eine Zellzahl von über 1 Million Zellen expandiert werden konnten, daher in die adipogene, osteogene und chondrogene Richtung differenziert. Während die Differenzierung von RS-Zellen ausgehend vom Einzelzellniveau bereits für die adipogene und osteogene Richtung gezeigt werden konnte (Smith et al. 2004), stand der Nachweis einer Differenzierung in Knorpel noch aus und ist in Kapitel 3.5 dieser Arbeit dargestellt. Damit konnte erstmals der Stammzellcharakter für hMSC ausgehend vom Einzelzellniveau bewiesen werden. In den folgenden Kapiteln soll nun näher auf die einzelnen Differenzierungsrichtungen eingegangen werden.

4.3.1 Adipogene Differenzierung

Die adipogene Differenzierung der Klone erfolgte in der vorliegenden Arbeit mittels Dexamethason, Indomethacin, Insulin und IBMX (Janderova et al. 2003, Pittenger et al. 1999). Die in den stimulierten Zellen entstandenen Fettvakuolen konnten mittels der Oil-Red-O-Färbung (Ramirez-Zacarias et al. 1992) deutlich dargestellt werden. Dabei wiesen die stimulierten Zellen, die aus einer einzigen Zelle entstanden waren, dasselbe Färbemuster auf wie die Zellen der Kontrolle, die aus einer heterogenen Zellpopulation abstammten. In der Kultivierungszeit von 21 Tagen differenzierten aber nicht alle Zellen zu Fettzellen. Ein wichtiger früher Schritt in der Adipogenese ist der Austritt der Zelle aus dem Zellzyklus. hMSCs benötigen eine hormonale Stimulation über mehrere Zyklen, um die Festlegung in Zellen der adipogenen Linie zu erreichen. Dies führt zu der Annahme, dass nur ein bestimmter Teil der Zellen während der hormonalen Induktion sensitiv war. Für die in vitro Differenzierung in Richtung Fett ist ein Cocktail aus verschiedenen Hormonen und anderen Stoffen von enormer Wichtigkeit. Dabei spielt das Insulin wohl eine entscheidende Rolle. Bekanntermaßen

fördert es die Proliferation und Differenzierung von mehreren Vorläuferzelllinien der Fettzellen (Ailhaud 1982). Aber auch in der Chondrogenese (Mackay et al. 1998) und dem Wachstum von Muskelsattelitzenzellen (Shoubridge et al. 1996) spielt es eine große Rolle. Hohe Konzentrationen von Insulin imitieren die Rolle des insulin-like growth factor-1, aktivieren MAP (*mitogen activated protein*)-Kinasen (Qiu et al. 2001) und fördern klonale Expansion in Fettzellen. Im Gegensatz dazu fördert eine Aktivierung der MAP-Kinasen in hMSC die Osteogenese und die Inhibition von ERK (*extra-cellular-signal regulated*)-Kinasen, die auch in die Familie der MAP-Kinasen gehört, ist verantwortlich für die Adipogenese (Jaiswal et al. 2000). Dies führt zu dem Schluss, dass Insulin bei den hMSC zwar die Adipogenese initiieren kann, aber keinesfalls der einzige Faktor ist, der zu einer endgültigen Differenzierung in Fettzellen führt. Im Gegenteil hohe Mengen an Insulin hemmen sogar die Adipogenese. Ein weiterer wichtiger Faktor ist das Serum, das in der vorliegenden Arbeit in Form von Fetalem Bovinem Serum (FBS) dem Differenzierungs- und Erhaltungsmedium zugesetzt wurde. Serum enthält Fettsäuren, Insulin (Ailhaud 1982), IGF-1/2 (Smith et al. 1988) und andere Zytokine. Alle Faktoren, die in die Regulation des Differenzierungsprozesses eingebunden sind. Frühere Studien kamen zu dem Ergebnis, dass die Anwesenheit von Serum im Medium eine Differenzierung von humanen Fettzellen inhibiert (Hauner et al. 2001, Entenmann et al. 1996). Studien mit hMSC konnten zeigen, dass eine Differenzierung ohne FBS zu keinem suffizienten Ergebnis führt (Janderova et al. 2003). Die Differenzierungsmedien aktuellerer Arbeiten enthalten kein FBS mehr, an dessen Stelle aber z.B. Thrombozytenlysate, die ihrerseits eine Vielzahl an Wachstumsfaktoren wie z.B. platelet derived growth factors (PDGF) enthalten (Lange et al. 2007).

4.3.2 Osteogene Differenzierung

Für die osteogene Differenzierung wurden die Zellen mit einem Medium inkubiert, das Dexamethason, β -Glycerophosphat und L-Ascorbinsäure-2-Phosphat (Jaiswal et al. 1997) enthielt. Mittels der Färbetechnik nach von Kossa konnte die Mineralisation, die für eine Bildung von Knochen spricht, nachgewiesen werden. Dabei zeigten sich im stimulierten Klon als auch in der stimulierten heterogenen Kontrolle vergleichbare Ergebnisse. Keine Färbung konnte dagegen in den unstimulierten Zellrasen gesehen werden. Die Knochenbildung *in vitro* wie *in vivo* ist ein komplexer Vorgang, der von verschiedensten Faktoren abhängig ist und vielerlei Einflüsse bedarf (Reddi 2000). In

verschiedensten Studien wurden Protokolle zur osteogenen Differenzierung etabliert, die bestimmte Kombinationen an Stimulantien mit definierten Konzentration beinhalten (Smith et al. 2004, Colter et al. 2001, Banfi et al. 2000, Pittenger et al. 1999, Jaiswal et al. 1997). Es stellt sich die Frage wie diese Protokolle dem dynamischen Prozess der Matrixbildung und Matrixresorption in vivo gerecht werden können. In früheren Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe wurden oben genannte Substanzen bereits zur Differenzierung von hMSCs heran gezogen. Im Vergleich zu humanen Osteoblasten konnte insbesondere in Bezug auf immunhistochemische Marker jedoch keine vollständige Übereinstimmung erzielt werden (Pautke 2004). Dies führt zu der Annahme, dass die Osteogenese allein durch Dexamethason, β -Glycerophosphat und Ascorbinsäure-2-Phosphat nicht nachgeahmt werden kann. Dem Differenzierungsmedium wurde zusätzlich Fetales Bovines Serum zugesetzt, dessen Zusammensetzung nur z.T. bekannt ist und eine große Menge an nicht exakt definierten Mediatoren und Substanzen enthält. Während die adipogene Differenzierung ohne Serum frustran verläuft (Janderova et al. 2003), konnte die osteogene Differenzierung ohne Zusatz von Serum aber unter Zugabe von BMP-6 bereits gezeigt werden (Friedman et al. 2006). Allerdings war in dieser Studie nur das Induktionsmedium serumfrei. Das Wachstumsmedium, in dem die Zellen expandiert wurden, enthielt 20 % FBS, so dass eine vorherige Wirkung der im FBS enthaltenen Faktoren nicht ausgeschlossen ist.

Bei den weiteren Faktoren nimmt das Dexamethason eine große Rolle ein, da es für die Kalzifizierung der extrazellulären Matrix essentiell ist (Rickard et al. 1996). Dennoch scheint der Zusatz von Dexamethason paradox, da die therapeutische Gabe von Glukokortikoiden die Knochenmasse verringert und zu einer Osteoporose führt bzw. diese verstärkt (Canalis 1996). Die alleinige Zugabe von Dexamethason löst bei hMSCs eine Adipogenese aus, die sich in einer verringerten Aktivität der Alkalischen Phosphatase und einer Verringerung der mRNA-Expression von Kollagen Typ-I zeigt (Yin et al. 2006), zudem in einer verringerten Expression des Knochenzell-Transkriptionsfaktors Cbfa1/Runx2 (Li et al. 2005). In Kombination mit β -Glycerophosphat scheint Dexamethason dennoch einen positiven Einfluss auf die in vitro Osteogenese zu haben, da das Zusammenspiel der beiden Faktoren ein günstige Wirkung auf die Bildung von extrazellulärer Matrix hat. Andere Studien zeigten, dass Dexamethason die Expression der Alkalischen Phosphatase steigert. (Pereira et al. 2002, Frank et al. 2002). Das Hinzufügen von β -Glycerophosphat dient wohl in

erster Linie der Egalisierung der negativen Eigenschaften des Dexamethason. Zudem konnte unter gleichzeitiger Applikation eine Zunahme von DNA-Gehalt und Zellzahl in Osteoblasten nachgewiesen werden (Pereira et al. 2001), obwohl Dexamethason als Steroid eher zellsupprimierend wirkt. Ascorbinsäure übernimmt in der Osteogenese wohl die Aufgabe des Phosphatdonors (Beresford et al. 1993). Außerdem ist sie als Redoxsystem für die Hydroxilierung von Kollagen Typ-I verantwortlich, und steigert damit die kollagene extrazelluläre Matrix, deren Vorhandensein Voraussetzung für die Knochenmineralisierung ist (Bellows et al. 1986).

4.3.3 Chondrogene Differenzierung

Die chondrogene Differenzierung wurde mittels Dexamethason, Natriumpyruvat, L-Ascorbinsäure-2-Phosphat, Prolin, ITS [Insulin, Transferrin, Selensäure], Linolsäure, BSA und TGF- β_3 durchgeführt. Der Nachweis der auf diese Weise differenzierten Zellpellets wurde mit der Toluidinblaufärbung, die Glykosaminoglykane der Knorpelgrundsubstanz violett anfärbt, nachgewiesen. Sowohl im stimulierten Klon als auch im Zellpellet der stimulierten heterogenen Kontrolle zeigt sich dabei ein deutliches Signal. Ein schwächeres Signal ist in den unstimulierten Kontrollen erkennbar. Bei diesen Zellen könnte es sich um vereinzelte tote Zellen handeln. Toluidinblau wird auch als Vitalitätsmarker während der Zellzählung eingesetzt. Als spezifischer Nachweis der chondrogenen Differenzierung wurde eine immunhistochemische Färbung gegen Kollagen Typ-II durchgeführt, da Kollagen Typ-II nur in Knorpelgewebe nachweisbar ist.

Die Chondrogenese von MSCs wurde als erstes von Ashton et al. untersucht (Ashton et al. 1980). In den folgenden Jahren wurde ein definiertes Medium zur Induzierung der in vitro Chondrogenese für Kaninchen-MSCs entwickelt, das TGF- β und Dexamethason zur Produzierung von Knorpel enthielt (Johnstone et al. 1998). Unter ähnlichen Bedingungen konnte die Differenzierung in Knorpel auch bei humanen MSCs nachgewiesen werden (Mackay et al. 1998, Yoo et al. 1998). Unter den diversen Mediumzusätzen spielen die Mitglieder der Familie der transforming growth factor- β Wachstumsfaktoren eine große Rolle in der Entwicklung von Knochen und Knorpel. TGF- β_1 ruft eine chondrogene Antwort in Chondrozyten von Kaninchen (Galera et al. 1992), in aus dem Periost stammenden Zellen der Ratte (Joyce et al. 1990), in MSCs der Ratte (Seyedin et al. 1985) und eben auch in humanen MSCs (Barry et al. 2001) hervor. Aber diverse Studien haben gezeigt, dass die Isoformen des TGF- β sich in ih-

ren Effekten auf Chondroprogenitor- und anderen Zellen unterscheiden. Zur Differenzierung von hMSCs in Knorpelzellen sollte TGF- β_2 oder TGF- β_3 herangezogen werden, da sie eine zweifach höhere Akkumulation von Glykosaminoglykanen und eine frühere und ausgeprägtere Ablagerung von Kollagen Typ-2 im Vergleich zu TGF- β_1 bewirken (Barry et al. 2001). Die Synthese von knorpeliger Matrix scheint zudem eine Reihe von molekularen Triggern zu haben. Ein Trigger ist die Bindung von TGF- β s an ihre Rezeptoren, die entweder durch eine SMAD (*small mothers against decapentaplegic*)- oder eine MAP-Kinasen-Aktivierungskaskade Gene zur Synthese von Knorpelmatrix aktivieren (Ishitani et al. 1999, Meneghini et al. 1999, Shibuya et al. 1996). Zwar können hMSCs in vitro auch ohne Zusatz von TGF- β Knorpel produzieren, aber es wird viel weniger Knorpelmatrix synthetisiert als in Kultur mit TGF- β (Ichinose et al. 2005). Die Bindung von TGF- β s an ihre Rezeptoren scheint jedoch einer der Schlüsseltrigger zu sein, um Gene zur Synthese von Knorpelmatrix zu aktivieren, wie z.B. das Gen für Kollagen Typ-2 während des in vivo Knorpelaufbaus. Zudem bewirkt TGF- β_3 eine Inhibition der osteogenen Differenzierung (Moioli et al. 2007). Dies äußert sich sowohl in einer reduzierten Expression von alkalischer Phosphatase als auch von Osteocalcin, die bei der Osteogenese eine wichtige Rolle spielen.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist der Zusatz von Glukokortikoiden in Form von Dexamethason zum Induktionsmedium. So konnte gezeigt werden, dass Dexamethason unter chondrogenen Bedingungen die Genexpression des extrazellulären Matrixproteins Aggrecan induziert. Zudem fördert es die von TGF- β gesteuerte Expression von Kollagen Typ-2 und des *cartilage oligomeric matrix protein* (COMP) (Derfoul et al. 2006). Daneben gibt es scheinbar eine weitere Ähnlichkeit zwischen der in vivo und in vitro Chondrogenese. Die Entwicklung von Gliedmaßen während des Skelettaufbaus beginnt mit einer Migration von mesenchymalen Stammzellen zu den Stellen die für die Knochenbildung bestimmt sind (Summerbell et al. 1972). Die MSCs machen einen Verdichtungsschritt durch, ehe sie ein knorpeliges Gerüst aufbauen. Die in dieser Arbeit verwendete Kultur in Zellpellets, die durch Zentrifugation einer Zellsuspension erreicht wurde, scheint diesen Verdichtungsschritt zu imitieren, der bei Initiation der Skeletogenese beobachtet wurde. Studien ohne Pelletformation aber gleichen Bedingungen ergaben keine vollständige Differenzierung in Knorpel (Ichinose et al. 2005). Dies deutet an, dass die Verdichtung der MSCs eine große Rolle bei der Chondrogenese in vitro spielt.

5. Ausblick

Das Tissue Engineering hat in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Dabei spielen humane mesenchymale Stammzellen eine große Rolle, da sie aus verschiedensten Geweben relativ leicht zu gewinnen sind. Das Problem nach der Isolierung stellt sich aber bei der genauen Untersuchung bzw. Beschreibung der Zellen, da es für hMSCs im Vergleich zu den hämatopoetischen Stammzellen keinen einheitlich Marker gibt, mit dem sie eindeutig zu identifizieren wären. Vielmehr haben verschiedenste Gruppen versucht, die isolierten Zellen mit einer großen Anzahl an Markern, die die jeweilige Zellpopulation exprimiert, zu klassifizieren. Eine weitere Methode stellt die Mehrfachfluoreszenzfärbung dar, mit der es möglich ist bestimmte Marker gleichzeitig sichtbar zu machen. So stellt sich die Frage, ob die diversen Experimente mit hMSCs untereinander vergleichbar sind, da diese durchaus mit unterschiedlichen Zellpopulationen aus dem heterogenen Pool der hMSC durchgeführt wurden. Ein erster Schritt wären einheitliche Isolierungsprotokolle, was aufgrund der unterschiedlichen Marker bis jetzt noch nicht realisiert ist. Ein weiterer Punkt ist, dass die Zellzahl der durch Isolierung gewonnenen Zellen für viele klinische Anwendungen nicht ausreicht. Die Zellen müssen also *in vitro* expandiert werden, was sie im Gegensatz zu den embryonalen Stammzellen aber nur zu einem gewissen Grad tun. Hier könnte die Isolierung von RS-Zellen eine wichtige Rolle spielen, da sie ein hohes Proliferationspotential und eine hohe Plastizität besitzen. Mit diesen Zellen könnte bereits in wenigen Passagen eine sehr große Menge an Zellen zur Verfügung stehen. Innerhalb der RS-Zellen scheint es aber auch noch interindividuelle Unterschiede zu geben so z.B. beim Wachstumsverhalten, die in weiteren Experimenten untersucht werden müssen. Zudem muss die Alterung bzw. der Übergang der Zellen in ein senescentes Stadium in Folgestudien untersucht werden. Der Start erster klinischer Studien mit hMSC sollte aufgrund der vielen ungelösten Kulturbedingungen sehr kritisch beobachtet werden. Es werden noch viele Jahre Grundlagenforschung von Nöten sein, um das Potential der hMSC sicher und voll ausschöpfend nutzen zu können.

6. Zusammenfassung

Zellkulturen humaner mesenchymaler Stammzellen (hMSC) enthalten überwiegend drei Subpopulationen: spindelige fibroblastenähnliche Zellen, große abflachte Zellen und kleine hoch proliferative Zellen, die sogenannten *rapidly self-renewing cells* (RS-Zellen). Ziel dieser Studie war zunächst die Isolation dieser RS-Zellen auf Einzelzellniveau und ihre anschließende klonale Expansion auf eine für Folgeexperimente hohe Zellzahl. Das Hauptziel war das Stammzellkriterium der Plastizität für eine RS-Zelle durch Differenzierung in die adipogene, osteogene und chondrogene Richtung ausgehend von einer Zelle nachzuweisen.

HMSCs der Fa. Cambrex (USA) wurden entsprechend den Herstellerangaben kultiviert. Einzelne Zellen wurden mittels *single cell picking* isoliert und klonal expandiert sowie anschließend entweder nach Standardprotokollen adipogen, osteogen und chondrogen differenziert, oder als Kontrolle unstimuliert kultiviert. Die histologische Auswertung der Differenzierung erfolgte mit Oil Red-O- (Fettzellen), von Kossa- (Knochenzellen) und Toluidin Blau- (Knorpelzellen) Färbung. Für die chondrogene Differenzierung wurde zudem eine spezifische Immunfluoreszenzfärbung gegen Kollagen Typ-II durchgeführt.

Nach Optimierung des Isolationsverfahrens mittels Einzelzellpickens konnte ausgehend von einer einzelnen Zelle die Zellzahl innerhalb von 5 Wochen auf ca. 1 Mio. Zellen expandiert werden. Die adipogene, osteogene und chondrogene Differenzierung konnte bei den stimulierten RS-Zellen durch die oben beschriebenen histologisch Färbemethoden nachgewiesen werden. Die unstimulierten Kontrollen veränderten sich nicht. Die Versuche wurden stets mit einer heterogenen Kontrollgruppe durchgeführt.

In dieser Studie ist es gelungen, ausgehend von einer einzelnen RS-Zelle, die Differenzierung in drei verschiedene Richtungen nachzuweisen. Somit konnten für die RS-Zellen erstmals die Stammzellkriterien einer hohen Replikationsrate sowie die Plastizität durch Differenzierung in drei mesenchymale Gewebetypen nachgewiesen werden. Zudem konnten für die Klassifizierung der RS-Zellen in Bezug auf Morphologie und Wachstumskinetik wichtige Erkenntnisse erbracht werden. Aufgrund ihrer Vermehrungsfähigkeit *in vitro* sind RS-Zellen für das *tissue engineering* besonders von Bedeutung. Jedoch bedarf es weiterer Studien, um das Verhalten der RS-Zellen als Subpopulation der humanen mesenchymalen Stammzellen besser zu verstehen.

7. Literaturverzeichnis

1. Abdallah BM, Haack-Sorensen M, Fink T, Kassem M (2006); Inhibition of osteoblast differentiation but not adipocyte differentiation of mesenchymal stem cells by sera obtained from aged females; *Bone* 39(1):181-188
2. Ailhaud G (1982); Adipose cell differentiation in culture; *Mol Cell Biochem* 49(1):17-31
3. Antonitsis P, Ioannidou-Papagiannaki E, Kaidoglou A, Charokopos N, Kalogeridis A, Kouzi-Koliakou K et al. (2008); Cardiomyogenic potential of human adult bone marrow mesenchymal stem cells in vitro; *Thorac Cardiovasc Surg* 56(2):77-82
4. Ashton BA, Allen TD, Howlett CR, Eaglesom CC, Hattori A, Owen M (1980); Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo; *Clin Orthop Relat Res*(151):294-307
5. Aslan H, Zilberman Y, Kandel L, Liebergall M, Oskouian RJ, Gazit D et al. (2006); Osteogenic differentiation of noncultured immunisolated bone marrow-derived CD105+ cells; *Stem Cells* 24(7):1728-1737
6. Aubin JE (1998); Bone stem cells; *J Cell Biochem Suppl* 30-31:73-82
7. Awad HA, Butler DL, Boivin GP, Smith FN, Malaviya P, Huibregtse B et al. (1999); Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon; *Tissue Eng* 5(3):267-277
8. Baksh D, Song L, Tuan RS (2004); Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy; *J Cell Mol Med* 8(3):301-316
9. Banfi A, Muraglia A, Dozin B, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Quarto R (2000); Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: Implications for their use in cell therapy; *Exp Hematol* 28(6):707-715

10. Barry F, Boynton RE, Liu B, Murphy JM (2001); Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components; *Exp Cell Res* 268(2):189-200
11. Barry FP, Murphy JM (2004); Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization; *Int J Biochem Cell Biol* 36(4):568-584
12. Battula VL, Treml S, Abele H, Buhring HJ (2007); Prospective isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human placenta using a frizzled-9-specific monoclonal antibody; *Differentiation*
13. 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
14. Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN, Antosz ME (1986); Mineralized bone nodules formed in vitro from enzymatically released rat calvaria cell populations; *Calcif Tissue Int* 38(3):143-154
15. Beresford JN, Graves SE, Smoothy CA (1993); Formation of mineralized nodules by bone derived cells in vitro: a model of bone formation?; *Am J Med Genet* 45(2):163-178
16. Bernardo ME, Emons JA, Karperien M, Nauta AJ, Willemze R, Roelofs H et al. (2007); Human mesenchymal stem cells derived from bone marrow display a better chondrogenic differentiation compared with other sources; *Connect Tissue Res* 48(3):132-140
17. Bianco P, Gheron RP (2000); Marrow stromal stem cells; *J Clin Invest* 105(12):1663-1668
18. Bianco P, Robey PG (2001); Stem cells in tissue engineering; *Nature* 414(6859):118-121
19. Bocker W, Yin Z, Drosse I, Haasters F, Rossmann O, Wierer M et al. (2008); Introducing a single-cell-derived human mesenchymal stem cell line expressing hTERT after lentiviral gene transfer; *J Cell Mol Med*

20. Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE (1997); Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation; *J Cell Biochem* 64(2):278-294
21. Bruder SP, Jaiswal N, Ricalton NS, Mosca JD, Kraus KH, Kadiyala S (1998a); Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration; *Clin Orthop Relat Res*(355 Suppl):S247-S256
22. Bruder SP, Kurth AA, Shea M, Hayes WC, Jaiswal N, Kadiyala S (1998b); Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells; *J Orthop Res* 16(2):155-162
23. Bruder SP, Ricalton NS, Boynton RE, Connolly TJ, Jaiswal N, Zaia J et al. (1998c); Mesenchymal stem cell surface antigen SB-10 corresponds to activated leukocyte cell adhesion molecule and is involved in osteogenic differentiation; *J Bone Miner Res* 13(4):655-663
24. Buhring HJ, Battula VL, Tremel S, Schewe B, Kanz L, Vogel W (2007); Novel markers for the prospective isolation of human MSC; *Ann N Y Acad Sci* 1106:262-271
25. Canalis E (1996); Clinical review 83: Mechanisms of glucocorticoid action in bone: implications to glucocorticoid-induced osteoporosis; *J Clin Endocrinol Metab* 81(10):3441-3447
26. Caplan AI, Bruder SP (2001); Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century; *Trends Mol Med* 7(6):259-264
27. Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G, Kapoor N, Meyers P, Chiarieri D et al. (1980); Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny; *Blood* 56(2):289-301
28. Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ (2000); Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow; *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(7):3213-3218

29. Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ (2001); Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells; *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(14):7841-7845
30. Conget PA, Minguell JJ (1999); Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells; *J Cell Physiol* 181(1):67-73
31. Cowan CM, Shi YY, Aalami OO, Chou YF, Mari C, Thomas R et al. (2004); Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects; *Nat Biotechnol* 22(5):560-567
32. D'Ippolito G, Schiller PC, Ricordi C, Roos BA, Howard GA (1999); Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow; *J Bone Miner Res* 14(7):1115-1122
33. De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP (2001); Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane; *Arthritis Rheum* 44(8):1928-1942
34. De Bari C, Dell'Accio F, Vandenabeele F, Vermeesch JR, Raymackers JM, Luyten FP (2003); Skeletal muscle repair by adult human mesenchymal stem cells from synovial membrane; *J Cell Biol* 160(6):909-918
35. De Bari C, Dell'Accio F, Vanlauwe J, Eyckmans J, Khan IM, Archer CW et al. (2006); Mesenchymal multipotency of adult human periosteal cells demonstrated by single-cell lineage analysis; *Arthritis Rheum* 54(4):1209-1221
36. De Coppi P, Bartsch G, Jr., Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L et al. (2007); Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy; *Nat Biotechnol* 25(1):100-106
37. Delorme B, Chateauvieux S, Charbord P (2006); The concept of mesenchymal stem cells; *Regen Med* 1(4):497-509
38. Deng W, Han Q, Liao L, Li C, Ge W, Zhao Z et al. (2005); Engrafted bone marrow-derived flk-(1+) mesenchymal stem cells regenerate skin tissue; *Tissue Eng* 11(1-2):110-119

39. Derfoul A, Perkins GL, Hall DJ, Tuan RS (2006); Glucocorticoids promote chondrogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells by enhancing expression of cartilage extracellular matrix genes; *Stem Cells* 24(6):1487-1495
40. Dezawa M, Ishikawa H, Itokazu Y, Yoshihara T, Hoshino M, Takeda S et al. (2005); Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration; *Science* 309(5732):314-317
41. DiGirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R, Prockop DJ (1999); Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate; *Br J Haematol* 107(2):275-281
42. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C et al. (1995); A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo; *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(20):9363-9367
43. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D et al. (2006); Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement; *Cytotherapy* 8(4):315-317
44. Eaves C, Glimm H, Eisterer W, Audet J, Maguer-Satta V, Piret J (2001); Characterization of human hematopoietic cells with short-lived in vivo repopulating activity; *Ann N Y Acad Sci* 938:63-70
45. Entenmann G, Hauner H (1996); Relationship between replication and differentiation in cultured human adipocyte precursor cells; *Am J Physiol* 270(4 Pt 1):C1011-C1016
46. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G et al. (1998); Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors; *Science* 279(5356):1528-1530
47. Frank O, Heim M, Jakob M, Barbero A, Schafer D, Bendik I et al. (2002); Real-time quantitative RT-PCR analysis of human bone marrow stromal cells during osteogenic differentiation in vitro; *J Cell Biochem* 85(4):737-746

48. 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
49. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV (1966); Osteogenesis in transplants of bone marrow cells; *J Embryol Exp Morphol* 16(3):381-390
50. Friedman MS, Long MW, Hankenson KD (2006); Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells is regulated by bone morphogenetic protein-6; *J Cell Biochem* 98(3):538-554
51. Galera P, Redini F, Vivien D, Bonaventure J, Penfornis H, Loyau G et al. (1992); Effect of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) on matrix synthesis by monolayer cultures of rabbit articular chondrocytes during the dedifferentiation process; *Exp Cell Res* 200(2):379-392
52. Gang EJ, Bosnakovski D, Figueiredo CA, Visser JW, Perlingeiro RC (2007); SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow; *Blood* 109(4):1743-1751
53. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S (2000); Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo; *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(25):13625-13630
54. Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortessidis A et al. (2003); Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow; *J Cell Sci* 116(Pt 9):1827-1835
55. Hauner H, Skurk T, Wabitsch M (2001); Cultures of human adipose precursor cells; *Methods Mol Biol* 155:239-247
56. HAYFLICK L, MOORHEAD PS (1961); The serial cultivation of human diploid cell strains; *Exp Cell Res* 25:585-621
57. Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI (1992); Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow; *Bone* 13(1):81-88

58. Honczarenko M, Glodek AM, Swierkowski M, Na IK, Silberstein LE (2006); Developmental stage-specific shift in responsiveness to chemokines during human B-cell development; *Exp Hematol* 34(8):1093-1100
59. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC et al. (2005); Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement; *Cytotherapy* 7(5):393-395
60. Ianus A, Holz GG, Theise ND, Hussain MA (2003); In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion; *J Clin Invest* 111(6):843-850
61. Ichinose S, Tagami M, Muneta T, Sekiya I (2005); Morphological examination during in vitro cartilage formation by human mesenchymal stem cells; *Cell Tissue Res* 322(2):217-226
62. in 't Anker PS, Noort WA, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Kruisselbrink AB, van Bezooijen RL et al. (2003); Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential; *Haematologica* 88(8):845-852
63. Ishitani T, Ninomiya-Tsuji J, Nagai S, Nishita M, Meneghini M, Barker N et al. (1999); The TAK1-NLK-MAPK-related pathway antagonizes signalling between beta-catenin and transcription factor TCF; *Nature* 399(6738):798-802
64. Ito T, Sawada R, Fujiwara Y, Seyama Y, Tsuchiya T (2007); FGF-2 suppresses cellular senescence of human mesenchymal stem cells by down-regulation of TGF-beta2; *Biochem Biophys Res Commun* 359(1):108-114
65. Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP (1997); Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro; *J Cell Biochem* 64(2):295-312
66. Jaiswal RK, Jaiswal N, Bruder SP, Mbalaviele G, Marshak DR, Pittenger MF (2000); Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase; *J Biol Chem* 275(13):9645-9652

67. Janderova L, McNeil M, Murrell AN, Mynatt RL, Smith SR (2003); Human mesenchymal stem cells as an in vitro model for human adipogenesis; *Obes Res* 11(1):65-74
68. Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW (2004); Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging; *Exp Hematol* 32(5):414-425
69. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR et al. (2002); Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow; *Nature* 418(6893):41-49
70. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU (1998); In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells; *Exp Cell Res* 238(1):265-272
71. Jonsson KB, Frost A, Nilsson O, Ljunghall S, Ljunggren O (1999); Three isolation techniques for primary culture of human osteoblast-like cells: a comparison; *Acta Orthop Scand* 70(4):365-373
72. Joyce ME, Roberts AB, Sporn MB, Bolander ME (1990); Transforming growth factor-beta and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur; *J Cell Biol* 110(6):2195-2207
73. Kang XQ, Zang WJ, Bao LJ, Li DL, Song TS, Xu XL et al. (2005); Fibroblast growth factor-4 and hepatocyte growth factor induce differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocytes; *World J Gastroenterol* 11(47):7461-7465
74. Karahuseyinoglu S, Cinar O, Kilic E, Kara F, Akay GG, Demiralp DO et al. (2007); Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys; *Stem Cells* 25(2):319-331
75. Kassem M (2006); Stem cells: potential therapy for age-related diseases; *Ann N Y Acad Sci* 1067:436-442
76. Kassis I, Zangi L, Rivkin R, Levdansky L, Samuel S, Marx G et al. (2006); Isolation of mesenchymal stem cells from G-CSF-mobilized human peripheral blood using fibrin microbeads; *Bone Marrow Transplant* 37(10):967-976

77. Kemp KC, Hows J, Donaldson C (2005); Bone marrow-derived mesenchymal stem cells; *Leuk Lymphoma* 46(11):1531-1544
78. Kobune M, Kawano Y, Ito Y, Chiba H, Nakamura K, Tsuda H et al. (2003); Telomerized human multipotent mesenchymal cells can differentiate into hematopoietic and cobblestone area-supporting cells; *Exp Hematol* 31(8):715-722
79. Korbling M, Estrov Z (2003); Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept?; *N Engl J Med* 349(6):570-582
80. Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R et al. (2001); Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell; *Cell* 105(3):369-377
81. Kuznetsov SA, Krebsbach PH, Satomura K, Kerr J, Riminucci M, Benayahu D et al. (1997); Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo; *J Bone Miner Res* 12(9):1335-1347
82. Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, Satomura K, Bianco P, Robey PG (2001); Circulating skeletal stem cells; *J Cell Biol* 153(5):1133-1140
83. Lange C, Cakiroglu F, Spiess AN, Cappallo-Obermann H, Dierlamm J, Zander AR (2007); Accelerated and safe expansion of human mesenchymal stromal cells in animal serum-free medium for transplantation and regenerative medicine; *J Cell Physiol* 213(1):18-26
84. Lee RH, Hsu SC, Munoz J, Jung JS, Lee NR, Pochampally R et al. (2006); A subset of human rapidly self-renewing marrow stromal cells preferentially engraft in mice; *Blood* 107(5):2153-2161
85. Li X, Jin L, Cui Q, Wang GJ, Balian G (2005); Steroid effects on osteogenesis through mesenchymal cell gene expression; *Osteoporos Int* 16(1):101-108
86. Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, Radu A, Moseley AM, Deans R et al. (2000); Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep; *Nat Med* 6(11):1282-1286

87. Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO, Pittenger MF (1998); Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow; *Tissue Eng* 4(4):415-428
88. Majumdar MK, Keane-Moore M, Buyaner D, Hardy WB, Moorman MA, McIntosh KR et al. (2003); Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells; *J Biomed Sci* 10(2):228-241
89. Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, Moorman M, Gerson SL (1998); Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells; *J Cell Physiol* 176(1):57-66
90. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J et al. (1999); Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro; *J Clin Invest* 103(5):697-705
91. Mauney JR, Kaplan DL, Volloch V (2004); Matrix-mediated retention of osteogenic differentiation potential by human adult bone marrow stromal cells during ex vivo expansion; *Biomaterials* 25(16):3233-3243
92. Meneghini MD, Ishitani T, Carter JC, Hisamoto N, Ninomiya-Tsuji J, Thorpe CJ et al. (1999); MAP kinase and Wnt pathways converge to downregulate an HMG-domain repressor in *Caenorhabditis elegans*; *Nature* 399(6738):793-797
93. Mets T, Verdonk G (1981); Variations in the stromal cell population of human bone marrow during aging; *Mech Ageing Dev* 15(1):41-49
94. Mizuno N, Shiba H, Ozeki Y, Mouri Y, Niitani M, Inui T et al. (2006); Human autologous serum obtained using a completely closed bag system as a substitute for foetal calf serum in human mesenchymal stem cell cultures; *Cell Biol Int*
95. Muioli EK, Hong L, Mao JJ (2007); Inhibition of osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells; *Wound Repair Regen* 15(3):413-421
96. Nakahara H, Goldberg VM, Caplan AI (1991); Culture-expanded human periosteal-derived cells exhibit osteochondral potential in vivo; *J Orthop Res* 9(4):465-476

97. Negishi Y, Kudo A, Obinata A, Kawashima K, Hirano H, Yanai N et al. (2000); Multipotency of a bone marrow stromal cell line, TBR31-2, established from ts-SV40 T antigen gene transgenic mice; *Biochem Biophys Res Commun* 268(2):450-455
98. Noth U, Osyczka AM, Tuli R, Hickok NJ, Danielson KG, Tuan RS (2002); Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells; *J Orthop Res* 20(5):1060-1069
99. Ong SY, Dai H, Leong KW (2006); Hepatic differentiation potential of commercially available human mesenchymal stem cells; *Tissue Eng* 12(12):3477-3485
100. Otto WR, Rao J (2004); Tomorrow's skeleton staff: mesenchymal stem cells and the repair of bone and cartilage; *Cell Prolif* 37(1):97-110
101. Owen M, Friedenstein AJ (1988); Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors; *Ciba Found Symp* 136:42-60
102. Pautke C. Charakterisierung von humanen mesenchymalen Stammzellen und Zellen der osteoblastären Differenzierungskaskade (2004); Dissertation; LMU München: Medizinische Fakultät
103. Peng H, Huard J (2004); Muscle-derived stem cells for musculoskeletal tissue regeneration and repair; *Transpl Immunol* 12(3-4):311-319
104. Pereira RC, Delany AM, Canalis E (2002); Effects of cortisol and bone morphogenetic protein-2 on stromal cell differentiation: correlation with CCAAT-enhancer binding protein expression; *Bone* 30(5):685-691
105. Pereira RM, Delany AM, Canalis E (2001); Cortisol inhibits the differentiation and apoptosis of osteoblasts in culture; *Bone* 28(5):484-490
106. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD et al. (1999); Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells; *Science* 284(5411):143-147
107. Prockop DJ (1997); Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues; *Science* 276(5309):71-74

108. Prockop DJ, Gregory CA, Spees JL (2003); One strategy for cell and gene therapy: harnessing the power of adult stem cells to repair tissues; *Proc Natl Acad Sci USA* 100 Suppl 1:11917-11923
109. Prockop DJ, Sekiya I, Colter DC (2001); Isolation and characterization of rapidly self-renewing stem cells from cultures of human marrow stromal cells; *Cytotherapy* 3(5):393-396
110. Qiu Z, Wei Y, Chen N, Jiang M, Wu J, Liao K (2001); DNA synthesis and mitotic clonal expansion is not a required step for 3T3-L1 preadipocyte differentiation into adipocytes; *J Biol Chem* 276(15):11988-11995
111. Raimondo S, Penna C, Pagliaro P, Geuna S (2006a); Morphological characterization of GFP stably transfected adult mesenchymal bone marrow stem cells; *J Anat* 208(1):3-12
112. Raimondo S, Penna C, Pagliaro P, Geuna S (2006b); Morphological characterization of GFP stably transfected adult mesenchymal bone marrow stem cells; *J Anat* 208(1):3-12
113. Ramirez-Zacarias JL, Castro-Munozledo F, Kuri-Harcuch W (1992); Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O; *Histochemistry* 97(6):493-497
114. Reddi AH (2000); Morphogenesis and tissue engineering of bone and cartilage: inductive signals, stem cells, and biomimetic biomaterials; *Tissue Eng* 6(4):351-359
115. Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM (2001); Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells; *Blood* 98(9):2615-2625
116. Rickard DJ, Kassem M, Hefferan TE, Sarkar G, Spelsberg TC, Riggs BL (1996); Isolation and characterization of osteoblast precursor cells from human bone marrow; *J Bone Miner Res* 11(3):312-324

117. Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN (2003); Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord; *Stem Cells* 21(1):105-110
118. Rosada C, Justesen J, Melsvik D, Ebbesen P, Kassem M (2003); The human umbilical cord blood: a potential source for osteoblast progenitor cells; *Calcif Tissue Int* 72(2):135-142
119. Schieker M. Die Wertigkeit von humanen mesenchymalen Stammzellen für das Tissue Engineering von Knochen (2007); Habilitationsschrift; LMU München: Medizinische Fakultät
120. Schieker M, Pautke C, Haasters F, Schieker J, Docheva D, Bocker W et al. (2007); Human mesenchymal stem cells at the single-cell level: simultaneous seven-colour immunofluorescence; *J Anat* 210(5):592-599
121. Schieker M, Pautke C, Reitz K, Hemraj I, Neth P, Mutschler W et al. (2004); The use of four-colour immunofluorescence techniques to identify mesenchymal stem cells; *J Anat* 204(2):133-139
122. Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T et al. (2002); Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells; *J Clin Invest* 109(10):1291-1302
123. Secco M, Zucconi E, Vieira NM, Fogaca LL, Cerqueira A, Carvalho MD et al. (2008); Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood!; *Stem Cells* 26(1):146-150
124. Sekiya I, Larson BL, Smith JR, Pochampally R, Cui JG, Prockop DJ (2002); Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality; *Stem Cells* 20(6):530-541
125. Sekiya I, Larson BL, Vuoristo JT, Cui JG, Prockop DJ (2004); Adipogenic differentiation of human adult stem cells from bone marrow stroma (MSCs); *J Bone Miner Res* 19(2):256-264

126. Seyedin SM, Thomas TC, Thompson AY, Rosen DM, Piez KA (1985); Purification and characterization of two cartilage-inducing factors from bovine demineralized bone; *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(8):2267-2271
127. 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
128. Shibuya H, Yamaguchi K, Shirakabe K, Tonegawa A, Gotoh Y, Ueno N et al. (1996); TAB1: an activator of the TAK1 MAPKKK in TGF-beta signal transduction; *Science* 272(5265):1179-1182
129. Shoubridge EA, Johns T, Boulet L (1996); Use of myoblast cultures to study mitochondrial myopathies; *Methods Enzymol* 264:465-475
130. Smith JR, Pochampally R, Perry A, Hsu SC, Prockop DJ (2004); Isolation of a highly clonogenic and multipotential subfraction of adult stem cells from bone marrow stroma; *Stem Cells* 22(5):823-831
131. Smith PJ, Wise LS, Berkowitz R, Wan C, Rubin CS (1988); Insulin-like growth factor-I is an essential regulator of the differentiation of 3T3-L1 adipocytes; *J Biol Chem* 263(19):9402-9408
132. Sotiropoulou PA, Perez SA, Salagianni M, Baxevanis CN, Papamichail M (2006); Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells; *Stem Cells* 24(2):462-471
133. Spees JL, Gregory CA, Singh H, Tucker HA, Peister A, Lynch PJ et al. (2004); Internalized antigens must be removed to prepare hypoimmunogenic mesenchymal stem cells for cell and gene therapy; *Mol Ther* 9(5):747-756
134. Stenderup K, Justesen J, Clausen C, Kassem M (2003); Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells; *Bone* 33(6):919-926

135. 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; *Exp Hematol* 32(12):1212-1225
136. Summerbell D, Wolpert L (1972); Cell density and cell division in the early morphogenesis of the chick wing; *Nat New Biol* 239(88):24-26
137. Taswell C (1981); Limiting dilution assays for the determination of immunocompetent cell frequencies. I. Data analysis; *J Immunol* 126(4):1614-1619
138. Tuli R, Tuli S, Nandi S, Wang ML, Alexander PG, Haleem-Smith H et al. (2003); Characterization of multipotential mesenchymal progenitor cells derived from human trabecular bone; *Stem Cells* 21(6):681-693
139. Wagers AJ, Christensen JL, Weissman IL (2002); Cell fate determination from stem cells; *Gene Ther* 9(10):606-612
140. Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI et al. (1994); Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage; *J Bone Joint Surg Am* 76(4):579-592
141. Wang HS, Hung SC, Peng ST, Huang CC, Wei HM, Guo YJ et al. (2004); Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord; *Stem Cells* 22(7):1330-1337
142. Yin L, Li YB, Wang YS (2006); Dexamethasone-induced adipogenesis in primary marrow stromal cell cultures: mechanism of steroid-induced osteonecrosis; *Chin Med J (Engl)* 119(7):581-588
143. Yoo JU, Barthel TS, Nishimura K, Solchaga L, Caplan AI, Goldberg VM et al. (1998); The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells; *J Bone Joint Surg Am* 80(12):1745-1757
144. Young HE, Steele TA, Bray RA, Hudson J, Floyd JA, Hawkins K et al. (2001); Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors; *Anat Rec* 264(1):51-62

145. Young RG, Butler DL, Weber W, Caplan AI, Gordon SL, Fink DJ (1998); Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair; *J Orthop Res* 16(4):406-413
146. Zipori D (2005); The stem state: plasticity is essential, whereas self-renewal and hierarchy are optional; *Stem Cells* 23(6):719-726
147. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H et al. (2002); Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells; *Mol Biol Cell* 13(12):4279-4295

8. Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

bFGF-2	basic Fibroblast Growth Factor-2
BSA	Bovines Serum Albumin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
D-PBS	Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline without Calcium and Magnesium
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FBS	Fetal Bovine Serum
hMSC	human Mesenchymal Stem Cells / humane mesenchymale Stammzellen
α -MEM	alpha Minimum Essential Medium
MSCGM	Mesenchymal Stem Cell Growth Medium
TGF- β_3	Transforming Growth Factor β_3

8.2 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Darstellung der Plastizität humaner mesenchymaler Stammzellen
- Abb. 2: Die unterschiedlichen Subtypen von hMSCs
- Abb. 3: Typische Zellmorphologien von RS-Zellen nach dem Einzelzellpicken
- Abb. 4: Zeitreihenaufnahme zweier RS-Zellen während der Zellteilung
- Abb. 5: Beziehung zwischen Subpopulationen von hMSC und ihrer Differenzierung in spezifische Zelltypen.
- Abb. 6: Schematische Darstellung des Versuchsansatzes
- Abb. 7: Funktionsweise der Neubauer Zählkammer
- Abb. 8: Spektrale Lage vor Absorption und Emission bei Fluoreszenz
- Abb. 9: Lichtspektrum Quecksilberhöchstdrucklampe
- Abb. 10: Vorgang der Einzelzellisolierung
- Abb. 11: Bild einer Einzelzelle 4 Stunden nach Einzelzellisolierung
- Abb. 12: Subpopulationen von hMSC
- Abb. 13: Übersicht über 16 Einzelzellen und deren unterschiedliche Morphologie
- Abb. 14: Darstellung der 4 Einzelzellklone vor Expansion
- Abb. 15: Zellklon 1 nach Isolierung; Zellklon 1 an Tag 8; Zellklon 1 an Tag 29
- Abb. 16: Korrelation zwischen Zellfläche am Tag 1 und Zellzahl am Tag 8
- Abb. 17: Korrelation zwischen Zelldurchmesser am Tag 1 und Zellzahl am Tag 8
- Abb. 18: Korrelation zwischen Zellzahl am Tag 4 und der Zellzahl am Tag 8
- Abb. 19: Korrelation zwischen RS-Zellzahl am Tag 4 und der Zellzahl am Tag 8
- Abb. 20: Vergleich zwischen beiden Kultivierungsmedien in Bezug auf die Teilungsraten der Zellen
- Abb. 21: Zellzahl der für die Differenzierungsansätze verwendeten Klone im zeitlichen Verlauf von 4 Wochen.
- Abb. 22: Oil-Red-O-Färbung zur Darstellung der adipogenen Differenzierung
- Abb. 23: von-Kossa-Färbung zur Darstellung der osteogenen Differenzierung
- Abb. 24: Toluidinblau-Färbung zur Darstellung der chondrogenen Differenzierung
- Abb. 25: Immunhistochemische Färbung gegen Kollagen Typ-II

8.3 Tabellenverzeichnis

- Tab. 1: Darstellung der von der Fa. Cambrex durchflusszytometrisch nachgewiesenen Oberflächenantikörper und ihrer Funktion in der Zelle
- Tab. 2: Übersicht über die verwendeten Antikörper und Kernfarbstoff DAPI
- Tab. 3: Übersicht über die verwendeten Materialien
- Tab. 4: Übersicht über die verwendeten Chemikalien und Reagenzien
- Tab. 5: Übersicht über die verwendeten Geräte
- Tab. 6: Zelldokumentation an Tag 1 vier Stunden nach Einzelzellisolierung
- Tab. 7: Zelldokumentation an Tag 4
- Tab. 8: Zelldokumentation an Tag 8

8.4 Danksagung

Für die Vergabe des Themas sowie seine stets freundliche und großzügige Förderung danke ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Wolf Mutschler, sehr herzlich.

Besonders möchte ich mich auch bei meinem Betreuer Herrn PD Dr. Matthias Schieker bedanken, dessen konstruktive und intensive Betreuung bei dieser Arbeit maßgeblich zum Gelingen beigetragen haben.

Herrn Dr. Florian Haasters danke ich besonders für seine Unterstützung bei der Einarbeitung in das Thema und seine freundschaftliche Zusammenarbeit in weiteren Projekten.

Des Weiteren bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Tissue Engineering und Regenerative Medizin, die mich durch zahlreiche Hilfestellungen beim Erlernen und Durchführung der labortechnischen Arbeiten unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meiner Freundin Sabine Kürzinger, für Ihre unermüdliche Geduld, sowie meinen Eltern, ohne deren immerwährende Unterstützung und Motivation weder mein Medizinstudium noch die Erstellung dieser Arbeit möglich gewesen wären; ihnen widme ich diese Arbeit.

8.5 Lebenslauf

Am 03.12.1979 wurde ich als erstes Kind der Lehrerin Ilke Wierer, geb. Blanke, und des Diplom-Ingenieur Architekt Karl Georg Wierer in München geboren. Meine Grundschulzeit verbrachte ich auf der Gröbenbachschule in Gröbenzell, ehemals Hans-Kerle-Schule. Anschließend folgte die höhere Schulausbildung auf dem Gymnasium Gröbenzell, die ich mit der Hochschulreife im Juni 1999 abschloss. Zum Sommersemester 2000 begann ich mit dem Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München. Nach bestandenem Physikum setzte ich das Studium mit der klinischen Ausbildung zum Wintersemester 2002/2003 an der Technischen Universität München fort. Das Praktische Jahr absolvierte ich wieder an der Ludwig-Maximilians-Universität München, an der ich im November 2006 die ärztliche Prüfung mit Erfolg ablegte und das Studium mit Erwerb der Approbation abschloss. Seit Januar 2007 bin ich als Assistenzarzt und wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Chirurgischen Klinik und Poliklinik – Innenstadt der LMU München tätig.