

Aus dem Bereich Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Vergleichende Charakterisierung und Differenzierung
adulter humaner Stammzellen
aus Pankreas und Speicheldrüsen**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2009

vorgelegt von Diplom-Biologe Erwin Gorjup
geb. am 18.12.1973 in Temeschburg

Tag des Kolloquiums:

Dekan: Prof. Dr. M. D. Menger

Dissertationsgutachter: Prof. Dr. G. R. Fuhr

Prof. Dr. A. Meyerhans

Die experimentellen Untersuchungen dieser Arbeit wurden am Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik (IBMT) St. Ingbert in der Abteilung Zellbiologie und Angewandte Virologie durchgeführt.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I	
Summary	II	
Abkürzungsverzeichnis	III	
1	Einleitung	1
1.1	Embryonalentwicklung	1
1.2	Stammzellen	2
1.2.1	Embryonale Stammzellen	3
1.2.2	Induzierte pluripotente Stammzellen	4
1.2.3	Adulte Stammzellen	7
1.2.4	Embryonale Stammzellen versus adulte Stammzellen	12
1.3	Regenerative Medizin und Tissue Engineering	14
1.4	Gerichtete Differenzierung	16
1.4.1	Fettgewebe und adipogene Differenzierung	16
1.4.2	Knorpel und chondrogene Differenzierung	18
1.4.3	Knochen und osteogene Differenzierung	20
1.5	Transforming Growth Factor- β -Signalweg	23
1.6	Zelluläre Seneszenz	25
1.7	Stand der Zellkultur	28
1.8	Entwicklung einer automatisierten Bildverarbeitung	31
1.9	Fragestellung	33
2	Material und Methoden	34
2.1	Materialien	34
2.1.1	Chemikalien	34
2.1.2	Allgemeine Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien	35
2.1.3	Geräte	36
2.1.4	Medien, Lösungen und Pufferzusammensetzungen	36
2.1.5	Antikörper	40
2.1.6	Plasmide	41
2.1.7	Zelllinien und Bakterien	42
2.2	Methoden	43
2.2.1	Zellkultur	43
2.2.2	Arbeiten mit RNA und DNA	45
2.2.3	Arbeiten mit Bakterien und Viren	50
2.2.4	Immunzytochemie	52
2.2.5	Nachweis der adipogenen Differenzierung	54
2.2.6	Nachweis der osteogenen Differenzierung	54
2.2.7	Nachweis der chondrogenen Differenzierung	55
2.2.8	Telomerlängen- und Telomeraseaktivitätsbestimmung	55
2.2.9	Automatisierte Bildverarbeitung	59

3	Ergebnisse	61
3.1	Charakterisierung humaner adulter Stammzellen aus Pankreas und Speicheldrüse	61
3.1.1	Morphologie und Proliferationskapazität	61
3.1.2	Zellklonierung der hPSC und hSGSC	63
3.1.3	Telomerlängen, Telomeraseaktivität und Seneszenz in hPSC und hSGSC	64
3.1.4	Expressionsprofil von Stammzell- und Keimblattmarkern	67
3.2	Induzierte Differenzierung von hMSC, hPSC und hSGSC in mesenchymale Richtung	74
3.2.1	Adipogene Differenzierung	74
3.2.2	Chondrogene Differenzierung	77
3.2.3	Osteogene Differenzierung	79
3.3	Immortalisierung von Speicheldrüsen-Stammzellen mittels der katalytischen Untereinheit der Telomerase hTERT	82
3.3.1	Morphologie und Proliferationskapazität	82
3.3.2	Telomeraseaktivität, Telomerlängen und Seneszenz	85
3.3.3	Expressionsprofil	87
3.3.4	Adipogene Differenzierung	89
3.4	Entwicklung einer automatisierten Bildverarbeitung zur Quantifizierung der adipogenen Differenzierung	93
4	Diskussion	101
	Ausblick	111
5	Literaturverzeichnis	113
	Publikationen	122
	Dank	124
	Anhang	125
	Lebenslauf	130

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden humane Zellen aus exokrinem Pankreas- (hPSC) und exokrinem Speicheldrüsen-Gewebe (hSGSC) anhand ihrer Proliferationskapazität, ihres Expressionsprofils und ihres Differenzierungspotential auf Gemeinsamkeiten und ihres möglichen Stammzellpotentials untersucht. Als Referenz dienten humane mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark. Dabei zeigten die adulten Stammzellen aus Pankreas und Speicheldrüse einen ähnlichen Phänotyp wie mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark und besaßen wie diese eine hohe, aber begrenzte Proliferationskapazität. Die Zunahme der Größe, das Verkürzen der Telomere und die Expression von SA- β -Galaktosidase wiesen auf eine kultivierungsbedingte replikative Seneszenz hin. Sie waren in der Lage, spontan in unterschiedliche Zelltypen zu differenzieren, welche den drei embryonalen Keimblättern zugeordnet werden konnten. Nach gezielter Induktion zeigten pankreatische Stammzellen chondrogene und osteogene Differenzierbarkeit. Die Stammzellen aus der Speicheldrüse differenzierten nach Induktion in chondrogene, osteogene und adipogene Richtung. Die in dieser Arbeit charakterisierten Stammzellen aus Pankreas und Speicheldrüse besitzen somit ähnliche Eigenschaften wie mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark. Aufgrund dessen könnten diese Stammzellen mesenchymale Stammzellen des jeweiligen Gewebes darstellen, wie es auch schon für Stammzellen anderer Gewebe postuliert wurde.

Durch die Immortalisierung der Stammzellen aus der Speicheldrüse mit dem Enzym Telomerase konnte eine stabile Stammzelllinie generiert werden. Nach ektopischer Expression der Telomerase proliferierten die Zellen schneller, waren nicht mehr seneszent, exprimierten weiterhin Stammzellmarker und erlangten nach kultivierungsbedingtem Verlust ihre adipogene Differenzierbarkeit wieder zurück.

Zur quantitativen Analyse der adipogenen Differenzierung wurde ein automatisierter Algorithmus zur Bildverarbeitung entwickelt, mit dessen Anwendung die adipogene Differenzierungsrate bestimmt werden kann. Der Ansatz beruht auf der großflächigen Aufnahme von Hellfeld- und Fluoreszenzbildern adipogen differenzierter Kulturen. Die hier entwickelte automatisierte Bildverarbeitung ist die einzige Methode, mit der die adipogene Differenzierung räumlich aufgelöst und gleichzeitig qualitativ und quantitativ bestimmt werden kann.

Summary

In this study isolated cells from human exocrine pancreas and exocrine salivary gland tissue have been comparatively characterised for their proliferation capacity, their expression profile, their differentiation potential and their possible stem cell potential opposing mesenchymal stem cells derived from human bone marrow.

The adult stem cells derived from pancreas and salivary gland showed a similar phenotype to human mesenchymal stem cells derived from bone marrow and had a high, but limited proliferation capacity. The increase in size, the reduction of telomeres and the expression of SA- β -galactosidase indicated a cultivation dependent replikative senescence. The cells were able to differentiate spontaneously into variable cell types, representing the three embryonic germ layers. After induction pancreatic stem cells differentiated into chondrogenic and osteogenic lineages. The stem cells of the salivary gland differentiated into chondrogenic, osteogenic and adipogenic lineages. The stem cells of pancreas and salivary gland characterised in this study show similar properties to mesenchymal stem cells of the bone marrow. These stem cells could present mesenchymal stem cells of the respective tissue as shown for other tissues already.

By immortalisation of stem cells derived from the salivary gland with the enzyme telomerase a stable stem cell line could be generated. After ectopic expression of telomerase, the cells proliferated faster, were not senescent anymore, continued to express stem cell markers and gained back their adipogenic differentiation potential after its cultivation dependent loss.

In order to perform a quantitative analysis of the adipogenic differentiation, an automated algorithm for image processing had been developed, which enabled the determination of adipogenic differentiation rates. This approach is based on large-scale bright field and fluorescence images of the adipogenic cultures. The image processing developed here is the only method to determine spatial resolution of the adipogenic differentiation, being at the same time qualitative and quantitative.

Abkürzungsverzeichnis

3T3-L1	Prädipozyten-Zelllinie aus embryonalen Maus-Fibroblasten
bp	"base pair"
BMP-2	"bone morphogenic protein 2"
BSA	bovines Serumalbumin
CD	"cluster of differentiation"
cDNA	"complementary DNA"
Cy	Carbocyanin
dest.	destilliert
3-D	dreidimensional
DAPI	4,6-Diamin-2'-phenylindoldihydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	"deoxyribonucleic acid"
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	"enzyme linked immunosorbent assay"
FACS	"fluorescence-activated cell sorting"
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
GALV	"gibbon ape leukemia virus"
GFP	grün fluoreszierendes Protein
HBS	"HEPES-buffered saline"
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)piperazino]ethansulfonsäure
hES	"human embryonic stem cell"
hMSC	"human mesenchymal stem cell"
hPSC	"human pancreatic stem cell"
hSGSC	"human salivary gland stem cell"
hTERT	"human telomerase reverse transcriptase"
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IGF	"insulin like growth factor"
IgG, IgM	Immunglobulin G, M
iPS	"induced pluripotent stem cell"
IRES	"internal ribosome entry site"
ITS	"Insulin-Transferrin-Selenium"
LB	Lauria Bertani
LDS	"laser dye styryl"
MEF	"mouse embryonic feeder cell"
mES	"mouse embryonic stem cell"
NaCl	Natriumchlorid
OD	Optische Dichte
PBS	"phosphat-buffered saline"
PE	Phycoerythrin
PNA	"peptide nucleic acid"
RNA	"ribonucleic acid"
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	"reverse transcription-polymerase chain reaktion"
SA- β -Galaktosidase	Seneszenz assoziierte- β -Galaktosidase
SV40	Simian Virus 40
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TGF- β	"transforming growth factor- β "
TRF	"telomer restriction fragment"
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	"unit"
UV-Licht	ultraviolettes Licht
v/v	"volume/volume"
w/v	"weight/volume"

1 Einleitung

1.1 Embryonalentwicklung

Während der Embryonalentwicklung der Säuger entsteht aus der befruchteten Eizelle, der Zygote, ein vielzelliger, komplexer Organismus mit über 200 eindeutig unterscheidbaren Zelltypen. Dabei nimmt die Potenz der Zellen von der totipotenten Eizelle über die pluripotenten embryonalen Stammzellen, den bis im adulten Körper enthaltenen multipotenten adulten Stammzellen, bis zu den terminal differenzierten somatischen Zellen stetig ab.

Trotz der Komplexität der Embryonalentwicklung kann sie in fünf grundlegende Prozesse unterteilt werden, die sich gegenseitig überlagern und beeinflussen ¹⁷⁶. Zu Beginn steht eine Phase schneller **Zellteilungen**, den Furchungsteilungen, zwischen denen es kein Zellwachstum gibt. Während der anschließenden **Musterbildung** entstehen dann räumliche und zeitliche Anordnungen im Embryo, die Grundlage für eine geordnete Struktur und damit für den gesamten Körperbauplan sind. Wichtig ist dabei die Entstehung der Körperachsen, wobei die von Kopf bis Schwanz verlaufende Hauptkörperachse (anterior-posterior) sowie die im rechten Winkel verlaufende Achse, welche Vorder- und Rückseite des Organismus (dorso-ventral) bestimmt, festgelegt werden. Als Vorbereitung für die folgende Zelldifferenzierung und Gewebebildung entwickeln sich die drei Keimblätter (Abb. 1).



Abb. 1 Verteilung der Keimblätter während der Embryonalentwicklung

Schematischer Querschnitt durch einen Säuger-Embryo mit der Lage der Keimblätter. Aus den embryonalen Keimblättern Endoderm, Mesoderm und Ektoderm gehen die unterschiedlichen Gewebe mit ihren spezialisierten Zelltypen hervor. Abbildung nach Wolpert 1999 ¹⁷⁶.

Dabei entstehen das innere Endoderm, das äußere Ektoderm sowie das dazwischen liegende Mesoderm. Das Endoderm bildet den Darm mit den davon abgeleiteten

Organen, wie z. B. Leber und Pankreas. Aus dem Mesoderm entwickeln sich das Skelett, die Muskulatur und die inneren Organe. Aus dem Ektoderm entstehen u. a. die Epidermis und das Nervensystem. Bei dem Prozess der **Morphogenese** steht die Gastrulation im Mittelpunkt, während derer Zellen von der Außenseite nach Innen wandern und der Darm gebildet wird. Durch die **Zelldifferenzierung** entwickeln sich Zellen strukturell und funktionell zu völlig unterschiedlichen Zelltypen, wobei bis zur vollen Ausdifferenzierung mehrere Zellteilungen durchlaufen werden. Das **Wachstum** des Embryos kann durch Zellvermehrung, durch Zunahme der Zellgröße, aber auch durch Ablagerung extrazellulären Materials wie bei der Knochenbildung erfolgen und findet verstärkt in der späten Embryonalentwicklung statt.

Diese fünf Entwicklungsprozesse bilden aus einfachen Zellgruppen durch das hohe Potential der frühen embryonalen Zellen zur Proliferation und Differenzierung, organisierte und funktionelle Strukturen. Diese Prozesse sind weder unabhängig voneinander noch folgen sie in strikter Reihenfolge aufeinander¹⁷⁶.

1.2 Stammzellen

Stammzellen sind über ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung, der Differenzierung in verschiedene Zelltypen und der Repopulation eines Gewebes *in vivo* definiert¹⁷². Ist das Differenzierungspotential auf einen Zelltyp beschränkt, sind die Zellen unipotent. Bei Beschränkung auf ein bestimmtes Gewebe werden sie als multipotent und bei unbeschränktem Differenzierungspotential als pluripotent bezeichnet. Kann aus der Zelle ein ganzer Organismus entstehen, gilt die Zelle als totipotent. Totipotent sind ausschließlich die befruchtete Eizelle, die Zygote und die durch symmetrische Teilung daraus hervorgehenden Zellen bis zum Achtzellstadium. Prinzipiell können Stammzellen sich symmetrisch und asymmetrisch teilen. Bei der symmetrischen Zellteilung entstehen zwei gleichwertige Stammzellen. Bei der asymmetrischen Zellteilung entstehen eine Stammzelle und eine Vorläuferzelle, aus der durch weitere Teilungen eine große Zahl von somatischen Zellen generiert werden kann. Die asymmetrischen Teilungen dienen vor allem dem Wachstum und dem Gewebeerhalt bei gleichzeitigem Erhalt eines Stammzellpools.

1.2.1 Embryonale Stammzellen

Während der humanen Embryonalentwicklung entsteht aus der befruchteten Eizelle durch mehrere Teilungen die Zellkugel Morula, aus der sich die Blastozyste entwickelt. Die Blastozyste besteht aus einer äußeren Zelllage, dem Trophoblasten und der inneren Zellmasse (inner cell mass - ICM), dem Embryoblasten. Die Isolierung embryonaler Stammzellen erfolgt durch die Dissoziation der inneren Zellmasse. Erstmals wurde die unlimitierte, undifferenzierte Kultivierung von pluripotenten embryonalen Stammzellen aus der Maus (mES) 1981 beschrieben ^{48, 112}. 1998 konnten Thomson et al. auch aus humanen Blastozysten Zellen isolieren und kultivieren, welche ein uneingeschränktes Proliferations- und Differenzierungspotential zeigten ¹⁶⁴. Wurden die Zellen unter die Haut immundefizienter Mäuse injiziert, bildeten diese ein Teratom mit Zellen der drei Keimblätter aus, ein Merkmal für Pluripotenz. Wichtig zur erfolgreichen Kultivierung ist die Unterdrückung des hohen spontanen Differenzierungspotentials der embryonalen Stammzellen. Dies kann entweder durch die Kultivierung mit einer Feederzellschicht, bestehend aus inaktivierten embryonalen Mausfibroblasten (MEF) erfolgen oder wie bei den mES durch die Kultivierung mit speziellen Faktoren wie LIF (leukemia inhibitory factor). Da humane embryonale Stammzellen (hES) Proteine exprimieren, die adulte Zellen nicht exprimieren, wurden diese Proteine als Marker für embryonale Stammzellen definiert. hES zeigen eine hohe Telomeraseaktivität und sind positiv für embryonale Marker, wie SSEA-3, SSEA-4, Tra-1-60 und Tra-1-81 sowie Alkaline Phosphatase. Transkriptionsfaktoren, welche die Aufrechterhaltung der Selbsterneuerung der embryonalen Stammzellen regulieren, sind hauptsächlich Oct-4 (octamer 4) und Nanog (Abb. 2) ^{39, 88, 113, 121}.

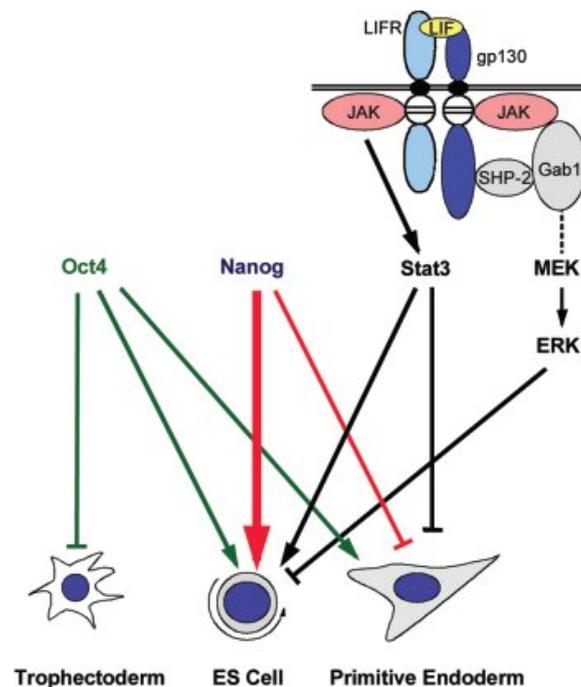


Abb. 2 Regulation der Selbsterneuerung in murinen embryonalen Stammzellen (mES)

Drei Signalwege zur Aufrechterhaltung der Selbsterneuerung der mES sind bekannt: Der LIF abhängige JAK/STAT3-Signalweg sowie die Signalgebung über Nanog und Oct-4. Im Gegensatz dazu unterbindet die MEK/ERK-Signalgebung die Selbsterneuerung der mES. Die Überexpression von Oct-4 führt zur endodermalen Differenzierung. Aus Czyz et al. 2003, verändert nach Cavaleri und Schöler^{33, 38}.

1.2.2 Induzierte pluripotente Stammzellen

Bis heute (August 2009) ist die Quelle der humanen embryonalen Stammzellen, die humane Blastozyste, ethisch bedenklich. Es handelt sich meist um überzählige Blastozysten aus der In-vitro-Fertilisation. Seit 1998 wurden zwar aus einer Vielzahl adulter Geweben Stammzellen isoliert, allerdings konnten für keine dieser adulten Stammzellen bisher die Eigenschaften der hES, wie unlimitedes Wachstum *in vitro*, nachgewiesen werden. Diese Eigenschaften konnten Yamanaka et al. durch das Einbringen von DNA-Sequenzen, welche vier Transkriptionsfaktoren (Oct4, Sox2, c-Myc and Klf4) kodieren, in murinen (2006) und humanen (2008) Fibroblasten induzieren und nannte diese induzierte pluripotente Stammzellen (iPS)^{118, 159}. Der Gruppe um John Dimos gelang es, die Hautzellen einer 82-jährigen Patientin, welche an Amyotropher Lateralsklerose litt (eine degenerative Erkrankung von Motoneuronen), durch retrovirale Transduktion von vier Genen (Oct4, Sox2, c-Myc and Klf4) zu iPS zu reprogrammieren und diese anschließend zu Neuronen und Gliazellen zu differenzieren⁴³. Der Einsatzbereich dieser Zellen könnte somit die autologe Zell-Therapie zur Regeneration von geschädigten Geweben sein. Zhou et al. konnten Zellen des exokrinen Pankreas der

Maus durch das Einbringen von drei Genen, welche die β -Zellentwicklung steuern (Ngn3, Pdx1 und Mafa), direkt in β -Zellen umprogrammieren¹⁸⁷. Die behandelten Zellen sahen anschließend nicht nur morphologisch aus wie β -Zellen, sondern waren auch in der Lage Insulin zu produzieren.

Aufgrund der Tatsache, dass c-Myc in der folgenden Generation tumorinduzierend ist und die Retroviren selbst mutagen sein können, fokussierte sich die Forschung auf Oct4. Der Gruppe um Hans Schöler gelang es 2008, durch das Einbringen von nur zwei Genen (Oct4 und Klf4) und 2009 sogar nur durch das Einbringen von Oct4 aus neuronalen Stammzellen iPS zu generieren^{6, 70}. Aber auch das Einbringen von Oct4 erfolgte mittels eines viralen Vektors, womit virale Gene in die Zellen eingebracht wurden und sich diese für die anschließende therapeutische Verwendung nicht mehr eigneten. Die beiden Gruppen um Knut Woltjen und Andreas Nagy veröffentlichten 2009 gemeinsam das virusfreie Einbringen der vier Sequenzen für Oct4, Sox2, c-Myc and Klf4 mittels Transfektion eines Multiprotein-Expressionsvektors^{82, 177}. Damit konnten sie die Reprogrammierung von murinen und humanen Fibroblasten zu iPS steuern, und es gelang ihnen sogar anschließend, den eingebrachten Vektor wieder zu entfernen. Dadurch lag erstmals eine Methode vor, mit der somatische Zellen virusfrei zu iPS modifiziert werden konnten bei gleichzeitiger Verringerung der unvorhersehbaren genetischen Fehlfunktion. 2009 gelang es den Gruppen von Hans Schöler und Sheng Deng, sogar nur durch die wiederholte Zugabe rekombinanter Proteine, den Transkriptionsfaktoren Oct4, Sox2, Klf4 und c-Myc und Valproinsäure, iPS zu generieren¹⁸⁶. Die zu iPS programmierten embryonalen murinen Fibroblasten zeigten auch in Langzeitstudien die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und waren *in vitro* und *in vivo* pluripotent. Die Tatsache, dass die Promotorregionen von Oct4 und Nanog in den iPS demethyliert waren, während sie in den unbehandelten Fibroblasten hypermethyliert waren, zeigt, dass die Behandlung mit den rekombinanten Proteinen und Valproinsäure zur Reaktivierung des pluripotenten Transkriptionsprogramms geführt haben könnte. Allerdings bleibt die therapeutische Nutzung von Zellen, welche mit Chemikalien wie Valproinsäure generiert wurden, problematisch, da Valproinsäure durch Azetylierungen von Histonen in das epigenetische System eingreift.

Dagegen konnten kürzlich die Gruppen um Kwang-Soo Kim und Robert Lanza aus humanen Fibroblasten iPS generieren, ohne Chemikalien oder Viren zu benutzen. Sie brachten die rekombinanten Proteine (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc) mittels CPP (cell

penetrating peptide) in die Zellen, wodurch diese in ihrer Morphologie, Proliferations- und Differenzierungspotential sowie der Expression embryonaler Stammzellmarker, humanen embryonalen Stammzellen glichen⁸⁷. Chin et al. konnte zeigen, dass sich iPS in ihrem Genexpressionsprofil nicht nur von hES unterscheiden, sondern auch ihr eigenes Profil während ihrer Kultivierung verändern³⁴. Mit zunehmender Kultivierungszeit wird das Genexpressionsprofil der iPS ähnlicher dem hES. Dies deutet auf eine fortlaufende Reprogrammierung während der Kultivierung der iPS hin.

Mittlerweile konnten zwei unabhängige Gruppen aus China (Qi Zhou und Shaorong Gao) aus murinen iPS fertile Mäuse erzeugen^{85, 185}. Beide Wissenschaftler brachten wie Yamanaka et al. 2006 durch virale Transduktion die Gene Oct4, Sox2, Klf4 und c-Myc in embryonale murine Fibroblasten und erzeugten so iPS. Durch die Fusion zweier Zellen eines frühen Embryos erzeugten sie eine tetraploide Blastozyste. Aus dieser entwickelt sich u. a. die Plazenta, aber nicht die embryonalen Stammzellen, die den Embryo bilden. In diese tetraploide Blastozyste injizierten sie die iPS. Nach dem Transfer dieser Blastozyste in eine Leihmutter wurde nach 20 Tagen eine Maus geboren. Die Erfolgsrate dieser Prozedur lag allerdings bei nur 3,5 und 1,1 %. Die niedrige Effizienz kann bisher kaum erklärt werden. Allerdings erkannte Qi Zhou, dass nur Zellen, welche nach 14 Tagen iPS-Kolonien bildeten, nach der Injektion in tetraploide Blastozysten zu lebenden Embryonen führten. Bisher waren embryonale Stammzellen die einzigen Zellen, die nach der Injektion in eine tetraploide Blastozyste Mäuse erzeugten. Die Tatsache, dass dies nun auch mit iPS möglich ist, zeigt wie ähnlich diese den embryonalen Stammzellen sind. Neben der Untersuchung der niedrigen Erfolgsrate, gilt es als nächstes herauszufinden, inwiefern diese Prozedur auch mit adulten Zellen durchgeführt werden kann.

Kann in Zukunft gezeigt werden, dass die reprogrammierten Zellen genetisch stabil und nicht mutagen sind, könnte die iPS eine Quelle für patientenspezifische pluripotente Stammzellen für die therapeutische Anwendung im Bereich der regenerativen Medizin sein. Vor allem deren Differenzierung *in vitro* und ihre anschließende Verwendung *in vivo* sind aufgrund des hohen Differenzierungspotentials vielversprechend.

1.2.3 Adulte Stammzellen

Im Gegensatz zur Embryonalentwicklung findet im adulten Organismus Zellteilung hauptsächlich zum Erhalt der Gesamtzellzahl statt, also um tote oder geschädigte Zellen zu ersetzen. Dabei kann nach Leblond et al. zwischen drei Geweben unterschieden werden¹⁰⁴. Gewebe mit statischer Zellpopulation, in der keine oder nur sehr wenige Zellteilungen stattfinden, wie in Nerven, Skelettmuskeln oder Gelenkknorpel. Gewebe mit wenig Zellerneuerungen wie in der Leber und Gewebe mit permanenten Zellteilungen wie im hämatopoetischen System oder verschiedenen Epithelien, in denen die Zellen eine kurze Lebenszeit besitzen und regelmäßig durch Stammzellen und Vorläuferzellen ersetzt werden.

Adulte Stammzellen könnten Teil des natürlichen Systems der Gewebereparatur sein. Dabei könnte nach einer Verletzung folgendes Szenario ablaufen. Zellproliferation und Zelldifferenzierung der endogenen stammzellartigen Zellen stellen den initialen Schritt dar. Nachdem diese stammzellartigen Zellen aufgebraucht sind, werden nicht-hämatopoetische Stammzellen des Knochenmarks zur Verletzung rekrutiert. Die Reparatur kann durch verschiedene Mechanismen erreicht werden: durch Differenzierung zu einem benötigten Zelltyp, durch Bereitstellen von Zytokinen oder anderen Faktoren und durch Zellfusion, um möglicherweise eine Differenzierung der Stammzellen zu beschleunigen¹³².

In den letzten Jahren konnten aus den unterschiedlichsten adulten Geweben wie Knochenmark, Fett, Leber, Pankreas, Nabelschnurblut, Zahnmark, Haut und anderen Stammzellen isoliert werden^{62, 69, 96, 105, 130, 145, 181, 189}.

Mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark

Das Stroma des Knochenmarks besteht aus einem heterogenen Gemisch von Zelltypen wie Adipozyten, Endothelzellen, Fibroblasten, hämatopoetischen Stammzellen (HSC) sowie den mesenchymalen Stammzellen (MSC). Humane mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark sind zusammen mit den hämatopoetischen Stammzellen die am intensivsten untersuchten adulten Stammzellen. Bereits 1974 konnte Friedenstein et al. zeigen, dass eine Population von Knochenmarkzellen, welche in serumhaltigem Medium kultiviert wird, Kolonien adhärenter Zellen mit fibroblastenartiger Morphologie bilden und in Osteoblasten und Adipozyten differenzieren⁵¹. In der Folge konnten mesenchymale Stammzellen *in vitro* in Zelltypen verschiedener Gewebe wie Knochen,

Knorpel, Fett, Muskel oder Hepatozyten und Neuronen differenziert werden^{130, 138, 163, 170} (Abb. 3).

Motiviert durch das hohe Differenzierungspotential der MSC erfolgten zahlreiche Studien *in vivo*, in denen die Verteilung der injizierten MSC in immunodefizienten Mäusen und die Regeneration eines verletzten Gewebes untersucht wurde. Dabei waren die intravenös injizierten MSC hauptsächlich in den geschädigten Geweben zu finden. In den Mäusen ohne induzierte Verletzungen verteilten sich die injizierten MSC gleichmäßig über den ganzen Körper¹¹⁴.

Weiterhin kann bei mesenchymalen Stammzellen, im Gegensatz zu hämatopoetischen Stammzellen, ein Rückgang ihres Anteils im Knochenmark während der Lebenszeit beobachtet werden. Ist bei Neugeborenen noch eine von 10^4 kernhaltigen Zellen im Knochenmark eine MSC, so ist es bei Jugendlichen nur noch eine von 10^5 und bei alten Menschen nur noch eine von 10^6 . Diese Abnahme des Anteils von MSC entspricht der Abnahme von Frakturheilungen mit zunehmender Lebenszeit⁶⁸.

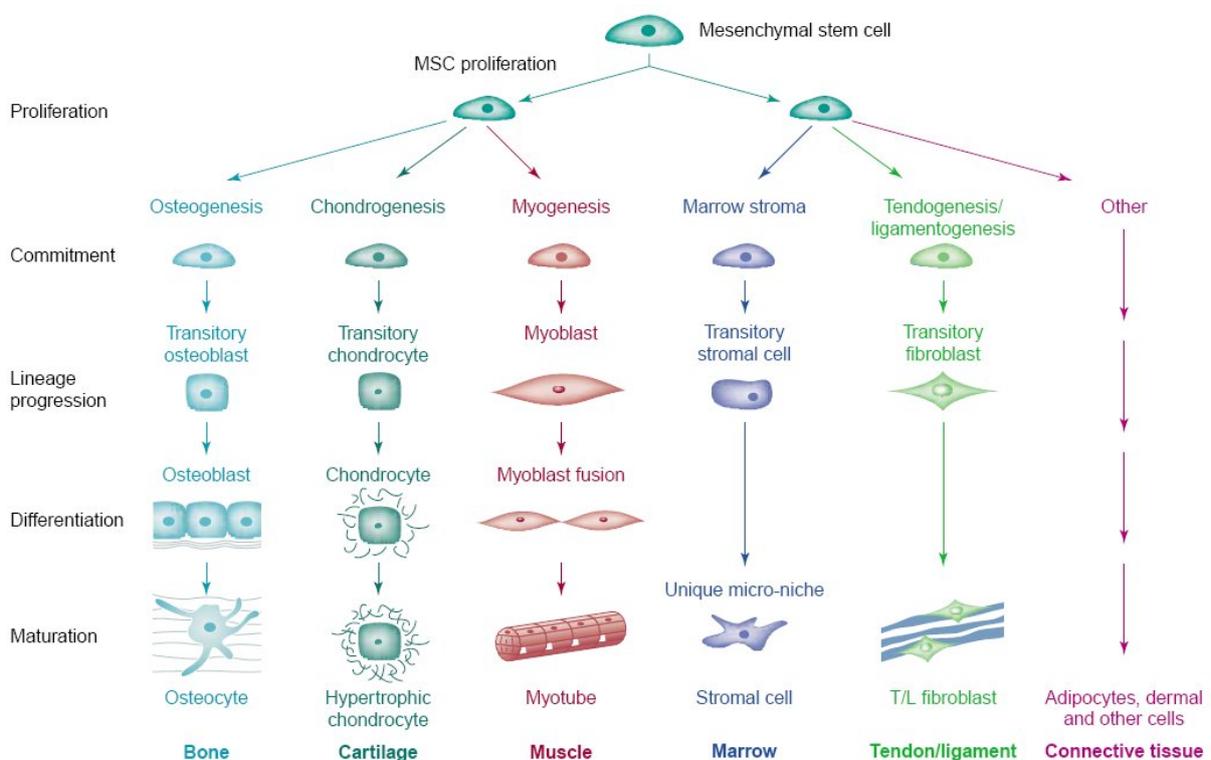


Abb. 3 Differenzierungspotential mesenchymaler Stammzellen

Vereinfachte schematische Darstellung des schrittweisen zellulären Übergangs von der mesenchymalen Stammzelle zum differenzierten, ausgereiften Phänotyp. Nach Caplan et al. 2001³⁰.

Das Expressionsprofil humaner MSC wurde erstmals von Pittenger et al. 1999 charakterisiert. Dabei zeigte er, dass MSC negativ für die hämatopoetischen Marker CD34 und CD45 sind, aber in hohem Maße CD29 (Integrin-β1), CD44 (Hyaluronsäurerezeptor), CD73 (ecto-5'-nucleotidase), CD90 (thymocyte differentiation antigen 1), CD105 (Endoglin) und CD106 (vascular cell adhesion molecule-1) exprimierten¹³⁰. Später erfolgte der Nachweis der Expression von CD9 (Tetraspanin-29), CD81 (Tetraspanin-29), CD271 (Neurotrophin Rezeptor) und Stro-1 (ein Glykoprotein) auf MSC, wobei sie negativ für CD117 (C-kit-Rezeptor) und CD133 (Prominin 1) waren^{9, 27, 40, 79}.

Aufgrund der Vielzahl von Beschreibungen unterschiedlicher MSC aus dem Knochenmark hat das Stammzellkomitee der Internationalen Gesellschaft für Zelltherapie (ISCT) 2006 Minimalkriterien für MSC definiert⁴⁵. Danach müssen die Zellen auf Plastik adhären, die Oberflächenproteine CD105, CD73 und CD90 exprimieren, dabei aber negativ für die hämatopoetischen Marker CD45, CD34, CD14 und HLA-DR sein. Weiterhin müssen sie in Osteoblasten, Chondroblasten und Adipozyten differenzierbar sein. Zusätzlich erfolgte die Isolierung von Zellen mit diesen oder ähnlichen Eigenschaften aus anderen adulten Geweben wie Zahnmark, Nabelschnurblut, Muskel- und Fettgewebe, oder Pankreas^{5, 62, 105, 145, 180, 189}. Aufgrund ihrer Eigenschaften wurden diese Zellen ebenfalls als adulte mesenchymale Stammzellen bezeichnet. Bisher existiert für mesenchymale Stammzellen aus den verschiedenen adulten Geweben kein einheitlicher spezifischer Marker, weshalb die meisten beschriebenen Zellisolierungen unterschiedliche Vorläufer- und Stammzellpopulationen darstellen und ihr Vergleich schwierig ist. Zellen mit diesen Eigenschaften könnten als Überrest der Embryonalentwicklung zur Aufrechterhaltung der Gewebe und zu Regenerationszwecken über den ganzen Körper verteilt sein.

Pankreatische Stammzellen

Das Pankreas ist eine endokrine und exokrine Drüse, die während der Embryonalentwicklung aus dem endodermalen Darmrohr entsteht. Der exokrine Teil des Pankreas besitzt die Funktion durch die Zellen der Azini Verdauungsenzyme wie Gastrin oder Pepsin zu sezernieren, welche von den epithelialen Gang-Zellen in den Dünndarm geleitet werden. Die endokrinen Zellen der Langerhansschen Inseln (α-, β-, δ- und PP-Zellen) sezernieren die Blutzuckerspiegel regulierenden Enzyme Glukagon und Insulin

sowie die Verdauungsenzyme regulierenden Somatostatin und pankreatisches Polypeptid.

Die häufigste Störung im Pankreas, die Insuffizienz der Insulin-Produktion mit dem Krankheitsbild Diabetes betrifft weltweit 200 Millionen Menschen ¹⁵³. Trotz der therapeutischen Gabe von Insulin leiden diese Menschen an den Auswirkungen von Diabetes wie Retinopathie, Nephropathie, Neuropathie, Arteriosklerose und Herzkrankheiten. Eine mögliche Lösung dieser Probleme stellt die erfolgreiche Transplantation der β -Zellen enthaltenden Langerhansschen Inseln dar. Diese ist aber aufgrund des Spendermangels für eine so große Anzahl von Menschen nicht zu realisieren. So richtete sich die Hoffnung in den letzten Jahren auf die Regenerative Medizin und somit die Stammzellen. Die bei Diabetes Typ 1 zerstörten Insulin-bildenden β -Zellen der Langerhansschen Inseln könnten dabei durch potente selbsterneuernde Stammzellen ersetzt werden, in der Hoffnung, dass diese in der Nische der Langerhansschen Inseln in β -Zellen differenzieren. Alternativ könnten Stammzellen *in vitro* zu Insulin-produzierenden β -Zellen differenziert werden, um anschließend in die Langerhansschen Inseln transplantiert zu werden.

Aus endodermalen Geweben wie dem exokrinen und endokrinen Teil des Pankreas, der fötalen Leber oder dem Magen-Darm-Trakt konnten adulte Stammzellen zwar isoliert, aber bisher nur *in vitro* zu Insulin-produzierenden Zellen differenziert werden ^{6, 18, 97, 183}. Darüber hinaus waren auch adulte Stammzellen aus dem Knochenmark in der Lage, *in vitro* zu Insulin-produzierenden Zellen zu differenzieren bzw. nach deren Transplantation in diabetische Mäuse deren Hyperglykämie zu lindern ^{70, 76}. Diese Studien zeigen das große Potential der adulten Stammzellen. Vor deren klinischer Transplantation stellt aber weiterhin die Generierung Insulin-produzierenden Zellen in ausreichender Menge sowie deren Differenzierung in reife β -Zellen eine Herausforderung dar. Kann dies erreicht werden, gilt es, die Funktion der generierten β -Zellen *in vivo* zu gewährleisten sowie deren Abstoßung und autoimmunologische Zerstörung zu verhindern ¹⁵³.

Bisher ist unklar, ob für den endokrinen oder exokrinen Teil sowie für das Gangepithel eine gemeinsame pankreatische Stammzelle existiert. Auf der Suche nach der pankreatischen Stammzelle wurden Zellen aus verschiedenen Teilen des Pankreas wie dem Gangepithel ^{55, 144, 145}, den exokrinen Azini ^{101, 102} und den Langerhansschen Inseln ^{144, 156, 184, 190} anhand unterschiedlicher Marker und Methoden isoliert. Einige der

isolierten Populationen besitzen gemeinsame Eigenschaften wie das Oberflächen-Expressionsprofil von mesenchymalen Stammzellen^{56, 81, 145, 184}, die Expression von Nestin^{56, 81, 144, 156, 157, 190}, die Fähigkeit in Hormon-sezernierende Zellen^{55, 144, 157, 184, 190} oder in Zelltypen der drei embryonalen Keimblättern zu differenzieren^{35, 52, 56, 101, 144, 145}. Weitere Marker, mittels derer Vorläuferzellen aus dem Pankreas isoliert wurden, sind Zytokeratine, PDX-1 (pancreatic and duodenal homeobox 1), β -Galaktosidase, Tyrosine Hydroxylase, Glukose Transporter Typ 2 oder Neurogenin 3^{11, 19, 121, 127, 143, 160}. Die anhand der jeweiligen Marker isolierten Zellen konnten *in vitro* expandiert und in unterschiedliche Zelltypen des Pankreas differenziert werden. Die zahlreichen Studien über Zellen, die aus dem Pankreas isoliert wurden, deuten darauf hin, dass es verschiedene pankreatische Stamm-/Vorläuferzellen gibt. Ob es eine übergeordnete Stammzelle und einen entsprechenden spezifischen Marker im Pankreas gibt, ist bisher unklar. Aufgrund der Differenzierung in die drei Keimblätter sowie des Oberflächen-expressionsprofils, scheinen die pankreatischen Stammzellen mit Eigenschaften ähnlich den mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark am potentesten zu sein.

Speicheldrüsen-Stammzellen

Säugetiere besitzen mit den Ohr-, Unterkiefer- und Unterzungspeicheldrüsen drei große Speicheldrüsen und zusätzlich noch mehrere kleine. Speicheldrüsen sind exokrine Drüsen, die aus azinären Zellen, die den Speichel produzieren, und epithelialen Gangzellen bestehen. Die Gangzellen entlassen den produzierten Speichel, welcher Verdauungsenzyme enthalten kann, in den Mundraum. Während der Embryogenese entstehen die Speicheldrüsen wie das Pankreas aus dem endodermalen Darmrohr.

Speicheldrüsen-Stammzellen (SGSC) wurden bisher aus der Maus, der adulten und neonatalen Ratte sowie dem Menschen isoliert. Wie bei den pankreatischen Stammzellen fehlt allerdings auch hier ein Marker, der eine einheitliche Speicheldrüsen-Stammzelle definiert. Die isolierte Nager-Zellen wurden als hochproliferativ beschrieben und differenzierten in hepatische und endokrin pankreatische Zelltypen^{72, 93}. Humane Vorläuferzellen aus der Ohr- und Unterkieferspeicheldrüse konnten in endokrine pankreatische Richtung⁸⁰, oder in mesenchymale Richtung differenziert werden^{56, 136} oder zeigten ein Oberflächen-Expressionsprofil ähnlich dem mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark^{56, 136, 140}. Andere SGSC bildeten nach Injektion in Thymus-aplastische Mäuse azinäre Drüsenstrukturen sowie das Verdauungsenzym Amylase¹⁴⁰.

Nach einer Strahlentherapie im Kopf-Hals-Bereich leiden Patienten durch die therapiebedingte irreversible Zerstörung der regenerationsunfähigen Speicheldrüsen oft an einer ausgeprägten Mundtrockenheit. Die Eigenschaft von Speicheldrüsen-Stammzellen, Enzym sezernierende Drüsenstrukturen zu bilden, könnte für mögliche therapeutische Anwendungen bei der Regeneration zerstörter Speicheldrüsen hilfreich sein.

1.2.4 Embryonale Stammzellen versus adulte Stammzellen

Die Ergebnisse der verschiedenen Stammzellstudien der letzten Jahre zeigen die hohe Potenz embryonaler und adulter Stammzellen. Sie unterscheiden sich aber anhand wesentlicher Merkmale und Eigenschaften. Humane embryonale Stammzellen (hES), isoliert aus Blastozysten, sind pluripotent, d. h. sie können *in vitro* in alle Zelltypen differenzieren und sogar in Keimbahnzellen. Zur Unterdrückung ihrer stark ausgeprägten spontanen Differenzierung müssen sie mit murinen embryonalen Fibroblasten kultiviert werden. Ungeachtet dessen treten bei ihrer Kultivierung spontan differenzierte Zellbereiche auf, welche täglich beseitigt werden müssen. Werden humane embryonale Stammzellen in Mäuse injiziert, transformieren sie und bilden maligne Tumore. Diese Eigenschaft sowie die Immunverträglichkeit durch ihre allogene Verwendung erschwert die therapeutische Nutzung humaner embryonaler Stammzellen. Weiterhin sind hES aufgrund der Co-Kultivierung mit MEF mit murinen Viren kontaminiert, was ebenfalls ihre therapeutische Verwendung verhindert. Nicht zuletzt ist ihre Herkunft, die menschliche Blastozyste, ethisch bedenklich und gesellschaftlich umstritten. Zur Erforschung grundlegender Vorgänge in Stammzellen wie z. B. der Fähigkeit zur Selbsterneuerung oder Differenzierungsprozesse stellen hES jedoch ein konkurrenzloses Studienobjekt dar.

Im Gegensatz zu den hES können adulte Stammzellen aus fast allen adulten Geweben für autologe Therapien gewonnen werden und zeigen bisher kein malignes Verhalten *in vivo*. Ihr Differenzierungspotential *in vitro* variiert, abhängig vom Gewebe und den Kultivierungsbedingungen von uni- bis pluripotent. Die meisten adulten Stammzellen besitzen im Vergleich zu hES eine kürzere Lebenszeit *in vitro*¹³². Die Kultivierung von adulten Stammzellen erfolgt auf Polystyrol-Oberflächen, welche mit Proteinen, meist Proteine der extrazellulären Matrix, beschichtet werden (Tab. 1). Da bisher aber keine spezifischen Marker für adulte Stammzellen bekannt sind, müssen bei jeder Isolierung

aus neuen Quellen (Geweben) mit neuen Isolierungs- oder neuen Kultivierungsmethoden die Zellen ausführlich charakterisiert werden.

Durch die unterschiedliche Kultivierung der embryonalen und adulten Stammzellen ist unklar, welche Eigenschaften der Zellen allein auf die Kultivierungsbedingungen zurückzuführen sind. Bei der Kultivierung der hES geben die MEF neben den Faktoren, die die spontane Differenzierung unterdrücken, zusätzlich auch andere lebenswichtige Faktoren ab.

Tab. 1 Eigenschaften humaner embryonaler und humaner adulter Stammzellen

Merkmale	humane embryonale Stammzellen	humane adulte Stammzellen
Isolierung	aus der inneren Zellmasse von Blastozysten	aus vielen adulten Geweben
Kultivierung	Unterdrückung der spontanen Differenzierung durch die Kultivierung mit murinen embryonalen Fibroblasten, Mediumzusätze: fötales Kälberserum	auf Polystyrol, teilweise mit Protein-Beschichtungen, Mediumzusätze: fötales Kälberserum, teilweise Wachstumsfaktoren
Differenzierung	Spontane Differenzierung im „embryoid body“, Dissoziation des „embryoid bodies“, Verstärkung der spontanen Differenzierung durch Kultivierung mit unterschiedlichen Faktoren	Induktion der Differenzierung durch Kultivierung mit unterschiedlichen Faktoren
Potenz	pluripotent	uni- bis pluripotent
Marker	Oct-4 und Nanog, Telomeraseaktivität	keine spezifischen Marker bekannt
Transformation	<i>in vivo</i> tumorinduzierend	keine Transformation <i>in vivo</i>
mögliche Verwendung	allogen	autolog

Die Frage nach der besseren Eignung der adulten oder embryonalen Stammzellen für die regenerativen Therapien oder das Tissue Engineering ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht zu beantworten. Vorstellbar wäre aber der Einsatz beider, adulter und embryonaler Stammzellen. So könnten embryonale Stammzellen vorzugsweise *in vitro* differenziert und beim Tissue Engineering eingesetzt werden, während autologe adulte Stammzellen eher für die Injektion bevorzugt benutzt werden könnten, um geschädigte Gewebe nach Verletzungen oder Krankheiten zu regenerieren ¹³². Im Unterschied zu den hES wurden humane adulte Stammzellen bereits in ersten klinischen Studien verwendet.

1.3 Regenerative Medizin und Tissue Engineering

Unser Körper verfügt über eine Vielzahl von verschiedenen Stamm- und Vorläuferzellen und damit über ein erstaunlich hohes, aber trotzdem begrenztes Regenerationsvermögen. So werden vor allem in stark beanspruchten Bereichen des Körpers wie der Haut, dem Darm aber auch dem hämatopoetischen System, täglich viele Milliarden funktionelle Zellen aus Stamm- und Vorläuferzellen neu gebildet. Andererseits gibt es aber auch Gewebe wie den Gelenk-Knorpel, in dem keine, oder das Gehirn und das Herz, in denen wenig Regeneration stattfindet. Verletzungsbedingte oder pathologische funktionale Ausfälle in diesen Geweben führen dementsprechend zu erheblichen Einschränkungen des Betroffenen oder im Extremfall zum Tod.

Die Regenerative Medizin befasst sich mit dem Ersatz von geschädigten oder verloren gegangenen Zellen, Geweben oder Organen. Dabei sind die Proliferationskapazität sowie das hohe Differenzierungspotential von Stammzellen hilfreich und für viele Ansätze in der Regenerativen Medizin sogar essentiell.

Dabei können Stammzellen direkt in die geschädigte Region injiziert oder über das Blutgefäßsystem verabreicht werden, um in die geschädigte Region zu gelangen. Dort können die Stammzellen durch Proliferation, Differenzierung oder Zellfusion geschädigte Zellen ersetzen, womit im optimalen Fall auch verloren gegangene Funktionen wiedererlangt werden. Diese Art der Zelltherapie wird im Fall von Infarkten (Herzinfarkt, Schlaganfall) oder bei Leukämien durch die Knochenmarktransplantation angewandt. Nach Herzinfarkten wurden in klinischen Studien vor allem Vorläuferzellen aus dem Knochenmark (bone marrow plasma cells - BMPC) intrakoronar injiziert. So wurden in der deutschen klinischen Studie (BOOST) innerhalb einer Woche nach einem Herzinfarkt 30 Patienten mit autologen BMPC behandelt, während 30 Patienten mit herkömmlicher Methode behandelt wurden. Nach 6 Monaten konnte mit Hilfe der Magnetresonanztomographie in der mit BMPC behandelten Gruppe eine geringe, aber signifikante Erhöhung des Auswurfvolumens des linken Ventrikels festgestellt werden ⁷⁹. Aufgrund der Erhöhung des Auswurfvolumens in der Kontrollgruppe innerhalb der folgenden 12 Monate, konnte nach insgesamt 18 Monaten kein signifikanter Unterschied zwischen der BMPC und der Kontrollgruppe festgestellt werden ⁸⁰. Diese Ergebnisse deuten auf eine schneller ablaufende Selbstheilung, z. B. durch die Abgabe bestimmter Faktoren der BMPC, des Infarktbereichs in der BMPC behandelten Gruppe hin. Auch in anderen klinischen Studien wie REPAIR AMI oder ASTAMI konnte keine Erhöhung des

Auswurfvolumens des linken Ventrikels festgestellt werden. Positive Auswirkungen der BMPC Injektionen nach Herzinfarkt waren eine verringerte Infarktgröße sowie eine verbesserte Herzwandbewegung⁷⁷.

Die Idee des Tissue Engineerings ist die Generierung von Körperteilen und Organen *ex vivo*. Dies reicht von der Herstellung artifizierlicher Herzklappen über die Konstruktion von nasalem Knorpel bis zum kompletten Organersatz wie der Harnblase¹⁰⁷. Aufgrund der alternden Gesellschaft erhöht sich die Zahl degenerativen Krankheiten, womit das Tissue Engineering in den Mittelpunkt der Regenerativen Medizin rückt. Eine dieser degenerativen Erkrankungen ist die nicht therapierbare Osteoarthritis. Dabei waren Patienten bisher meist auf ein künstliches Ersatzgelenk angewiesen. Eine Alternative bietet die Transplantation von Chondrozyten in den Gelenkbereich²². Dabei wird arthroskopisch autologer Knorpel entfernt, daraus werden Chondrozyten isoliert und *in vitro* vermehrt. Anschließend werden die Chondrozyten in den erkrankten Knorpel injiziert. Mit dieser Methode wurden seit 1987 bereits hunderte von Patienten behandelt²³. Das begrenzte Angebot an autologen Chondrozyten sowie die vielen Komplikationen bei der Gewinnung des autologen Knorpels sind jedoch wesentliche Nachteile dieser Methode. Deshalb könnten Stammzellen mit ihrer hohen Proliferationskapazität und Differenzierungspotential zur Regeneration des Knorpels benutzt werden. Bisher konnte die Heilung von Knorpelschäden mit adulten Stammzellen jedoch nur im Tiermodell gezeigt werden¹⁶⁹.

Ähnliche Ansätze werden auch bei Krankheiten oder Verletzungen des Knochens verfolgt. Ist der zu regenerierende Bereich im Knochen größer als die Regenerationsfähigkeit der ansässigen Zellen, können dreidimensionale Trägermaterialien wie Hydroxyapatit oder Trikalziumphosphat, welche mit mesenchymalen Stammzellen bewachsen sind, in den zu regenerierenden Bereich transplantiert werden (Abb. 4). Vor Ort differenzieren die Stammzellen dann zu Osteoblasten, produzieren Proteine der extrazellulären Matrix, sorgen für deren Kalzifizierung und damit für Knochenaufbau¹⁵.

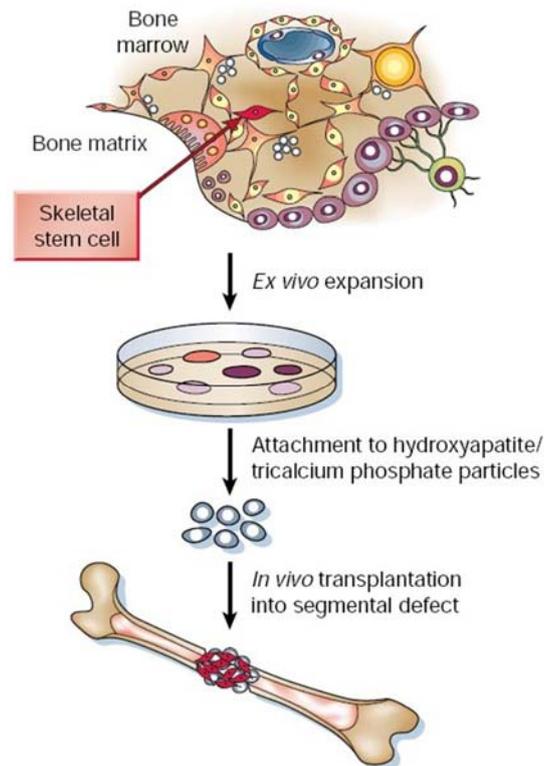


Abb. 4 Möglicher Einsatz von Stammzellen in der regenerativen Medizin

Beispielhaft und schematisch ist eine mögliche Anwendung von adulten Stammzellen bei der Regeneration von Knochen dargestellt. Nach der Isolierung und der Expansion der Stammzellen werden diese auf einer Matrix in die geschädigte Region gebracht. Dort differenzieren die Stammzellen zu Osteoblasten und regenerieren den geschädigten Knochen. Nach Bianco et al. 2001 ¹⁵.

1.4 Gerichtete Differenzierung

1.4.1 Fettgewebe und adipogene Differenzierung

Nahezu alle Lebewesen, einschließlich Pflanzen, Tieren aber auch Hefen und Prokaryonten, speichern neutrale Lipide in Form von Lipidtropfen. Da Lipidtropfen eine Rolle bei der Membransynthese, im Cholesterinmetabolismus, dem Lipidtransport und dem Energiehaushalt zukommt, kommen Lipidtropfen in den meisten Zellen zu einem bestimmten Zeitpunkt ihrer Entwicklung vor. Beim Menschen haben Fehlfunktionen bei der Lipidspeicherung Krankheiten wie Fettleber, Fettleibigkeit, Arteriosklerose und Diabetes Typ 2 zur Folge. Zelltypen, in denen Lipidspeicherung eine herausragende Rolle spielt, sind Hepatozyten in der Leber, Enterozyten im Darm, Adipozyten im Fettgewebe und Steroid-bildende Zellen in Ovarien, Hoden und der Nebenniere. Lipidtropfen bestehen aus einem Kern neutraler Lipide, umgeben von einem Monolayer aus Phospholipiden, welche mit membranständigen Proteinen durchzogen sind ¹¹⁶.

In den Adipozyten des Fettgewebes dient die Lipidspeicherung vor allem der Langzeitspeicherung von Energie. Dabei wird zwischen weißem und braunem Fettgewebe unterschieden. Braunes Fettgewebe dient neugeborenen Säugetieren und Winterschläfern zur Thermogenese, während weißes Fettgewebe als Energiespeicher dient. Die Entstehung von weißem Fettgewebe beginnt beim Menschen bereits vor der Geburt. Direkt nach der Geburt beginnt dessen Expansion durch Zunahme des Volumens und der Anzahl der Adipozyten³⁹. Ohne den genauen entwicklungsbiologischen Ursprung der Adipozyten zu kennen, wird angenommen, dass die Adipozyten-Linie von embryonalen Stammzellvorläufern mit der Kapazität in die mesodermalen Zelltypen Adipozyten, Chondrozyten, Osteoblasten und Myozyten zu differenzieren, abstammen⁶⁰. Durch die Erkenntnisse, dass Adipozyten des weißen Fettgewebes Faktoren sezernieren, welche bei der Immunantwort, Gefäßkrankheiten und Appetit-Regulation beteiligt sind, wird die Rolle des weißen Fettgewebes komplexer und dynamischer.

In vitro erfolgte die Studie der zellulären und molekularen Mechanismen der adipogenen Differenzierung vor allem an Kulturen von Präadipozyten, wie z. B. den aus murinen embryonalen Fibroblasten entstandenen 3T3-L1-Zellen^{57, 58}. Dazu wurde eine Vielzahl von Protokollen mit unterschiedlichen Mediumzusätzen entwickelt. Die Hauptindikatoren der adipogenen Differenzierung sind Glukokortikoide wie das künstliche Dexamethason, IBMX (Isomethylbutylxantin), ein Phosphodiesterase Inhibitor, IGF-1 (insulin-like growth factor) und Insulin. Wobei Dexamethason den Transkriptionsfaktor C/EBP- β (CCAAT/enhancer binding protein β) aktiviert und IBMX die Phosphodiesterase inhibiert, was zu einer Erhöhung von intrazellulärem cAMP führt und ebenfalls zur Aktivierung von C/EBP- δ . C/EBP- β und - δ aktivieren ihrerseits C/EBP- α und PPAR- γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ). C/EBP- α und PPAR- γ beeinflussen den Wachstumsstillstand der Präadipozyten, der Voraussetzung für die Differenzierung zu reifen Adipozyten ist^{2, 166}. Weiterhin aktivieren diese Transkriptionsfaktoren Adipozyten-spezifische Gene und dienen gleichzeitig als frühe Marker der adipogenen Differenzierung. Die Bindung von Insulin an seinen Rezeptor löst mehrere Kinase-Kaskaden, eine Serie von Phosphorylierungen aus und führt zur Aufnahme von Glukose in die Zelle (Abb. 5).

In der frühen Adipozytendifferenzierung werden Lipidtropfen vom endoplasmatischen Retikulum abgeschnürt. Lipidtropfen sind Triglyzeridkörper, welche an der Oberfläche

von dem Protein ADRP (adipose differentiation-related protein) umgeben sind ²¹. Während der weiteren Differenzierung wird ADRP durch Perilipin ersetzt ⁵⁹. Dabei übernimmt Perilipin mehrere Funktionen. Perilipin spielt zum einen eine Rolle bei der Lipidtropfen Entstehung, regelt aber auch die Lipolyse. Als umhüllende Schicht schützt Perilipin die Lipidtropfen vor Lipolyse, kann aber nach hormoneller Aktivierung zur Lipidmobilisierung, Lipasen den Zugang zu den Triglyzeriden erlauben. Im Laufe der weiteren adipogenen Differenzierung vereinigen sich die Lipidtropfen und können dadurch eine Größe von 100 μm erreichen ¹¹⁶. Damit dient Perilipin zusammen mit dem Fettsäure-bindenden aP2 (adipocyte protein 2) als Marker der späten adipogenen Differenzierung ^{59, 135}.

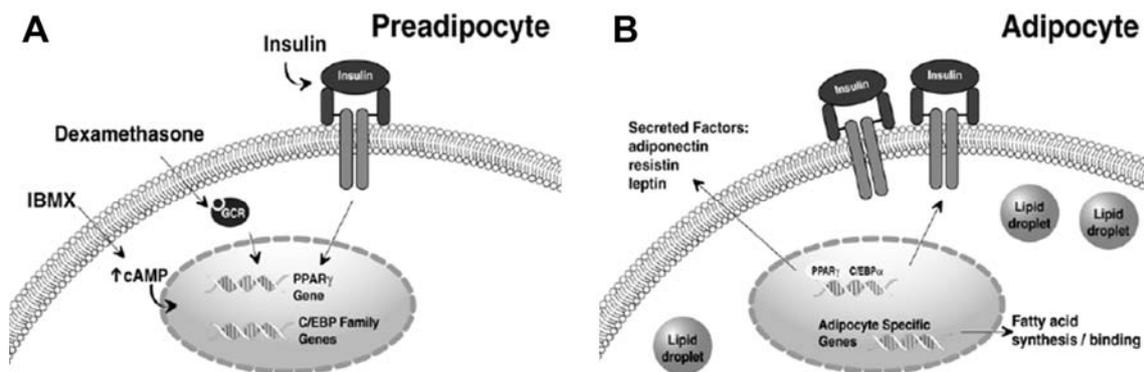


Abb. 5 Regulation der Adipogenese

Mit den Zusätzen IBMX, Dexamethason und Insulin können Stammzellen oder Präadipozyten zur adipogenen Differenzierung stimuliert werden. Dabei erhöht IBMX, als Phosphodiesterase Inhibitor, den intrazellulären cAMP Spiegel, Dexamethason bindet an den Glukokortikoid-Rezeptor und Insulin an den Insulin Rezeptor, wodurch die Transkriptionsfaktoren für Adipozyten-spezifische Gene, wie PPAR γ und C/EBP Familie, aktiviert werden (A). Diese Adipozyten-spezifischen Gene codieren sezernierte Faktoren, Insulin Rezeptoren und Proteine welche, bei der Synthese und Bindung von Fettsäuren beteiligt sind. Von Chemicon International, www.millipore.com.

1.4.2 Knorpel und chondrogene Differenzierung

Knorpelgewebe zeichnet sich durch seine hohe Druck- und Biegeelastizität aus und bildet zusammen mit Knochen eine besondere Form des Bindegewebes, das Stützgewebe. Knorpel besteht aus Chondrozyten und der wassereinlagernden Interzellulärschubstanz (extrazelluläre Matrix). Die extrazelluläre Matrix setzt sich aus einem Netzwerk von Kollagen zusammen, in das Proteoglykan-Aggregate eingelagert sind. Die Proteoglykane bilden das Kernprotein, an welchem federartig Glykosaminoglykane wie Chondroitinsulfat, Heparinsulfat und Keratansulfat kovalent gebunden sind. Hunderte

dieser Strukturen sind über Verbindungs-Proteine ebenfalls federartig an Hyaluronsäure gekoppelt und bilden zusammen Aggregate, die bis zu 5 µm lang werden können (Abb. 6).

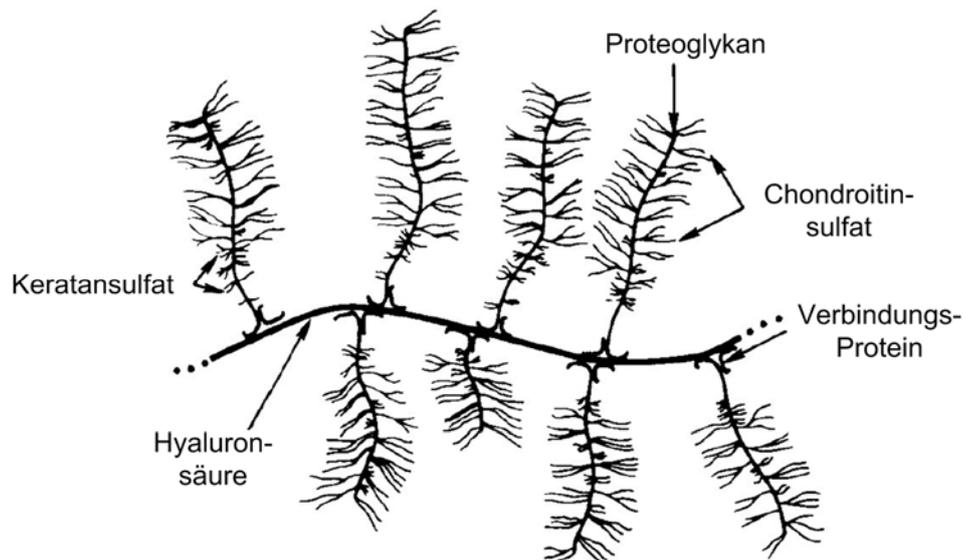


Abb. 6 Aufbau eines Proteoglykan Aggregats

Schematische Darstellung eines Proteoglykan-Aggregats der extrazellulären Matrix. Proteoglykane bilden zusammen mit Glykosaminoglykanen (Chondroitinsulfat, Heparinsulfat oder Keratansulfat) Untereinheiten, welche über Verbindungs-Proteine an ein zentrales Hyaluronsäure-Filament gebunden sind. Aus Buckwalter et al. 1983 ²⁶.

Generell wird anhand der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix zwischen elastischem Knorpel, Faserknorpel und hyalinem Knorpel unterschieden. Der elastische Knorpel besitzt wenig Kollagen und zusätzlich noch elastische Fasern in Form von Netzen. Er kommt z. B. in der Ohrmuschel vor. Der in Zwischenwirbelscheiben oder in Gelenkzwischen Scheiben vorkommende Faserknorpel enthält wenig Proteoglykane, viele Kollagenfasern und ist somit weniger elastisch als die anderen beiden Formen. Die häufigste Knorpelart ist der als Gelenkknorpel, Rippenknorpel sowie als Knorpelgewebe des Atemtrakts vorkommende hyaline Knorpel. Er besteht aus einer homogenen Matrix, in die Kollagen Typ 2-Fibrillen eingelagert sind.

Während der Embryonalentwicklung entstehen Chondrozyten aus Chondroblasten und diese aus dicht zusammengedrängten Mesenchymzellen. Dies sind die gleichen mesenchymalen Vorläufer, aus denen auch Osteoblasten, Adipozyten und Myozyten entstehen. Durch das Ausscheiden der extrazellulären Matrix rücken die Chondrozyten in kleinen Gruppen auseinander, der Knorpel wächst interstiziell. Später, beim Erwachsenen, wächst der Knorpel nur noch appositionell, also von seiner Oberfläche

dem zellreichen Perichondrium aus. Das Perichondrium umgibt den Knorpel, ist gefäß- und nervenreich und sorgt über Diffusion für die Ernährung des Knorpels. Da es Gelenkknorpel an Perichondrium fehlt, kann dieser nicht neu gebildet werden und seine Ernährung erfolgt durch die Gelenkflüssigkeit. Knorpel erfährt während des ganzen Lebens einen sehr langsamen Umbau, bei dem Chondrozyten resorptiv wie auch sekretorisch aktiv sind.

Die transkriptionellen Mechanismen, welche die chondrogene Differenzierung regulieren, sind nicht vollständig bekannt. Zwei chondrozyten-spezifische Transkriptionsfaktoren konnten bisher identifiziert werden: SOX9 (sex determining region Y-box 9), ein Mitglied der SOX-Familie, und Scleraxis, ein Mitglied der "basic Helix-Loop-Helix"-Transkriptionsfaktoren^{14, 37}. SOX9 reguliert Kollagen Typ 2, das meistverbreitete Kollagen im Knorpel und verstärkt die Enhancer/Promotor-Aktivität von Aggrecan, das am häufigsten vorkommende Proteoglykan im Knorpel¹⁴⁶. Die SOX9-Expression wiederum wird von Dexamethason, dem synthetischen Glykokortikoid, verstärkt¹⁴⁷.

In vitro fördern die zelluläre Kondensation (Pelletkulturen), in Kombination mit Wachstumsfaktoren wie TGF- β und Hormonen wie Dexamethason die chondrogene Differenzierung. Weitere Faktoren, welche bei der Chondrogenese unterstützend wirken sind L-Ascorbinsäure, das die Proteoglykan Synthese erhöht oder der Serumersatz ITS (Insulin, Transferrin, Selenit), der die Proliferation erhöht. Insgesamt kommt es bei der Chondrogenese darauf an, ein Gleichgewicht zwischen Zellwachstum und der Synthese der extrazellulären Matrix-Proteine zu schaffen³.

Alle drei Isoformen von TGF- β induzieren die Chondrogenese in humanen mesenchymalen Stammzellen. TGF- β 2 und TGF- β 3 sind allerdings effektiver als TGF- β 1, da sie für eine schnellere und stärkere Einlagerung von Glykosaminoglykanen und Kollagen Typ 2 sorgen⁸. Bei der In-vitro-Chondrogenese werden weitere Proteine der extrazellulären Matrix des Knorpelgewebes hochreguliert. Dazu gehören Versican, Fibromodulin, Aggrecan, Decorin, Biglykan und das Link Protein, die zusammen mit Kollagen Typ 2 als chondrogene Marker dienen⁸.

1.4.3 Knochen und osteogene Differenzierung

Der Körper aller Wirbeltiere wird durch ein Skelett aus Knochen gestützt. Knochen bestehen aus Osteoblasten, Osteozyten, Osteoklasten und der Interzellularsubstanz (extrazelluläre Matrix). Diese Zellen produzieren und regulieren die Zusammensetzung

der extrazellulären Matrix. Aufgrund deren Anordnung können Geflechtknochen von den häufiger vorkommenden Lamellenknochen unterschieden werden. Die Osteozyten liegen mit ihren langen Fortsätzen in Knochenhöhlen der extrazellulären Matrix, deren Kollagenfasern durch anorganische Hydroxyapatitkristalle vernetzt sind und damit zur Festigkeit des Knochens beitragen. Die Fortsätze der Osteozyten sorgen für den Kontakt zu den Blutgefäßen und ermöglichen damit einen Nährstoff- und Sauerstoffaustausch. Knochen sind plastisch, d.h. sie unterliegen einem ständigen Abbau durch phagozytierende Osteoklasten und Wiederaufbau durch Osteoblasten. Dabei sezernieren Osteoblasten die organischen Anteile, die Kollagenfasern und andere Proteine. Die Knochen bestehen etwa zu 50 % aus Mineralien, zu je 25 % aus Wasser und organischer Substanz. Der Hauptanteil der Mineralien sind Kalziumverbindungen wie Kalziumphosphat (Kalzium-Hydroxylapatit, Kalzium-Carbonatapatit) und Kalziumkarbonat. Die organische Substanz besteht zum großen Teil aus Kollagen.

Knochen entsteht entweder durch desmale oder durch chondrale Ossifikation. Zu Beginn der desmalen Ossifikation verdichtet sich das Mesenchym, wobei Mesenchymzellen durch Vergrößerung in Knochenvorläuferzellen umgewandelt werden. Nach weiterer Zellvergrößerung, bedingt durch Vermehrung der Zellorganellen und der Ausbildung von Fortsätzen entstehen daraus Osteoblasten. Diese bilden das Osteoid, eine homogene Grundsubstanz, in die Kollagenfibrillen eingelagert werden. Später geben die Osteoblasten Matrixvesikel ab, welche sich auf den Kollagenfasern anlagern und kristallisieren. Dieses verkalkte, faserreiche Bindegewebe wird als Geflechtknochen bezeichnet. Desmale Ossifikation findet bei platten Knochen z. B. im Schädel statt.

Die chondrale Ossifikation, welche typisch für die Entwicklung von Lamellenknochen ist, geht hingegen von einer Knorpelmatrize aus und kann mit den Teilvorgängen perichondrale und enchondrale Ossifikation beschrieben werden. Die perichondrale Ossifikation findet im Bereich der Diaphyse statt. Aus der Knorpelmatrize entsteht, wie bei der desmalen Ossifikation ein Geflechtknochen. Die enchondrale Ossifikation findet dann in dem Bereich zwischen Diaphyse und Epiphyse statt. Diese wird als Umbauzone, Wachstumsfuge oder Metaphyse bezeichnet und lässt sich von der Epiphyse her in vier Zonen gliedern. Auf die aus hyalinem Knorpel bestehende Reservezone folgt die Proliferationszone. Darauf folgt die Reifungszone, in der Blasenknorpel vorliegt. In der anschließenden Verknöcherungszone kommt es zu Kalkablagerungen in den von

Osteoblasten gebildeten Geflechtknochen. Die Räume zwischen den Knochenbälckchen werden von Blutgefäßen und Mesenchym ausgefüllt (Abb. 7).

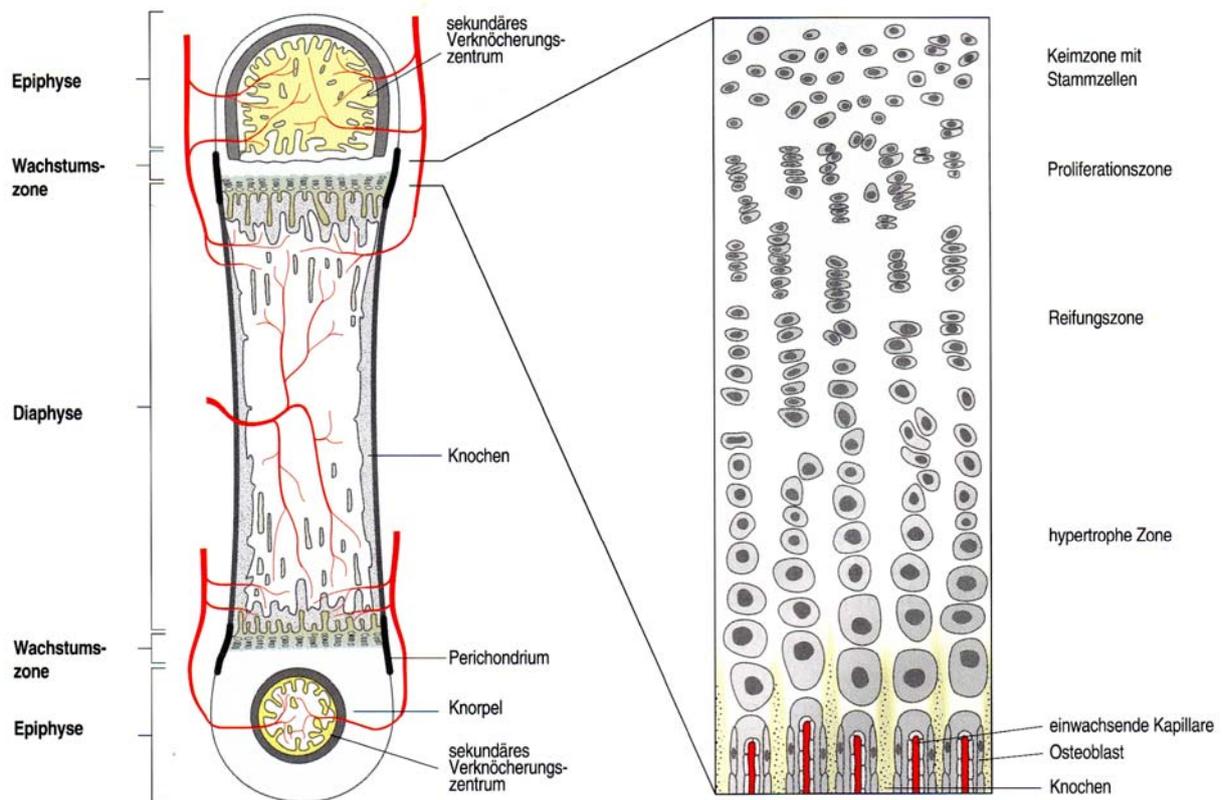


Abb. 7 Knochenaufbau mit Wachstumszone und enchondrale Verknöcherung

Schematische Darstellung eines Längsschnitts durch einen Lamellenknochen von Wirbeltieren. In der Diaphyse hat bereits Knochen den Knorpel ersetzt. Zwischen Epiphyse und Diaphyse befindet sich die knorpelige Wachstumszone, an der weiterhin Knochen hinzugefügt wird. Aus Wolpert 1999 ¹⁷⁶.

Während der Knochenbildung findet also eine Differenzierung von Stammzellen, über verschiedene Vorläuferstadien, bis hin zu den knochenbildenden Osteoblasten statt (Abb. 8). Die transkriptionelle Kontrolle dieser Vorgänge ist kaum verstanden. Eine zentrale Rolle nimmt dabei der Transkriptionsfaktor Cbfa1 (core binding factor alpha 1) ein. Cbfa1 steuert wahrscheinlich das komplexe Zusammenspiel von Genregulation, Einfluss von Hormonen und der Extrazellulären Matrix sowie das Zellwachstum. Der Transkriptionsfaktor Cbfa1 ist Teil der Transkriptorenfamilie Runx/Cbfa/Aml/PEBP α und besitzt eine Runx DNA-Bindestelle. Er ist essentiell für die Knochenbildung *in vivo* und reguliert auch die Osteoblasten-Differenzierung. Die genaue Rolle von Cbfa1 im multifaktoriellen osteogenen Signalweg ist bisher unklar. Allerdings zeigen Cbfa1-defiziente Mäuse keine Knochenbildung und unreife Osteoblasten ohne Osteopontin- und Osteocalcin-Produktion, was die essentielle Rolle von Cbfa1 in der Osteogenese hervorhebt. Osteocalcin ist während der späten Knochenbildung stark exprimiert und

aufgrund der Cbfa1 Bindestellen in seiner Promotorregion wird ein Einfluss von Cbfa1 auf Osteocalcin vermutet. Der Ablauf der osteogenen Differenzierung wird von Wachstumsfaktoren der TGF- β -Familie (transforming growth factor- β) wie BMP-2 (bone morphogenic protein 2) und TGF- β 1, Steroidhormonen wie Dexamethason, $1\alpha,25$ -Dihydroxy-Vitamin D₃ und Östrogenen beeinflusst^{131, 167}. Vor allen den BMPs wird die Fähigkeit zur Induktion der osteogenen Differenzierung zugesprochen^{53, 171}.

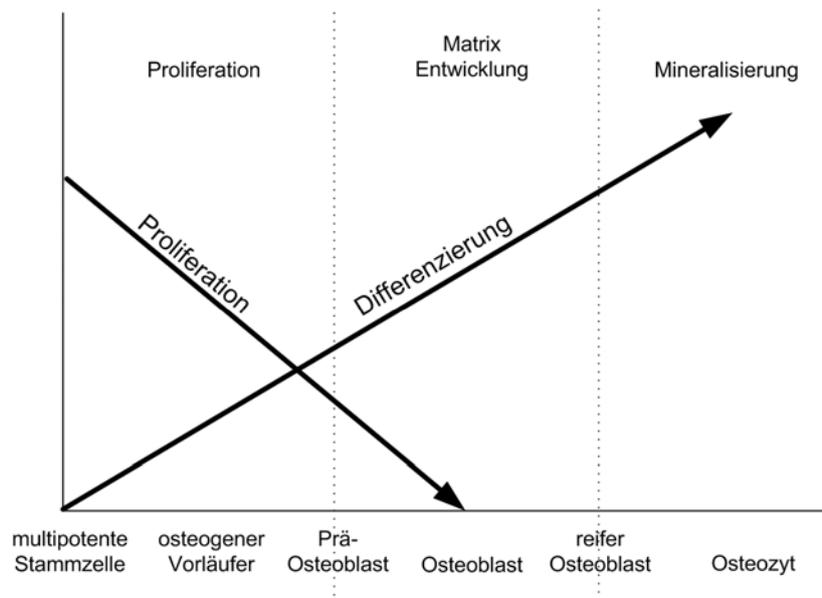


Abb. 8 Verlauf der osteogenen Differenzierung

Die multipotente Stammzelle verliert auf ihrem osteogenen Differenzierungsweg an Potenzial zur Selbsterneuerung und differenziert dabei zum Osteozyten. Nach Owen et al. 1990¹²⁵.

1.5 Transforming Growth Factor- β -Signalweg

Die "Transforming Growth Factor- β "-Familie (TGF- β) setzt sich aus multiplen Formen von Peptiden meist in Form von Wachstumsfaktoren zusammen, welche viele Zellen des Körpers beeinflussen. Abhängig vom zellulären Kontext kann TGF- β die Proliferation der Zelle, deren Differenzierung oder die Synthese der extrazellulären Matrix beeinflussen. So kann TGF- β die Synthese von Kollagen induzieren, als Suppressor der T- und B-Lymphozyten-Aktivität wirken, ein chemotaktisches Agens für Monozyten/Makrophagen sein, oder mitogen auf Osteoblasten wirken. Eine wichtige Rolle nimmt TGF- β auch während der Embryonalentwicklung der Säuger, vor allem bei der Chondrogenese, ein⁷¹.

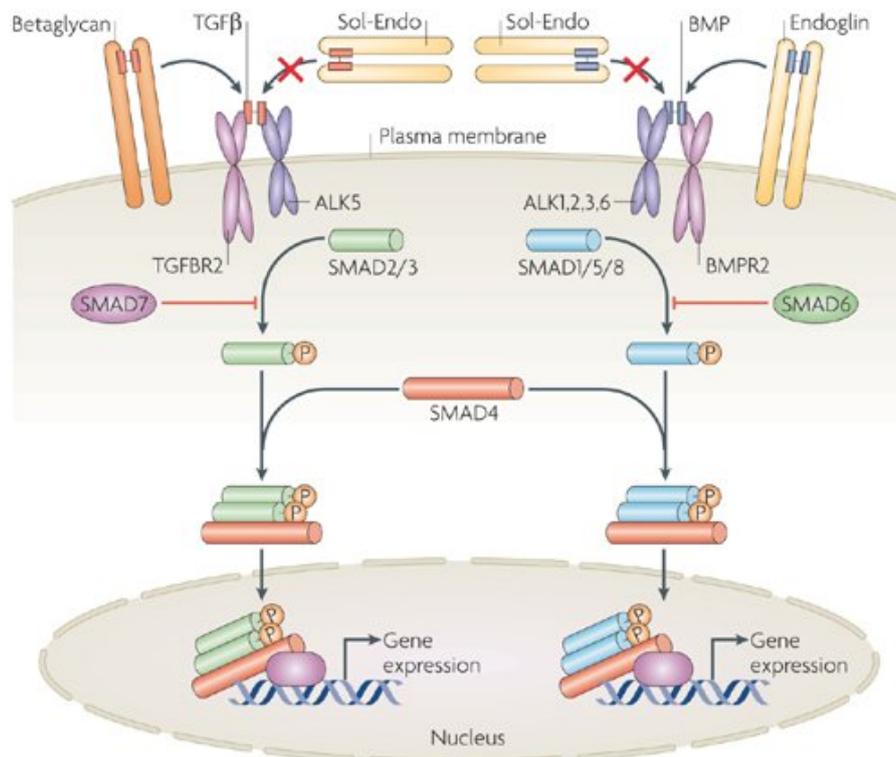


Abb. 9 TGF- β Signalweg

Die Bindung des Liganden (TGF- β , BMP) führt zur Dimerisierung des Rezeptors Typ 2 und Typ 1 und dessen Phosphorylierung. Nach Phosphorylierung der RSMADs (SMAD2/3 oder SMAD1/5/8) kommt es zu einer Konformationsänderung, wodurch die RSMADs frei werden, mit SMAD4 komplexieren und im Kern die Transkription beeinflussen. Je nach Ligand findet die Vermittlung über SMAD2/3 (TGF- β) oder über SMAD1/5/8 (BMP) statt. Aus ten Dijke P. und Arthur H.M. 2007 ¹⁶¹.

Der Prozess des TGF- β -Signalwegs beginnt mit der Bindung eines Liganden (BMP, GDNF, AMH, Aktivin, Nodal, TGF- β) an den Typ 2-Rezeptor, eine Serin/Threonin-Rezeptor-Kinase, welche die Phosphorylierung des Typ 1-Rezeptors katalysiert. Der Typ 1-Rezeptor phosphoryliert Rezeptor-regulierte SMADs (R-SMADs), welche mit Hilfe von SARA an den Typ 1-Rezeptor binden. Durch die Phosphorylierung kommt es zu einer Konformationsänderung, wodurch sich R-SMAD vom Rezeptor/SARA-Komplex löst. Aufgrund der hohen Affinität zu coSMAD bilden R-SMAD und coSMAD einen Komplex miteinander. Der phosphorylierte R-SMAD/coSMAD-Komplex dringt in den Zellkern ein, wo er an Transkriptionsfaktoren oder Cofaktoren bindet und die Transkription von chondrogenen und osteogenen Genen beeinflusst (Abb. 9).

Es gibt zwei intrazelluläre Signalwege, an denen R-SMADs beteiligt sind. Die Liganden TGF- β , Activin, Nodal und einige GDF werden über SMAD2/3 vermittelt, während BMP, AMH und einige GDF SMAD1/5/9 vermittelt sind.

1.6 Zelluläre Seneszenz

Das Altern eines Organismus ist ein irreversibler Prozess, dies gilt auch für einzelne Zellen. Die dem Gewebeerhalt dienenden adulten Stammzellen bewirken durch ihren altersabhängigen Rückgang in der Replikation das Altern des Organismus. Wir altern also, weil unsere Stammzellen aufgrund intrinsischer Faktoren wie DNA-Schäden, aufgrund extrinsischer, umweltbedingter und stochastischer Faktoren altern. Adulte Stammzellen befinden sich im Gewebe in einem Ruhezustand. Sie können aber mittels extrazellulärer Signale in den Zellzyklus zurückkehren. Dann teilen sie sich asymmetrisch in eine Stammzelle, die wieder in den Ruhezustand zurückkehrt und in eine Vorläuferzelle, die über mehrere Zellzyklen somatische Zellen erzeugt. Dieses hierarchische Differenzierungsschema dient dem Gewebeerhalt durch die Produktion hoher somatischer Zellzahlen aus einer einzelnen Stammzelle. Dies ist in Bereichen mit einem hohen Zelldurchsatz wie dem Knochenmark oder dem Darm auch nötig. Gleichzeitig schützt diese Strategie die Stammzelle vor Schäden hoher replikativer Aktivität. Da adulte Stammzellen in ihrem Ruhestadium kaum metabolisch aktiv sind, werden sie auch nicht von den metabolischen Nebenprodukten wie ROS (reactive oxygen species) geschädigt. Um ihre genomische Integrität aufrecht zu erhalten, verfügen adulte Stammzellen über multiple Mechanismen. Treten Mutationen auf, verhindern potente Tumorsuppressor-Mechanismen wie Seneszenz und Apoptose die Weitergabe des malignen Potentials durch limitierte replikative Expansion. Diese Tumorsuppressor-Mechanismen führen zu Stammzellarrest, Stammzellverlust und damit zum Altern eines Organismus. Zelluläre Seneszenz beschreibt den postmitotischen Zustand (Wachstums-Arrest) von metabolisch veränderten, aber aktiven Zellen. Dabei kann zwischen telomerunabhängiger, durch akuten Stress induzierte prämatüre Seneszenz und der telomerabhängigen Seneszenz wie z. B. der replikativen Seneszenz unterschieden werden.

Das Ergrauen von Haaren zum Beispiel, resultiert aus der Abnahme von Melanozyten-Stammzellen ¹²⁰. Die Proliferation der Insulin-produzierenden β -Zellen der Langerhanschen Inseln im Pankreas nimmt ebenfalls im Alter ab und trägt damit, zumindest zu einem Teil, zur Erkrankung Diabetes mellitus Typ 2 bei. Dies steht im Gegensatz zu der bisherigen Annahme, dass Diabetes mellitus Typ 2 eine metabolische Krankheit ist, bei der die altersbedingte Unfähigkeit der Muskel-, Fett- und Leberzellen auf Insulin zu reagieren die Ursache darstellt ¹⁰⁰. Unklar bleibt dabei, welcher Teil des Pankreas altert.

Ist es die β -Zelle selbst, oder eine mögliche pankreatische Stammzelle, oder ein anderes Gewebe, welches die β -Zell-Proliferation beeinflusst ¹⁴⁹.

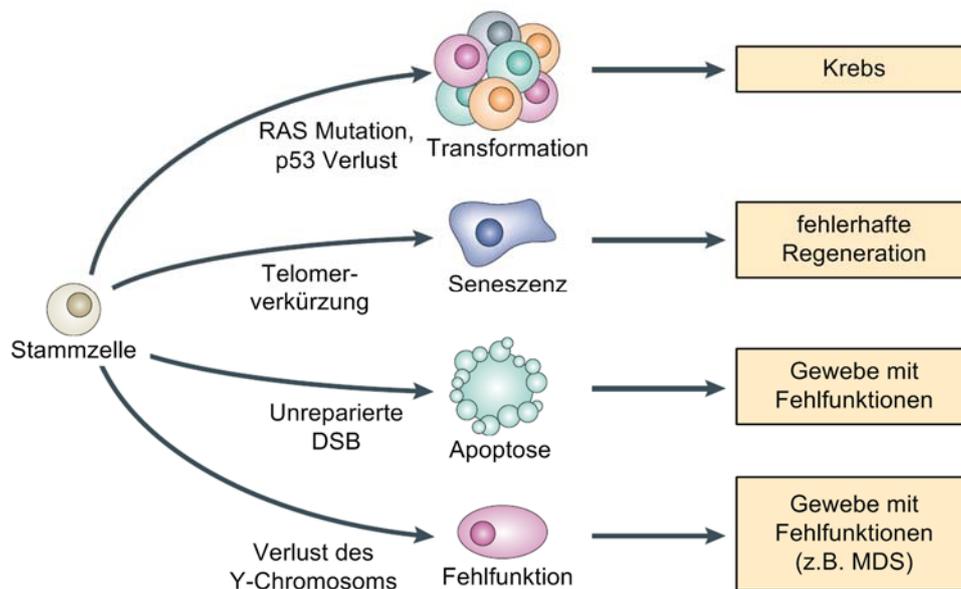


Abb. 10 Veränderung in Stammzellen und ihre Folgen

Mutagene Ereignisse können zu Transformation, Seneszenz, Apoptose und Fehlfunktionen führen. Dabei können Mutationen des Proto-Onkogens RAS und des Tumorsuppressors p53 zu Transformation der Stammzellen und damit zu Krebs führen. Telomerverkürzungen können zu Seneszenz und unreparierte Doppelstrangbrüche (DSB) zu Apoptose führen. Der Verlust des Y-Chromosoms oder des langen Arms des Chromosoms 5 führt zu Fehlfunktionen in hämatopoetischen Stammzellen und z. B. zum Myelodysplastischen Syndrom (MDS). Nach Sharpless und DePinho 2007 ¹⁴⁹.

Obwohl verschiedene Mechanismen, mit denen zelluläres Altern erklärt werden soll, diskutiert werden, beweisen verschiedene unabhängige Studien, dass DNA-Schäden zur Aktivierung von Tumorsuppressor-Mechanismen wie Seneszenz führen und damit Stammzellfunktionen im Alter reduzieren ^{92, 149}. Die Expression von Seneszenz Markern wie SA- β -Galaktosidase und p16 nehmen mit dem Alter in vielen Geweben verschiedener Säuger-Arten zu ⁹⁰. DNA ist täglich spontanen und extrinsischen schädigenden Ereignissen ausgesetzt und trotz einer exzellenten Reparaturkapazität können DNA-Schädigungen auftreten. Nicht reparierte oder ungenau reparierte genomische Schäden akkumulieren über die Zeit im Stammzellkompartiment. Ab einem gewissen Punkt stören die angereicherten Schäden die normale Stammzellbiologie und bringen Stammzellen zur Transformation, Seneszenz, Apoptose oder Fehlfunktion (Abb. 10). Dies hat den Verlust zur Fähigkeit Nachkommen zu erzeugen (Proliferation) oder die Beeinträchtigung des Differenzierungspotentials zur Folge. Auf Dauer können aufgrund dieser Fehlfunktionen die Stammzellkompartimente ihre regenerativen Aufgaben im Gewebe nicht mehr übernehmen und verlieren dadurch ihre selbstregulierenden

Funktionen, was zu Gewebeschäden bzw. deren Funktionsverlust führt. Wenn DNA-Schäden ausgelöst durch Onkogene, akkumulieren, führt die Selbsterneuerung dieser Zellen zur Selektion von Populationen mit diesen Schäden und damit zu Krebs. Deshalb können beide Prozesse, Altern und Krebs als Folge akkumulierter DNA-Schäden in selbsterneuernden Kompartimenten betrachtet werden.

Eine spezielle Form von DNA-Schäden stellt die Telomerverkürzung dar. Die Telomere mit der repetitiven TTAGGG-Sequenz und den assoziierten Proteinen schützen die Chromosomenenden vor Degradierung. Humane Telomere sind ca. 10-15 kb lang. Der Verlust von TTAGGG-Wiederholungen während der Zellteilung auf Grund unvollständiger Replikation der linearen Chromosomen durch die DNA-Polymerase, wird „End-Replikations-Problem“ genannt. In der Abwesenheit adäquater Telomeraseaktivität erfolgt die Telomerverkürzung unaufhaltsam bei jeder Zellteilung, eventuell um eine Veränderung in der Telomerstruktur anzustoßen, welche von der Zelle als DNA-Dopplestrang-Bruch wahrgenommen wird ¹⁴⁹. Wie auch immer, da kritische Telomerlängen zu Chromosomen-Instabilität und Verlust der Zellviabilität führen, wird die Verkürzung von Telomeren als einer der molekularen Mechanismen des Alterns angesehen (Abb. 11). Dies kann durch die Aktivität des Enzyms Telomerase, eine reverse Transkriptase, welche von den Genen TERT (telomerase reverse transcriptase) und TERC (telomerase RNA component) kodiert wird und TTAGGG-Sequenzen an Chromosomenenden anfügt, verhindert werden ⁵⁰. Während der Embryogenese wird das Enzym Telomerase exprimiert und bleibt in Keimbahnzellen, Lymphozyten und frühen Stammzellen aktiv. Somatische Zellen sind aufgrund der nicht vorhandenen Telomerase-expression, daraus resultierende Telomerverkürzung und replikativer Seneszenz auf wenige Populationsverdopplungen beschränkt. Hingegen exprimieren die meisten Krebszellen in hohem Maße Telomerase.

Anti-Krebs-Mechanismen wie Seneszenz und Apoptose, welche auf Telomerverkürzung, der Aktivierung der Tumorsuppressoren p53 und p16 beruhen, scheinen zelluläres Altern zu fördern. Man kann Altern also als Folge einer Ansammlung von Schäden in unseren Stammzellen betrachten, die seneszent oder apoptotisch werden, um nicht Krebs auszulösen ¹⁴⁹. Durch den daraus folgenden Verlust von Stammzellen ist aber die Fähigkeit des Körpers zur Selbsterneuerung eingeschränkt und altert.

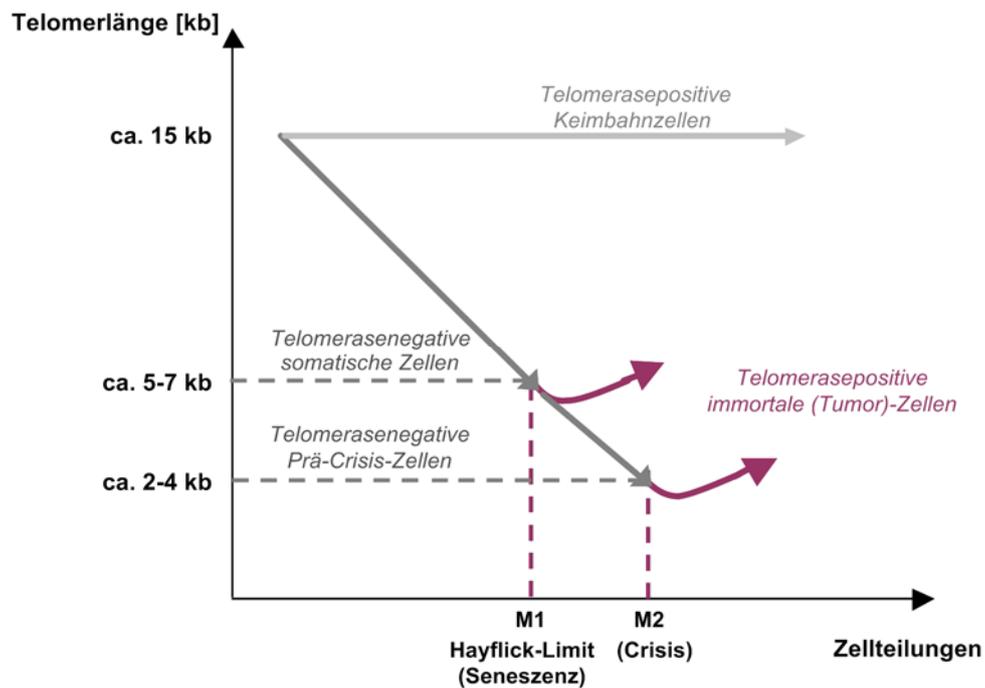


Abb. 11 Telomerhypothese des zellulären Alterns und der Immortalisierung

Telomerase-positive Zellen, wie Keimbahnzellen können ihre Telomere aufrechterhalten, während sich die Telomere Telomerase-negativer somatischer Zellen mit jeder Zellteilung verkürzen. Bei einer kritischen Länge durchlaufen sie die Seneszenz. Durch Aktivierung der Telomerase in somatischen Zellen können diese zu immortalen (Tumor-) Zellen transformieren. Nach Harley et al. 1992⁶⁵.

1.7 Stand der Zellkultur

Die gegenwärtige Zellkultur unter aseptischen Bedingungen und mit zelltypspezifischen Medien gibt es erst seit Mitte des letzten Jahrhunderts. Sie hat sich seitdem zu der am weitesten verbreiteten Ersatztechnik für Tierversuche entwickelt und dient als vielseitiges Werkzeug für die zellbasierte Forschung. Das Verständnis, dass durch die Erforschung grundlegender Vorgänge in der Zelle oder im Zellverband *in vitro* erlangt wird, hat weitreichende Folgen für die Medizin, z. B. bei der Medikamentenentwicklung und bei dem Verständnis von Krankheiten¹⁴¹.

Historisch betrachtet sorgten bereits 1840 Schleich und Schwan mit der Zelltheorie für die Grundlage der Zell- und Entwicklungsbiologie. Bis dahin war die verbreitete Vorstellung bestimmt durch die Präformisten, die davon ausgingen, dass der gesamte Organismus bereits im Spermium oder der Eizelle vorgebildet sei. 1881 vertrat der deutsche Biologe August Weismann die These, dass der Tod deshalb stattfindet, weil ein „abgenutztes Gewebe“ sich nicht selbst erneuern kann, die Selbsterneuerung also begrenzt sei. Seine Überlegungen waren dabei erstaunlich nahe an der heute allgemein akzeptierten Meinung, dass zelluläres Altern (der Stammzellen) zum Altern des

Organismus führt. Weismanns Überlegungen gerieten aber in Vergessenheit. Jahrzehntlang war man der Auffassung, dass, wie von Carrel 1912 postuliert, Zellen in Kultur unbegrenzt teilungsfähig sind³².

Nach den ersten Zellkulturversuchen in Salzlösungen (Roux 1885), gelang es Harrison 1907 tierische Gewebestücke *in vitro* zu kultivieren, allerdings nicht in Medium, sondern in Lymphe. Durch Flemings Erfindung des Penizillins und die Entwicklung komplexer Kulturmedien in den 1940er Jahren durch Earle, Hanks, Eagle, Dulbecco und Ham war der Weg geebnet für die Kultivierung der ersten humanen Zelllinie. Otto Gey isolierte 1952 Zellen aus einem Zervixkarzinom und generierte daraus die erste menschliche Zelllinie (HeLa), die bis heute weltweit kultiviert wird.

Erst 1961 widerlegten Leonard Hayflick und Paul Moorhead Carels Theorie (von 1912) der unbegrenzten Replikationsfähigkeit *in vitro*⁶⁶. Sie entdecken, dass Zellen nach spätestens 50 Verdopplungen *in vitro* sterben (Hayflick-Limit)⁶⁷. Elizabeth Blackburn entdeckte 1978 die Telomere und 1985 die Telomerase^{16, 61}. Und 1990 zeigte Calvin Harley, dass sich die Telomere somatischer Zellen verkürzen und damit zum Hayflick-Limit führen⁶³. Mittlerweile wird davon ausgegangen, dass das Verkürzen der Telomere von Stammzellen auch *in vivo* stattfindet, zum Altern der Zellen und schließlich auch zum Altern des Organismus beiträgt.

Die heutzutage benutzten zellspezifischen Kulturmedien beruhen auf den in den 40er Jahren des letzten Jahrhunderts entwickelten Minimal- und Basalmedien. Die Nährmedien sind so beschaffen, dass es den Zellen Wachstum, Proliferation und Differenzierung sowie die Ausübung typischer Zellfunktionen ermöglicht. Sie enthalten unterschiedliche Konzentrationen von Aminosäuren, Glukose, Vitaminen, anorganischen Salzen, zusätzlich Puffersysteme und pH-Indikatoren. Allerdings ist man bei ihrer Verwendung auf einen Zusatz von Serum angewiesen. Der Anteil von Tiereserum, meist fötales Kälberserum (FKS), macht 3 - 25 % des Mediumanteils aus und ist essentiell z. B. für die Aufrechterhaltung der Proliferation der Zellen *in vitro*. Die genaue Zusammensetzung des Serums ist jedoch nicht bekannt und unterliegt großen Schwankungen.

Der Einsatz von tierischem Serum in der Zellkultur birgt auch die dauerhafte Gefahr der Kontamination mit Mykoplasmen oder Viren. Durch die Nutzung serumfreier Kulturmedien könnten diese Probleme umgangen werden. Deshalb wird seit

Jahrzehnten an der Entwicklung serumfreier Medien gearbeitet. Bisher können aber lediglich bestimmte Zelltypen ohne Einschränkungen serumfrei kultiviert werden. Für die Generierung eines synthetischen Serumersatzes müsste die genaue Zusammensetzung des Tierserums bekannt sein. Zwar enthält synthetisch erzeugter Serumersatz die wichtigen Bestandteile wie Wachstumsfaktoren, Hormone, Adhäsionsmoleküle, Zytokine, Aminosäuren, Proteine und Vitamine, zusätzlich scheinen aber noch andere Faktoren im FKS enthalten zu sein, ohne die der Serumersatz keine breite Anwendung bei der In-vitro-Kultivierung findet.

Die gegenwärtige Technologie der zweidimensionalen In-vitro-Kultivierung von Zellen in Flaschen und Platten berücksichtigt nur unzureichend definierte Zellnachbarschaften und ist durch die technischen Randbedingungen der Fläche limitiert und dominiert. Im Wesentlichen dient sie dem Erhalt und der Vermehrung von Zellen außerhalb des Organismus. Um jedoch spezifische Eigenschaften von Zellen zu erhalten, müssen die Plastikoberflächen mit Gelatine oder Proteinen der extrazellulären Matrix beschichtet werden. Um jedoch Gewebe oder Gewebe-ähnliche Strukturen *in vitro* zu generieren, wie es z. B. für das Tissue Engineering mit Stammzellen versucht wird, bedarf es komplexerer Zellkultursysteme. Eine mögliche Alternative könnte eine dreidimensionale Kultivierungsmethode sein, die Zellnachbarschaften berücksichtigt und daher eher den physiologischen Zuständen *in vivo* entspricht. Ein komplett neuer Ansatz könnte hier die Kultivierung, aber vor allem die Differenzierung von Stammzellen auf flüssig-flüssig Grenzflächen sein. Auf dieser Phasengrenze besitzen Zellen die dreidimensionale Bewegungsfreiheit, die für die Dynamik der Zellkommunikations- und Gewebebildungsprozesse eventuell essentiell sind.

Neben der Oberfläche und dem Mediumzusatz ist auch die Kultivierungsatmosphäre ein wichtiger Aspekt bei der In-vitro-Kultivierung. Üblicherweise werden Zellen in einer Feuchtigkeit gesättigten Atmosphäre mit 5 - 10 % Kohlendioxid und atmosphärischem Sauerstoff (ca. 20 %) bei 37 °C kultiviert. Die hohe Luftfeuchtigkeit verhindert das Verdunsten des Mediums und der Kohlendioxidanteil ist an das Puffersystem des Mediums angepasst. Der Anteil des Sauerstoffs ist aber nicht reguliert, sondern entspricht dem Anteil in der Luft. Der genaue Bedarf der Zellen an Sauerstoff ist zwar nicht bekannt, jedoch ist davon auszugehen, dass die physiologische Sauerstoffkonzentration im Gewebe deutlich geringer ist als bei der Kultivierung mit 20 %.

So konnte für MEF (murine embryonic fibroblasts) und für Rinderfibroblasten gezeigt werden, dass sie sich nach Kultivierung mit einem O₂-Gehalt von 2 - 3 % 5-mal so oft teilten, stabilere Telomere hatten und nicht oder später seneszent wurden, im Vergleich zur Kultivierung mit 20 % O₂ ^{12, 128}. Auch humane Fibroblasten zeigen bei der Kultivierung mit geringerem Sauerstoffgehalt (1, 6 und 12 % O₂) eine durchschnittlich erhöhte Proliferationskapazität von 22 % sowie eine später auftretende Seneszenz ¹³⁷. Die Kultivierung in 20 % O₂ beschleunigt also Seneszenz in humanen Fibroblasten. In einer anderen Studie konnte die Proliferation von einzelnen humanen Fibroblasten nach Zellklonierung in Umgebung mit niedrigem Sauerstoffgehalt gezeigt werden, was bei 20 % O₂ nicht möglich war ⁴⁹. Diese Studien zeigen, dass die üblicherweise benutzten 20 % Sauerstoff zu hoch für die Kultivierung von Fibroblasten *in vitro* sind und wahrscheinlich eine Zelltyp- und Medium-angepasste Sauerstoffkonzentration zur optimalen Kultivierung gewählt werden müsste.

Die Randbedingungen bei der In-vitro-Kultivierung von Zellen, wie die Wachstumsoberfläche, das Serum oder der Sauerstoffgehalt, beeinflussen die Zellen in ihrem Proliferations-, Expressions- und Differenzierungsverhalten ^{47, 148, 154}. Durch die hohe Variation dieser Faktoren in den unterschiedlichen Laboratorien ist der Vergleich der veröffentlichten Ergebnisse zu adulten Stammzellen nur schwer möglich ^{45, 139, 168}. Die Einführung standardisierter Laborbedingungen für die In-vitro-Kultivierung von Stammzellen ist daher unumgänglich.

1.8 Entwicklung einer automatisierten Bildverarbeitung

Ein intensiv untersuchter Differenzierungsweg in adulten Stammzellen ist die Adipogenese, deren grundlegenden biochemischen Prozesse an 3T3-L1 Präadipozyten erforscht wurden ^{60, 135}. Das wesentliche Merkmal der adipogenen Differenzierung ist die intrazelluläre Akkumulation von Lipiden in Form von Tropfen.

Die Quantifizierung der Adipogenese auf molekularer Ebene erfolgt üblicherweise durch die Analyse der Expression adipogen spezifischer Gene mittels real-time PCR oder durch die Quantifizierung der enzymatischen Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase (GPDH) Aktivität ^{31, 126, 174}. Beiden Methoden fehlen jedoch die räumliche Auflösung und die absolute Quantifizierung des Anteils der Adipozyten. Auf zellulärer Ebene können die Lipidtropfen mit fettlöslichen Farbstoffen, wie Oil red O (ORO) oder Nile red, gefärbt und mittels Mikroskopie visualisiert und gezählt, mittels Durchflusszytometrie quantifiziert,

oder wie beim Adipogenesis-Assay der akkumulierte Anteil des Farbstoffs quantifiziert werden^{4, 13, 41, 84}. Von allen Methoden liefert nur die Quantifizierung mittels Durchflusszytometrie eine absolute Differenzierungsrate, während bei der Verwendung des Adipogenesis-Assays, dem GPDH-Assays oder der real-time PCR ausschließlich relative Werte erhalten werden. Aussagen über die Qualität der adipogenen Differenzierung und über die räumliche Auflösung liefern hingegen nur lichtmikroskopische Untersuchungen der gefärbten Zellen. In Bezug auf die statistische Relevanz muss aber, vor allem bei heterogenen Differenzierungen, eine hohe Anzahl von Zellen bewertet werden und somit werden automatisierte Methoden benötigt.

Es gibt nur einige wenige Studien über automatisierte Herangehensweisen für die Charakterisierung und Quantifizierung der adipogenen Differenzierung. Sottile und Seuwen berichten über die Automatisierung des GPDH-Assays, durch den Transfer des gesamten Ablaufs des Assays in Kavitäten von Mikrotiterplatten, wodurch die Quantifizierung des GPDH auch für Hochdurchsatzverfahren geeignet war¹⁵⁵. Koopman et al. beschreibt eine Methode zur automatisierten Quantifizierung von Lipiden in Kombination mit einer Immunfluoreszenz-Gegenfärbung⁹⁹. Dabei wurden die mit ORO gefärbten Zellen mittels Epifluoreszenz-Mikroskopie unter Verwendung eines 540 bis 580 nm Texas red Exzitations-/Emissionsfilters betrachtet. Durch diese Filterung konnte trotz der Verwendung von Graustufenbildern die Hintergrundfärbung, vor allem die der Membranen, effektiv unterdrückt werden. Auch andere Autoren berichten von Hintergrundfärbungen, welche sie durch Modifikation des ursprünglichen Färbeprotokolls, basierend auf Isopropanol als Lösungsmittel, durch das Umstellen auf andere Lösungsmittel wie Propylenglykol und Triethylphosphat umgingen^{99, 109, 134}. Letztendlich wurde jedoch bislang noch kein vollautomatisierter, auf hochauflösenden großflächigen Farbbildern fundierender Ansatz berichtet. Generell mangelt es bei nahezu allen Differenzierungsnachweisen an automatisierten Verfahren, d. h. Nachweismethoden, die frei von subjektiven Eindrücken und Prozessschritten sind.

Eine stabile und verlässliche Methode zur automatisierten Quantifizierung der adipogenen Differenzierung adhärenter Zellen, ohne auf die räumliche Auflösung zu verzichten, fehlt bisher.

1.9 Fragestellung

Adulte Stammzellen sind aufgrund ihres Proliferations- und Differenzierungspotentials hoch interessant für die Regenerative Medizin. Die Möglichkeit der einfachen Isolierung aus verschiedenen Geweben sowie ihre autologe Nutzung machen sie derzeit zu den aussichtsreichsten Kandidaten für eine klinische Nutzung. Stammzellen variieren in ihren Eigenschaften aufgrund der Spender, unterschiedlichen Isolierungs- und Kultivierungsmethoden sowie unterschiedlichen Charakterisierungs- und Differenzierungsprotokollen erheblich. Dies macht den Vergleich der vielen adulten Stammzellpopulationen untereinander sehr schwierig.

Am Anfang der Arbeit wurde als Arbeitshypothese postuliert, dass es sich bei den benutzten humanen Zellen aus Pankreas (hPSC) und Speicheldrüse (hSGSC) um adulte Stammzellen handelt. Um dies zu überprüfen, mussten die hPSC und hSGSC vergleichend charakterisiert werden. Dabei sollten ihr Stammzellpotential anhand von Proliferations-, Genexpressions-, und Proteinexpressionsstudien sowie ihr Differenzierungspotential bestimmt werden. Dazu sollten die hPSC- und hSGSC-Populationen mit den identischen Methoden isoliert und kultiviert sowie mit denselben Protokollen charakterisiert und differenziert werden. Zum Vergleich und der Einordnung der Ergebnisse sollten die humanen mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark als Referenz dienen, da hier auf umfangreiche Literaturdaten zurückgegriffen werden kann.

Um isolierungsbedingte und spenderabhängige Schwankungen bei der Isolation von adulten Stammzellen zu umgehen, sollte der Versuch unternommen werden, eine Stammzelllinie zu generieren, die länger, am besten unbegrenzt *in vitro* kultivierbar ist und dabei trotzdem Stammzeleigenschaften besitzt. Dies sollte durch die stabile Integration der enzymatischen Untereinheit der humanen Telomerase, hTERT, in Speicheldrüsen-Stammzellen (hSGSC) erfolgen. Die Eigenschaften dieser Stammzelllinie wie Proliferationskapazität, Expressionsprofil und Differenzierungspotential sollten in Langzeitstudien untersucht werden.

Gleichzeitig war es das Ziel dieser Arbeit, Problemfelder zu identifizieren und Lösungsansätze zu erarbeiten. Dabei sollten vor allem methodische Verbesserungen, die zum Objektivieren von Ergebnissen beitragen, ermittelt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Reagenzien und Kits	Hersteller
Agar	Becton Dickinson, Heidelberg
Agarose	Peqlab, Erlangen
Alpha-MEM	Invitrogen, Karlsruhe
Alizarinrot S	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Alzianblau 8GX	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ampizillin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Azeton	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
β -Glyzerolphosphat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
BMP-2	Natutec, Frankfurt
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA, Fraktion V	PAA, Marburg
CASYton	Innovatis, Reutlingen
Chloroform	Merck, Darmstadt
DAPI-Reagenz	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
DEPC	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dexamethason	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
DNA-Ladepuffer, 6 \times	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
DNA-Standard, Gene Ruler 50 bp	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
DMEM, 4,5 mg/ml Glukose	Invitrogen, Karlsruhe
DMSO	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
EDTA	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Eindeckmedium mit DAPI, Vectashield	Vecta Lab., Burlingame (USA)
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol (absolut)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	MoBiTec, Göttingen
Fixierungs-/Permeabilisierungs Kit	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Flow, -Clean, -Rinse	Becton Dickinson, Heidelberg
Fötales Kälberserum (FKS)	PAA, Marburg
Formalin, 37%	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Formamid, deionisiert	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Glyzerin	Serva, Heidelberg
Glukose	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Merck, Darmstadt
HEPES, 1 M	Invitrogen, Karlsruhe
IBMX	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
IGF-1	Natutec, Frankfurt
Insulin (human)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Indomethazin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Isopropanol	Merck, Darmstadt
ITS	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Kollagenase	Serva, Heidelberg
Kernechtrot	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
L-Prolin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
L-Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
LDS751	Invitrogen, Karlsruhe
Methanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
MOPS (3-Morpholinopropansulfonsäure)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Mycoplasmen Detection Kit	Minerva Biolabs (VenorGem)

Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat, 100 mM	Invitrogen, Karlsruhe
Oil red O	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
PBS	Invitrogen, Karlsruhe
Penizillin/Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Pferdeserum	Invitrogen, Karlsruhe
Plasmid Kit, midi	Qiagen, Hilden
Polybrene	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Primer (sequenzspezifisch)	Qiagen, Hilden
QuantiTect RT Kit	Qiagen, Hilden
QuantiFast SYBR Green PCR Kit	Qiagen, Hilden
QuantiTect Primer-Assays	Qiagen, Hilden
RNase A	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
RNase Inhibitor, RNase I	Promega, Mannheim
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Senescence Cells Histochemical Staining Kit	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Sensiskript RT Kit	Qiagen, Hilden
Sonde Telo-PNA-FITC	Panagene, Liege (Belgien)
Silbernitrat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Taq PCR Core Kit	Qiagen, Hilden
Telo TAGGG Telomerase PCR ELISAPlus-Assay	Roche, Mannheim
TGF- β 3	Natutec, Frankfurt
Tranfektionsreagenz, Optifect	Invitrogen, Karlsruhe
Tris-Base (Tris-hydroxymethyl-aminoethan)	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypsin/EDTA	Invitrogen, Karlsruhe
Trypton/Pepton	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Tween20	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ziegenserum	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.2 Allgemeine Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
15 ml, 50 ml Röhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Drigalski-Spatel	Assistent, Sondheim/Röhn
Einmalpipetten, verschiedene Größen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Eppendorf-Reaktionsgefäße, verschiedene Größen	Eppendorf, Hamburg
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
Glaswaren	Schott, Mainz
Impfösen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Kanülen	B. Braun, Melsungen
Klonierungs-Zylinder	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Kryo-Röhrchen (2 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Kulturgefäß mit Glasboden	Becton Dickinson, Heidelberg
Küvetten, UVette 220-1600 nm	Eppendorf, Hamburg
Lochplatten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Objektträger, silanisiert	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Parafilm	American National Can. Co., Chicago (U.S.A.)
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Plastikpetrischalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Spritzen, verschiedene Größen	B. Braun, Melsungen
Zellkulturgefäße	Greiner Bio-One, Frickenhausen

2.1.3 Geräte

Gerät	Hersteller
Analysenwaage, CP64	Sartorius, Göppingen
Begasungsbrutschrank, BBD6220	Thermo Scientific, Langenselbold
Durchflusszytometer, FACS Calibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Fireboy	Integra Biosciences, Fernwald
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr, Biberach a. d. Riss
Gefriermikrotom, CM3050	Leica, Wetzlar
Geldokumentationssystem	Intas, Göttingen
Horizontales Elektrophorese-System, Midi easy cast	PeqLab, Erlangen
Inkubationschüttler, C24	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Kühlschrank (4 °C)	Liebherr, Biberach a. d. Riss
Mikrobiologischer Brutschrank, BK4029	Ehret, Emmendingen
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank Klasse2	BDK, Sonnenbühl-Genkingen
Mikrowelle, MW 723	Ciatronic
Mikroskop, IX70 und IX81, inverse Durchlicht-Mikroskope mit Phasenkontrast- und Fluoreszenzfilter und SIS CC12 CLR Farbkamera	Olympus, Hamburg
Mikroskop, Axiophot, Durchlichtmikroskop mit Phasenkontrast- und Fluoreszenzfilter	Zeiss, Jena
Objektträger Strecktisch	Medite, Burgdorf
PCR Detektionssystem, MyiQ	Biorad, München
PCR Thermoblock, UNO II	Biometra, Göttingen
Photometer, Bio	Eppendorf, Hamburg
Schüttel-/Mischgerät, REAX top	Heidolph instruments, Schwabach
Spannungsquelle, PP 3000	Biometra, Göttingen
Spektrometer, SpectraFluor	Tecan, Crailsheim
Thermocycler, UNO II	Biometra, München
Thermomixer, Compact 5350	Eppendorf, Hamburg
Tiefkühlschrank (-80 °C), HFU 486 HERA freeze	Thermo Scientific, Langenselbold
Wasserbad	Julabo Labortechnik, Seelbach
Zellzahlbestimmung, CASY-TT	Innovatis, Reutlingen
Zentrifuge, 3K18	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Zentrifuge, Biofuge Pico	Thermo Scientific, Langenselbold
Zentrifuge, Biofuge R	Thermo Scientific, Langenselbold

Computer-Software	Hersteller
AnalySIS Pro 5.1. und CellP	Olympus-SIS, Hamburg
CellQuest Pro	Becton Dickinson, Heidelberg
Axiovision rel.4.5	Zeiss, Jena
Magellan	Tecan, Crailsheim
Vision Development Module	National Instruments, München
LabView	National Instruments, München
MyiQ, optical system software	Biorad, München

2.1.4 Medien, Lösungen und Pufferzusammensetzungen

Medien der Zellkultur

Kulturmedium der hPSC, hSGSC und HEK-293T:

Penizillin	50 U/ml
Streptomycin	50 µg/ml
FKS	10 % (v/v)
in DMEM (4,5 mg/ml Glukose)	

Kulturmedium der hMSC:

Penizillin	50 U/ml
Streptomycin	50 µg/ml
FKS	15 % (v/v)
in alpha-MEM	

Einfriermedium:

FKS	90 % (v/v)
DMSO	10 % (v/v)

Chondrogenes Differenzierungsmedium:

Penizillin	50 U/ml
Streptomycin	50 µg/ml
Dexamethason	100 nM
L-Ascorbinsäure	280 µM
Natriumpyruvat	1 mM
ITS	1x
L-Prolin	40 µg/ml
TGF-β3	10 ng/ml
in DMEM (1 mg/ml Glukose)	

Osteogenes Differenzierungsmedium:

Penizillin	50 U/ml
Streptomycin	50 µg/ml
Dexamethason	100 nM
L-Ascorbinsäure	280 µM
β-Glycerolphosphat	5 mM
BMP2	100 ng/ml
FKS, hitzeinaktiviert	10 % (v/v)
in DMEM (4,5 mg/ml Glukose)	

Adipogenes Differenzierungsmedium:

Penizillin	50 U/ml
Streptomycin	50 µg/ml
Dexamethason	0-100 nM
IBMX	5 µM
Indomethazin	200 µM
Insulin	100 ng/ml
oder	
IGF-1	100 nM
FKS, hitzeinaktiviert	10 % (v/v)
in DMEM (4,5 mg/ml Glukose)	

Kontrollmedium der chondrogenen Differenzierung:

Penizillin	50 U/ml
Streptomycin	50 µg/ml
Natriumpyruvat	1 mM
L-Prolin	40 µg/ml
FKS, hitzeinaktiviert	10 % (v/v)
in DMEM (1 mg/ml Glukose)	

Kontrollmedium der adipogenen und osteogenen Differenzierung:

Penizillin	50 U/ml
Streptomycin	50 µg/ml
FKS, hitzeinaktiviert in DMEM (4,5 mg/ml Glukose)	10 % (v/v)

Arbeitslösungen

Alzianblau-Färbelösung:

Alzianblau	1 % (w/v)
in Essigsäure	3 % (v/v)

Alizarinrot-Färbelösung:

Alizarinrot	2 % (w/v)
in dH ₂ O	
pH 4,3 mit Natriumhydroxid (2 M)	

Oil red O-Färbelösung:

Oil red O Pulver	0,3 % (w/v)
in Isopropanol	

Silbernitratlösung (von Kossa):

Silbernitrat	5 % (w/v)
in dH ₂ O	

Reduktionslösung (von Kossa):

Formaldehyd	9 % (v/v)
Natriumcarbonat	5 % (w/v)
in dH ₂ O	

LB-Medium:

Trypton/Pepton aus Casein	1 % (w/v)
Hefeextrakt Pulver	0,5 % (w/v)
NaCl in dH ₂ O	1 % (w/v)
pH 7,5 mit NaOH, 2 M	
autoklavieren	

LB-Platten:

Trypton/Pepton aus Casein	1 % (w/v)
Hefeextrakt Pulver	0,5 % (w/v)
NaCl in dH ₂ O	1 % (w/v)
pH 7,5 mit NaOH	
Agar	1,5 % (w/v)
autoklavieren, auf ca. 40 °C abkühlen lassen, 100 µg/ml Ampicillin zugeben und in 10 cm Platten gießen	

DEPC-Wasser:

DEPC	0,1 % (v/v)
in H ₂ O bei RT für 12 h inkubieren, anschließend 15 min bei 121 °C autoklavieren	

FACS-Fix:

Paraformaldehyd	1 % (w/v)
NaCl	0,85 % (w/v)
in PBS pH 7,4	

TAE-Puffer (10×):

Tris	400 mM
EDTA	10 mM
Essigsäure	180 mM
pH 8,1-8,5	

Telomerlängenbestimmung

Aufnahmepuffer:

BSA	0,1 %
HEPES-Puffer	10 mM
Glukose	5%
in dH ₂ O	

Hybridisierungsmix (unst und tel):

Tris	20 mM
NaCl	20 mM
BSA	1 % (w/v)
Deionisiertes Formamid	75 % (v/v)
Telo-PNA-FITC (nur in tel)	0,3 µg/ml
in dH ₂ O	

Waschpuffer 1:

Formamid	75 % (v/v)
Tris	20 mM
BSA	1 % (w/v)
Tween20	1 % (v/v)
in dH ₂ O	

Waschpuffer 2:

BSA	1 % (w/v)
Tween20	1 % (v/v)
HEPES	10 mM
Glukose	5 % (w/v)
in dH ₂ O	

LDS-Lösung:

LDS751	0,1 µg/ml
RNaseA	10 µg/ml
BSA	1 % (w/v)
in PBS pH 7,4	

PBSAT:

Triton	0,1% (v/v)
BSA	1% (w/v)
in PBS	

2.1.5 Antikörper

Tab. 2: Verwendete primäre Antikörper bei der quantitativen Durchflusszytometrie

Antigen	Isotyp, Wirt	Konjugation	Angaben zur Verwendung	Hersteller, Bestellnummer
CD9	IgG1, Maus	PE	1:100	BD, 555372
CD29	IgG1, Maus	PE-Cy5	1:100	BD, 559882
CD31	IgG1, Maus	PE	1:100	BD, 555446
CD44	IgG2b, Maus	PE	1:100	BD, 555479
CD45	IgG1, Maus	PE	1:100	BD, 555483
CD73	IgG1, Maus	PE	1:100	BD, 550257
CD81	IgG1, Maus	PE	1:100	BD, 555676
CD90	IgG1, Maus	PE	1:100	BD, 555596
CD105	IgG1, Maus	PE	0,5 µg	Acris, SM1177R
CD106	IgG1, Maus	PE	1:100	BD, 555647
CD117	IgG1, Maus	PE	1:100	Abcam, ab11290
CD133	IgG1, Maus	PE	1:100	Miltenyi-Biotec, 130-080-801
CD271	IgG1, Maus	PE	1:100	BD, 557196
MHC1	IgG1, Maus	PE	1:100	BD, 555553
MHC2	IgG1, Maus	PE	0,5 µg	Abcam, ab34930
Nestin	IgG1, Maus	PE	1:50	R & D, MAB1259
Tra-1-60	IgM, Maus	keine	0,5 µg	US Biological, T8115
SSEA-3	IgM, Ratte	keine	0,5 µg	US Biological, S6610
Isotyp-Kontrolle	IgG1, Maus	PE	1:100	BD, 555749
Isotyp-Kontrolle	IgM, Maus	PE	1:100	BD, 555584
Isotyp-Kontrolle	IgG2b, Maus	PE	1:100	BD, 555743
Isotyp-Kontrolle	IgG1, Maus	PE-Cy5	1:100	BD, 555750
Isotyp-Kontrolle	IgM, Maus	keine	1:100	BD, 555584
Isotyp-Kontrolle	IgM, Ratte	keine	0,5 µg	Abcam, ab35768
Isotyp-Kontrolle	IgG1, Maus	keine	1:100	BD, 555746

Tab. 3: Verwendete sekundäre Antikörper bei der quantitativen Durchflusszytometrie

Antigen	Isotyp, Wirt	Konjugation	Verwendung	Hersteller, Bestellnummer
Anti-Maus Sekundär Antikörper	IgG, Ziege	Alexa Fluor 647	0,5 µg	Invitrogen, A21240
Anti-Maus Sekundär Antikörper	IgG, Ziege	Alexa Fluor 488	0,5 µg	Invitrogen, A11029
Anti-Ratte Sekundär Antikörper	IgG, Ziege	Alexa Fluor 488	0,5 µg	Invitrogen, A11006

Tab. 4: Verwendete primäre Antikörper bei der qualitativen Immunzytochemie

Antigen	Wirt	Verdünnung	Hersteller, Bestellnummer
Alkaline Phosphatase	Maus, monoklonal	1:50	R & D Systems, MAB1448
Vigilin	Kaninchen, polyklonal	1:200	Charli Kruse, EMB Lübeck
SSEA-1	Maus, monoklonal	1:50	Chemicon, MAB4301X
Nestin	Maus, monoklonal	1:100	Chemicon, MAB5326
PGP9.5	Kaninchen, polyklonal	1:2000	Chemicon, AB5925
Neurofilamente	Kaninchen, polyklonal	1:500	Serotec, AHP245,
α -SMA	Maus, monoklonal	1:100	DAKO, M0851
GFAP	Kaninchen, polyklonal	1:100	DAKO, Z0334
Zytokeratin 1,4,5,6,8,10,13,18,19	Maus, monoklonal	1:100	Sigma-Aldrich, C2562
Proteoglykan	Maus, monoklonal	1:100	Chemicon, MAB2015
Kollagen Typ1	Maus, monoklonal	1:100	Sigma-Aldrich, C2456
Kollagen Typ3	Maus, monoklonal	1:100	Sigma-Aldrich, C7808

Tab. 5: Verwendete sekundäre Antikörper bei der qualitativen Immunzytometrie

Antigen	Isotyp, Wirt	Konjugation	Verdünnung	Hersteller, Bestellnummer
anti-Maus Sekundär-Antikörper	Ziege	Cy3	1:400	Dianova, 115-165-062
anti-Kaninchen Sekundär-Antikörper	Ziege	FITC	1:200	Dianova, 111-095-144
anti-Maus Sekundär-Antikörper	IgG, Ziege	Alexa Fluor 488	1:300	Invitrogen, A11029

2.1.6 Plasmide

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Plasmide wurden freundlicherweise von Herrn PD Dr. Uwe Martens, Universitätsklinikum Freiburg, bzw. von Herrn Prof. Dr. Tim Brümmendorf Universitätsklinikum Hamburg zur Verfügung gestellt. Die Herkunft und die Eigenschaften der verwendeten Plasmide sind in Tab. 6 aufgeführt.

Tab. 6: Herkunft und Beschreibung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
pOS-IRES-GFP	pOS Rückgrat ⁸⁶ mit IRES-GFP Einsatz	PD Dr. Uwe Martens, Freiburg
pOS-hTERT-IRES-GFP	pOS Rückgrat ⁸⁶ mit hTERT-IRES-GFP Einsatz	PD Dr. Uwe Martens, Freiburg
M57/R690-SV40	gag kodiert Kapsidproteine, pol kodiert reverse Transkriptase	Prof. Dr. Tim Brümmendorf, Hamburg
K85 GALV	Envelope (Hüllplasmid)	Prof. Dr. Tim Brümmendorf, Hamburg

2.1.7 Zelllinien und Bakterien

Die Zelllinie Saos-2 wurde bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in Braunschweig gekauft. Da diese Zelllinie keine enzymatisch aktive Telomerase besitzt, wurde sie als Negativkontrolle bei der Bestimmung der Telomeraseaktivität verwendet.

Als Helferzelllinie zur Produktion von Viren wurde die permanente Zelllinie HEK-293T benutzt. Diese wurde von Dr. M. Grez aus dem Georg-Speyer-Haus in Frankfurt zur Verfügung gestellt.

Zur Herstellung der Rinderthymozyten wurde frischer Rinder-Thymus zerkleinert und zu einer Einzelzell-Suspension verarbeitet. Nach 10-minütiger Fixierung der Thymozyten in 3,7 % Formaldehyd wurden die Zellen zweimal mit Medium (RPMI 1640) gewaschen und anschließend bei -80 °C gelagert. Die Zellen wurden als interner Standard für die Telomerlängenmessungen mit Flow-FISH verwendet.

Die zur Vervielfältigung der Plasmide benutzten Bakterien *Escherichia coli* K12 XL 1Blue sind bei der DSMZ in Braunschweig gekauft.

Allgemeine Angaben:

Das Arbeiten mit Zellkulturen erfolgte unter aseptischen Bedingungen, um Kontaminationen durch Bakterien, Pilze und sonstige Mikroorganismen zu vermeiden. Die benutzten Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien waren vom Hersteller steril verpackt oder für 15 Minuten bei 121 °C autoklaviert.

Bei Arbeiten mit RNA wurden RNase-freie Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen benutzt.

Die benutzten Chemikalien entsprachen höchster Reinheit.

Die Hitzeinaktivierung des fötalen Kälberserums erfolgte bei 56 °C für 30 Minuten.

In regelmäßigen Abständen wurden die Zellkulturen auf eine Kontamination durch Mykoplasmen untersucht.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Kultivierung von adhärenenten Zellen

Alle Zellen wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit in einem Begasungsbrutschrank kultiviert. Bei Erreichen der Konfluenz wurden die Zellkulturen mit PBS gewaschen, mit Trypsin-EDTA (0,05 %) für 4 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend vom Boden der Kulturflasche gelöst. Durch Zugabe von Kulturmedium wurde die Wirkung des Trypsins inhibiert. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde das Zellsediment in Kulturmedium resuspendiert und entsprechend der weiteren Verwendung kultiviert.

Isolierung humaner mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark

Nach dem Herausschaben von trabekulären Knochenstücken und Knochenmark aus dem Oberschenkelkopf wurden diese mittels einer Schere zerkleinert und dreimal in Medium gewaschen. Das zellhaltige Waschmedium wurde zentrifugiert (450 x g für 5 Minuten) und nach Aufnahme des Zellsediments in frischem Medium auf 20 ml Sukrose pipettiert. Durch einen 30-minütigen Zentrifugationsschritt (350 x g für 30 Minuten) wurden die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (peripheral blood mononuclear cells - PBMC) von den mesenchymalen Stammzellen getrennt. Mononukleäre Zellen sammeln sich während des Zentrifugierens in der weißen Interphase, welche entnommen und mit PBS gewaschen wurden. Nach einem 5-minütigen Zentrifugationsschritt bei 450 x g wurden die sedimentierten Zellen in 10 ml Kulturmedium resuspendiert und in einer Kulturflasche mit einer Größe von 75 cm² bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % rel. Luftfeuchtigkeit kultiviert. Nach 3 - 4 Tagen erfolgte der erste Mediumwechsel, mit welchem nichtadhärente Zellen (z. B. hämatopoetische Zellen) entfernt wurden. Die Subkultivierung der humanen mesenchymalen Stammzellen erfolgte bei einer Konfluenz von ca. 70 % und die weitere Kultivierung mit einer Zelldichte von ca. 1000 - 2000 Zellen/cm². Ein Mediumwechsel erfolgte dreimal pro Woche. Die dadurch erhaltene Zellpopulation ist noch ein heterogenes Gemisch aus großflächigen multipolaren somatischen Zellen und mesenchymalen Stammzellen. Durch die eingeschränkte Teilungsfähigkeit der somatischen Zellen wurde die Population der mesenchymalen Stammzellen während der ersten Subkultivierungen von den somatischen Zellen gereinigt.

Die Oberschenkelköpfe waren aus dem evangelischen Krankenhaus Zweibrücken von Dr. M. Maue und Dr. M. Hassinger erhalten.

Humane Stammzellen aus Pankreas und Speicheldrüse

Die Isolierung und Kultivierung der Stammzellen aus exokrinem Pankreas und exokriner Unterkieferspeicheldrüse erfolgte in der Einrichtung für Marine Biotechnologie (EMB) in Lübeck wie in Kruse et al. 2004 beschrieben¹⁰¹. Dafür wurden die entnommenen Biopsien enzymatisch und mechanisch zerkleinert und die dadurch erhaltenen exokrinen Azini und Zellen in Kulturflaschen kultiviert. Nicht adhärente Zellen und Gewebestücke wurden beim Mediumwechsel nach 5 Tagen entfernt. Nach einer Woche wurden die adhären Zellen mit einer Zelldichte von 3000 - 4000 Zellen/cm² subkultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte dreimal pro Woche.

Die benutzten Zellen wurden nach 5 Subkultivierungen (PD7) kryokonserviert von der Einrichtung für Marine Biotechnologie in Lübeck zur Verfügung gestellt und wie beschrieben kultiviert.

Bestimmung der Zellzahl und Zellgröße

Die Bestimmung der Zellzahl und der Zellgröße erfolgte mittels impedanzbasierter Durchflusssytometrie mit dem Gerät CASY-TT von Innovatis. Dabei werden Einzelzellen, welche in einer Elektrolytlösung suspendiert sind, durch eine Meßpore gesaugt. An der Pore ist ein 1 MHz getaktetes Niederspannungsfeld angelegt. Die elektrolytgefüllte Messpore stellt einen definierten elektrischen Widerstand dar. Beim Durchtritt einer Zelle verdrängt diese eine ihrem Volumen entsprechende Menge Elektrolytlösung. Da die Zelle selbst (in erster Näherung) als Isolator betrachtet werden kann, kommt es zu einer Widerstandserhöhung. Diese Widerstandsänderung ist ein Maß für das Volumen und damit für die Größe der Zelle. Tote oder geschädigte Zellen, bei denen die Zellmembran keine elektrische Barriere darstellt, werden bei einer intakten Kernmembran mit der Größe Ihres Zellkerns erfasst.

Berechnung der Populationsverdopplungen

Zur Bestimmung der Populationsverdopplung (PD) wurde bei den Passagen die Zellzahl bestimmt. Der Quotient aus der aktuellen Zellzahl und der eingesetzten Zellzahl ergab die Vervielfachung der Zellen. Die Berechnung der Populationsverdopplung (PD) der Zellpopulationen erfolgte mit der Formel:

$$PD = \log_{10}(V) / \log_{10}(2); V = \text{Vervielfachung der Zellen.}$$

3D-Aggregate der chondrogenen Differenzierung

Die Differenzierung in chondrogene Richtung erfolgte in dreidimensionalen Pellet-Kulturen. Dazu wurden 2×10^5 Zellen bei 200 x g für 5 Minuten zentrifugiert und anschließend über Nacht bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % rel. Luftfeuchte kultiviert. Am darauf folgenden Tag erfolgte ein Mediumwechsel auf chondrogenes Differenzierungsmedium.

Zellklonierung der hPSC und hSGSC

Zur Zellklonierung wurden statistisch 0,5 Zellen in die Kavität einer 96-Loch-Platte pipettiert. Am darauf folgenden Tag erfolgte die mikroskopische Kontrolle aller Kavitäten. Nur diejenigen, in denen eine einzige Zelle zu sehen war, wurden für die Zellklonierungsstudie benutzt. Nach Erreichen einer Konfluenz von ca. 70 % erfolgte die Subkultivierung mit 3000 - 4000 Zellen/cm². Die Kultivierung erfolgte während der ersten Woche in konditioniertem Kulturmedium mit 20 % FKS. Konditioniertes Medium bestand aus Kulturmedium (10 % FKS), in welchem Zellen der gleichen Linie vorher für drei Tage kultiviert waren, und dem Zusatz von 10 % frischem FKS. Alternativ erfolgte die Zellklonierung mit Klonierungs-Zylindern. Dazu wurden die Zellen mit einer geringen Zellzahl in einer Petrischale kultiviert und über einzelne Zellen, nach mikroskopischer Kontrolle, selbstklebende Klonierungs-Zylinder gestülpt. Dadurch erfolgte die Vereinzellung der Zellen in den Zylindern. Die weitere Kultivierung erfolgte wie oben beschrieben.

Anfertigen von Gefrierschnitten

Von den dreidimensionalen Zellaggregaten der chondrogenen Differenzierung wurden, zur besseren histochemischen und immunzytochemischen Färbung und Dokumentation, Gefrierschnitte angefertigt. Dafür wurden die Aggregate für 30 Minuten in 4 % Formalin fixiert und nach drei Waschschritten mit PBS in 25 % Sukrose gelagert. Zum Schneiden der Proben wurden diese auf einen Probenträger aufgefroren und mittels eines Gefriermikrotoms 7 µm dicke Schnitte angefertigt, welche auf gelatinisierte Objektträger aufgenommen wurden.

2.2.2 Arbeiten mit RNA und DNA

RNA-Isolierung

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte mit Hilfe des RNeasy mini Kits (Qiagen) und wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Durchführung aller Arbeitsschritte erfolgte zügig und bei Raumtemperatur.

Bis zu 5×10^6 Zellen wurden in 350 µl RLT-Lysepuffer resuspendiert. Der Lysepuffer enthielt 1 % β-Merkaptoethanol und RNasen inaktivierendes Guanidin Isothiozyanat. Die Homogenisierung erfolgte durch fünfmaliges Resuspendieren mit einer Spritze und Kanüle (Ø 0,9 mm). Anschließend wurde die genomische DNA bei einem Durchlauf durch eine DNA bindende Säule entfernt. Durch die Zugabe von einem Volumenanteil Ethanol (70 %) wurde die RNA gefällt. 700 µl der Probe wurden auf die Säule gegeben und für 15 Sekunden bei $8000 \times g$ zentrifugiert. Dabei band die RNA an die Membran, während die restlichen Zellbestandteile ungebunden durch die Säule liefen und verworfen wurden. Im ersten Waschschriff wurden 700 µl RW1-Waschpuffer auf die Säule aufgetragen und 15 Sekunden bei $8000 \times g$

zentrifugiert, wobei Fremdstoffe und Verunreinigungen beseitigt wurden. Der Durchlauf wurde verworfen und die Säule in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Der zweite Waschschrift erfolgte durch die Zugabe von 500 µl RPE-Waschpuffer auf die Säule mit anschließender Zentrifugation für 15 Sekunden bei 8000 × g, wobei der RPE-Waschpuffer Guanidin Salze und Ethanol (80 %) enthielt. Der Durchlauf wurde verworfen. Anschließend wurde ein zweites Mal 500 µl RPE-Waschpuffer auf die Säule gegeben und 2 Minuten bei 8000 × g zentrifugiert. Die Säule wurde anschließend in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und zum Evaporieren des Ethanols 1 Minute bei 9000 × g zentrifugiert. Nach Überführen der Säule in ein frisches Reaktionsgefäß erfolgte die Elution der RNA durch die Zugabe von 30 µl RNase-freiem Wasser auf die Säule und anschließender Zentrifugation für 1 Minute bei 8000 × g. Die isolierte RNA wurde bei -70 °C gelagert. Die Silica-Gel-Membran besitzt eine Bindekapazität von 100 µg RNA und bindet RNA ab einer Größe von 200 Basen.

Bestimmung der Konzentration von Ribonukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung der Ribonukleinsäuren erfolgte photometrisch. Dazu wurde die Ribonukleinsäureprobe 1:25 in destilliertem Wasser verdünnt und die Extinktion bei $\lambda=260$ nm für Ribonukleinsäuren und bei $\lambda = 280$ nm für Proteine gemessen. Aus dem Quotienten der beiden Messwerte (OD260/OD280) kann eine Aussage über die Reinheit der Nukleinsäurelösung getroffen werden. Eine reine Nukleinsäurelösung besitzt einen Quotienten von 1,8 - 2,0. Die Extinktion von 1 entspricht bei 260 nm einer RNA-Konzentration von 40 ng/µl, einer doppelsträngigen DNA von 50 ng/µl und einer einzelsträngigen DNA von 33 ng/µl.

Reverse Transkription

Das Umschreiben der mRNA in cDNA erfolgte mit Hilfe des Sensiscript RT Kits (Qiagen) und wurde nach Anleitung durchgeführt. Zusätzlich wurden noch ein RNase Inhibitor (Promega) und ein sequenzspezifischer Primer (rückwärts) (Qiagen) aus der anschließenden PCR (Tab. 10) für die Reaktion eingesetzt. Alle Pipettierschritte wurden auf Eis und mit eisgekühlten Lösungen durchgeführt.

Die reverse Transkriptase wird in *E. coli* rekombinant exprimiert. Sie besitzt drei verschiedene Enzymaktivitäten: eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, eine Hybrid-abhängige Exoribonuklease (RNase H) und eine DNA-abhängige DNA-Polymerase. Für die Reaktion der reversen Transkription *in vitro* werden die ersten beiden Enzymaktivitäten der reversen Transkriptase genutzt. Die RNA-abhängige DNA-Polymerase transkribiert ausgehend von einem an die RNA hybridisierten Oligonukleotid (Primer) cDNA von der RNA Matrize. Im Anschluss degradiert die RNase H die RNA aus den RNA/DNA-Hybridmolekülen.

Durchführung:

Es wurden 8 µl der Master-Mix Lösung (Tab. 7) mit 300 ng denaturierter RNA gemischt und mit Nuklease-freiem Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Die Reaktion erfolgte während einer zweistündigen Inkubation bei 37 °C. Anschließend wurde die cDNA bei –20 °C gelagert.

Tab. 7 Zutaten des RT-Master-Mix

Komponenten des Master-Mix	Endkonzentration	Volumen pro 20 µl Reaktionsansatz
RT-Puffer (10 x)	1 x	2 µl
dNTPs (10 mM)	0,5 mM	2 µl
Primer	1 µM	2 µl
RNase Inhibitor	10 U	1 µl
Sensiscrypt reverse Transkriptase	4 U	1 µl

Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerasen-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction, PCR) können Nukleinsäureabschnitte exponentiell amplifiziert werden. Dabei wird die Eigenschaft einer DNA-Polymerase genutzt, einzelsträngige DNA von einem freien 3'-OH-Ende eines kurzen doppelsträngigen DNA Abschnitts ausgehend zu duplizieren.

Als erstes erfolgt die thermische Denaturierung der DNA in Einzelstränge bei 95 °C. Im zweiten Schritt hybridisieren chemisch synthetisierte sequenzspezifische Oligonukleotide (Primer) an ihre komplementären Sequenzen auf dem DNA Einzelstrang. Die Temperatur der Primer Anlagerung liegt üblicherweise 5 °C unter der Schmelztemperatur der Primer. Die Basenabfolge der Primer ist so gewählt, dass sie komplementär zu den flankierenden Bereichen der DNA-Sequenz ist, die amplifiziert werden soll. Die hybridisierten Primer stellen den Startpunkt für die Extension der Primer durch die DNA-Polymerase dar. Dabei dient der DNA-Einzelstrang als Matrize. Die Temperatur für diesen Schritt ist vom Temperaturoptimum der benutzten DNA-Polymerase abhängig. Hier wird die aus dem Eubakterium *Thermophilus aquaticus* stammende hitzebeständige Taq-Polymerase mit einer optimalen Reaktionstemperatur von 72 °C verwendet. Durch die Anzahl von n-zyklischen Wiederholungen dieser drei Schritte (Denaturierung, Primer-Hybridisierung, Primer-Extension) kann man, von einem DNA-Molekül ausgehend, 2^n Kopien dieses DNA-Moleküls erhalten. Alle Schritte der PCR werden automatisiert in Thermocyclern durchgeführt.

Die Durchführung der PCR erfolgte mit Hilfe des Taq PCR Core Kits (Qiagen) und wurde nach Anleitung durchgeführt. Die Pipettierschritte erfolgten auf Eis und mit eisgekühlten Lösungen. Es wurden 7,5 µl der Master-Mix Lösung (Tab. 8) mit 10 µl cDNA (aus der Reaktion der reversen Transkription) gemischt und mit sterilfiltriertem Wasser auf 50 µl aufgefüllt. In der Negativkontrolle wurde die cDNA durch sterilfiltriertes Wasser ersetzt. Die eingestellten Parameter der PCR sind in Tab. 9 dargestellt.

Tab. 8 Zutaten des PCR-Master-Mix

Komponenten des Master-Mix	Endkonzentration	Volumen pro 50 µl Reaktionsansatz
PCR-Puffer (10 ×)	1 ×	5 µl
dNTPs (10 mM)	je 0,2 mM	1 µl
Primer (forwärts)	0,1 µM	0,5 µl
Primer (rückwärts)	0,1 µM	0,5 µl
Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	2,5 U/Reaktion	0,5 µl

Tab. 9 Parameter der PCR

Schritt	Zeit	Temperatur
Initiale Denaturierung	5 min	94 °C
Denaturierung	30 s	94 °C
Primer Anlagerung	45 s	55-59 °C
Extension	45 s	72 °C
Finale Extension	10 min	72 °C

Temperatur des Heizdeckels: 105 °C. Die Schritte 2-4 wurden in 40 Zyklen wiederholt.

Tab. 10 Sequenzspezifische Primer

Primer	Vorwärts 5'→3'	Rückwärts 5'→3'
GAPDH	tgcaccaccaactgctta	gatgcaggatgatgttc
CD9	ttggactatggctccgattc	ggcgaatatcaccaagagga
Nestin	accctccagactccactcc	cacactcctcttccctcct
Octamer-4	ctgtcctggggattgagatg	atgttcctctggtcgtgtg
Nanog	cctatgcctgtgattgtgg	aagtgggttgtttgcctttg
PGP9.5	aactgggatttgaggatgga	gaggggaaggcgtgtctg
Bone morphogenic protein-2	atggattcgtggtggaagtg	cgctgtttgtgtttggcttg
Albumin	tggcacaatgaagtgggtaa	ctgagcaaaggcaatcaaca

Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren

Mit Hilfe der Gelelektrophorese können Nukleinsäuren anhand der Größe, Länge und Form der Moleküle in einem Agarosegel aufgetrennt werden. Die unter elektrophoretischen Bedingungen als Anionen vorliegenden Phosphatgruppen der Nukleinsäuren bewegen sich im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Nukleinsäuren ist abhängig von der Agarosekonzentration, der angelegten Spannung, der Art des Laufpuffers und der Anwesenheit interkalierender Farbstoffe. Zur Größenbestimmung von Nukleinsäuren werden bei der Gelelektrophorese Standards mit eingesetzt, welche DNA-Fragmente bekannter Größe enthalten.

Zur Herstellung eines Agarosegels wird das Polysaccharid Agarose durch Aufkochen in TAE-Puffer gelöst. Diese Lösung geliert während des Abkühlens. Vor dem Beladen eines Agarosegels werden die zu trennenden Nukleinsäuren mit einem Ladepuffer gemischt. Der Ladepuffer enthält Substanzen mit hoher Dichte (z. B. Glycerin) und Farbstoffe (z. B. Bromphenolblau), wodurch das Beladen der Geltaschen und das Verfolgen der Nukleinsäuren während des Gellaufs erleichtert werden. Die Detektion der Nukleinsäuren erfolgte durch Ethidiumbromid (3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridiniumbromid), welches aufgrund seiner planaren Struktur in die gestapelten Basen der Nukleinsäuren interkaliert. Nach der Anregung durch UV-

Licht emittiert das interkalierte Ethidiumbromid Licht im sichtbaren Wellenlängenbereich und die aufgetrennten Ribonukleinsäuren werden sichtbar.

Reverse Transkription und real-time PCR

Das Umschreiben der mRNA in komplementäre cDNA für den anschließenden Einsatz in der real-time PCR erfolgte mit Hilfe des Quantitect RT Kits (Qiagen) und nach Angaben des Herstellers. Die Pipettierschritte erfolgten auf Eis und mit eisgekühlten Lösungen. Nach einer 2-minütigen Inkubation der RNA mit einem gDNA-Whipeout Puffer bei 42 °C folgte eine 30-minütige Inkubation bei 42 °C, währenddessen die RNA von der reversen Transkriptase mit Hilfe der oligo-dT- und random-Primern zu cDNA umgeschrieben wurde (Tab. 11). In der Negativkontrolle wurde die reverse Transkriptase durch Wasser ersetzt. Durch einen 3-minütigen Inkubationsschritt bei 95 °C erfolgte die Inaktivierung der Enzyme.

Tab. 11 Zutaten der Reaktion der reversen Transkription

Komponenten des Master-Mix	Volumen pro 20 µl Reaktionsansatz
Reverse Transkriptase (RT)	1 µl
RT-Puffer	4 µl
Primer-Mix	1 µl
RNA (nach gDNA Eliminierung)	14 µl

Die Durchführung der real-time PCR erfolgte mit Hilfe des QuantiFast SYBR Green PCR Kits (Qiagen) und nach Angaben des Herstellers. Die Pipettierschritte erfolgten auf Eis und mit eisgekühlten Lösungen. Es wurde ein Master-Mix hergestellt, indem 12,5 µl der PCR-Master-Mix Lösung mit 2,5 µl Primer-Mix und 8 µl Wasser je Ansatz gemischt wurden. Zu diesen 23 µl Master-Mix wurde zu jeder Reaktion 2 µl cDNA (50 ng RNA) pipettiert. Die eingestellten Parameter der PCR sind in Tab. 12 dargestellt. In der PCR-Master-Mix Lösung befindet sich der Zyanin-Farbstoff SYBR-Green, welcher doppelsträngige DNA bindet. Der entstandene Komplex absorbiert Licht bei einer Wellenlänge von 494 nm und emittiert Licht bei 521 nm. Dabei gilt die Annahme, dass sich mit jedem Zyklus die DNA verdoppelt. Somit kann bei der real-time PCR die amplifizierte DNA von jedem Zyklus in „Echtzeit“ gemessen werden.

Tab. 12 Parameter des real-time Cyclers

Schritt	Zeit	Temperatur
1. Initiale Denaturierung	5 min	95 °C
2. Denaturierung	10 s	95 °C
3. Annealing/Extension	30 s	60 °C
4. Finale Extension	10 min	72 °C

Die Schritte 2 und 3 wurden in 40 Zyklen wiederholt.

Nach Ablauf der 40 Zyklen wurden die Amplifikationsprodukte durch eine Schmelzkurvenanalyse auf Nebenprodukte überprüft. Zur Normierung der Daten diente die Expression von β -Tubulin (Normalisierungsgen).

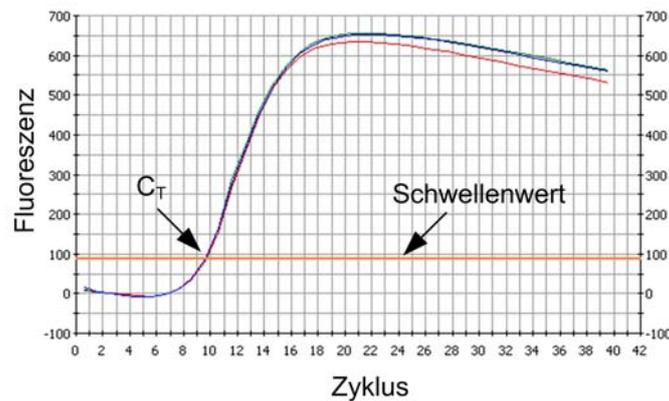


Abb. 12 Bestimmung des C_T -Wertes

Der Zyklus, in dem die Fluoreszenzintensität über den Hintergrund steigt, wird als C_T -Wert bezeichnet. In diesem Beispiel ist der C_T -Wert (Zykluszahl) 9,6.

Als C_T -Wert (cycle threshold) wird der Zyklus bezeichnet, bei dem die Fluoreszenzintensität der DNA-Amplifikation den Schwellenwert (Hintergrund) erreicht.

Die Berechnung der Vervielfältigung der Genexpression erfolgte nach der $\Delta\Delta C_T$ Methode:

$$\Delta C_T = C_T (\text{Zielgen}) - C_T (\text{Normalisierungsgen})$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T (\text{Differenzierung}) - \Delta C_T (\text{Kontrolle})$$

2.2.3 Arbeiten mit Bakterien und Viren

Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA

Um die verwendeten Plasmidvektoren zu vervielfältigen, wurden zunächst kompetente *E. coli* des Stammes K12 XL 1 Blue mit der Plasmid-DNA transformiert. Dazu wurden in einem Reaktionsgefäß 10 ng Plasmid DNA (10 ng/10 μ l) mit 100 μ l kompetenten Bakterien (XL1-Blue) gemischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach 90-sekündiger Inkubation bei 42 °C wurde der Ansatz wieder für 1 Minute auf Eis inkubiert (Hitzeschock Methode). Nach Zugabe von 400 μ l LB-Medium erfolgte die Inkubation bei 37 °C und schüttelnd bei 200 UpM für 1 Stunde. Auf die vorgewärmten LB-Platten (mit Ampizillin) wurden nun verschiedene Mengen der Bakterienkultur mithilfe eines Drigalski-Spatels ausplattiert. Anschließend wurden die LB-Platten über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag hatten sich Bakterienkolonien, welche die Plasmid-DNA mit Ampizillinresistenz aufgenommen hatten, gebildet. Als Negativkontrolle wurden nicht transformierte Bakterien ausplattiert. Zur Vermehrung der Bakterien wurde eine auf den LB-Platten gewachsene Kolonie mit einer sterilen Öse in 100 ml LB-Medium mit 100 μ g/ml Ampizillin in einen Erlenmeyer-Kolben (500 ml) überführt. Der Erlenmeyer-Kolben wurde verschlossen und über Nacht (ca. 16 Stunden) bei 37 °C und 200 UpM in einem Schüttler inkubiert. Ein erfolgreiches Wachstum des Bakterien-Klons im Selektionsmedium war durch eine Trübung der Suspension und Schlierenbildung sichtbar.

Isolierung der Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Isolation der Plasmid-DNA aus den amplifizierten Bakterien der Übernachtskultur erfolgte mit dem Plasmid midi Kit (Qiagen). Dazu wurden die pelletierten Bakterien (3500 UpM für 15 Minuten bei 4 °C) in 4 ml Lysepuffer resuspendiert. Die homogene Lösung wurde auf Eis mit 4 ml Puffer2 versetzt, dreimal invertiert und 5 Minuten bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 4 ml Puffer 3 und dreimaligem invertieren fielen die genomische DNA, Proteine und Zelldebris als weißes Eluat aus. Die Proteine und die Zelldebris wurden nach einem 15-minütigen Inkubationsschritt auf Eis und zwei anschließenden Zentrifugationschritten (5000 UpM für 30 Minuten und 25 Minuten bei 4 °C) von der Plasmid-DNA im Überstand separiert. Der DNA enthaltende Überstand wurde auf eine mit 4 ml QBT-Puffer äquilibrierte Säule pipettiert, wodurch die DNA an die Säule band. Nach zweimaligem Waschen mit jeweils 10 ml QC-Puffer erfolgte die Eluation der Plasmid DNA durch Zugabe von 5 ml QF-Puffer. Zu diesem Eluat wurde 700 µl Isopropanol zugegeben, gemischt und durch einen 5-minütigen Inkubationsschritt bei RT und einen 10-minütigen bei -20 °C erfolgte die Fällung der Plasmid-DNA. Die gefällte Plasmid-DNA wurde pelletiert (13000 UpM für 30 Minuten bei 4 °C) und mit 70%-igem Ethanol (-20 °C) gewaschen. Nach einem erneuten Pelletieren (14000 UpM für 10 Minuten bei 4 °C) wurde das Ethanol abpipettiert und das Plasmid-DNA Pellet 10 Minuten getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde in sterilem Wasser aufgenommen und die Konzentration mittels Photometer bestimmt.

Stabile Integration

Um Vektoren stabil in das Genom der hSGSC zu integrieren, wurden die Zellen durch Retroviren transduziert. Dafür wurden vorher die viralen Partikel in HEK-293T-Zellen generiert.

Transfektion:

Die Transfektion der HEK-293T-Zellen erfolgte mittels des Transfektionsreagenz Optifect (Invitrogen). 8×10^6 HEK-293T-Zellen wurden in einer Petrischale (\varnothing 10 cm) in Kulturmedium ausgesät. Am darauf folgenden Tag waren die Zellen 70 - 80 % konfluent. Um den Transfektionsmix herzustellen, wurden die drei Plasmide (spez. Vektor = 15 µg, M57 = 15 µg und K85 = 7 µg) in 100 µl Medium (DMEM mit 20 mM HEPES) mit 60 µl Optifect und 40 µl Medium (DMEM mit 20 mM HEPES) gemischt und 20 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend folgte ein Mediumwechsel auf ein serumfreies Medium (DMEM mit 20 mM HEPES) und die tröpfchenweise Zugabe des Transfektionsmix. Nach einer Inkubation im Begasungsbrutschrank für 4 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel auf serumhaltiges Kulturmedium. Nach weiteren 24, 36 und 48 Stunden erfolgte jeweils ein Mediumwechsel durch frisches Kulturmedium, wobei das entnommene Medium die Pseudotypviren enthielt. Dieses wurde sterilfiltriert (0,45 µm Porengröße), aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Virale Transduktion:

Zur Transduktion der hSGSC wurden 5×10^4 hSGSC1 in Kulturmedium in der Kavität einer 12-Loch-Platte ausgesät und bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % rel. Feuchtigkeit inkubiert. Nach 1 Stunde wurde Polybrene (8 µg/ml) und 100 µl Pseudotypvirus enthaltender Medium-Überstand zugegeben und die Loch-Platte für 1 Stunde bei RT und 300 x g zentrifugiert. Die Zugabe von Polybrene und Pseudotypvirus wurde am darauf folgenden Tag wiederholt. Nach weiteren 48 Stunden exprimierten transduzierte Zellen das grün fluoreszierende Protein (GFP) und konnten anhand dessen mittels FACS angereichert werden.

2.2.4 Immunzytochemie

Immunzytochemische Färbungen zur qualitativen Dokumentation

Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die adhärenen Zellen mit einem Methanol/Azeton-Gemisch (7:3) für 7 Minuten bei RT fixiert und permeabilisiert. Zur Färbung der Zellkerne enthielt die Fixierungslösung DAPI-Reagenz (1 µg/ml). Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 20 Minuten in einer Blocklösung (5 % Ziegen Serum in PBS) inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation des Primärantikörpers in 1 % Ziegen Serum für 1 Stunde bei 37 °C. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und für 45 Minuten bei 37 °C mit dem entsprechenden Sekundärantikörper inkubiert. Nach anschließendem dreimaligem Waschen mit PBS wurden die gefärbten Zellen mikroskopisch dokumentiert.

Die immunzytochemischen Färbungen zum Nachweis der spontanen Differenzierung der Stammzellen wurden von Dr. Sandra Danner in der Einrichtung für marine Biotechnologie (EMB) in Lübeck durchgeführt.

Zur immunzytochemischen Färbung der chondrogen differenzierten 3D-Aggregaten, wurden die mittels Gefriermikrotom angefertigten Schnitte auf silanisierten Objektträgern aufgenommen. Die Schnitte wurden mit einem Fettstift umrandet und nach einer 45-minütigen Inkubation in PBSAT, 1 Stunde mit dem Primärantikörper verdünnt in PBSAT bei 37 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS erfolgte die Inkubation des Sekundärantikörpers verdünnt in 0.1 % Triton (in PBS) für 35 Minuten bei 37 °C. Anschließend erfolgten drei Waschschriffe mit PBS und einer mit Wasser, bevor die trockenen Schnitte mit einem Deckglas und Eindeckmedium, welches DAPI enthielt, eingedeckelt wurden.

Immunzytochemische Färbungen zur Quantifizierung im Durchflusszytometer

Die Durchflusszytometrie bietet die Möglichkeit, den Proteinstatus einer Zellpopulation quantitativ zu bestimmen. Dazu wird eine bestimmte Anzahl von Zellen mit einem proteinspezifischen Antikörper inkubiert, wobei dieser direkt oder indirekt an einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Der gebundene Fluoreszenzfarbstoff wird mit einem Laser

angeregt und sendet Licht einer bestimmten Wellenlänge aus. Die Detektion dieses Fluoreszenzlichts wird in Bezug auf die Kontrolle als ein quantitatives Signal gemessen.

Durchführung:

Die adhärent wachsenden Zellen wurden durch eine 4-minütige Inkubation mit Trypsin/EDTA bei 37 °C von der Oberfläche des Kulturgefäßes gelöst und in ein Röhrchen überführt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen in 50 µl Primärantikörperlösung (0,5 - 1 µg Antikörper in PBS) aufgenommen und für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Ein anschließender zweifacher Waschschrift mit PBS entfernte die ungebundenen Primärantikörper. Der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper (0,5 µg) wurde in 50 µl PBS verdünnt und mit den darin suspendierten Zellen für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS wurden die Zellen in 500 µl Fixierungslösung (FACS-Fix) aufgenommen.

Bei dem Nachweis von intrazellulären Proteinen wurde das Fixierungs-/Permeabilisierungskit von BD verwendet. Die Zellen wurden für 20 Minuten in 250 µl Fixierungs-/Permeabilisierungslösung inkubiert und nach zweimaligem Waschen in der Permeabilisierungs-/Waschlösung erfolgte der Kopplungsschritt des Fluoreszenz markierten Primärantikörpers an die Proteine.

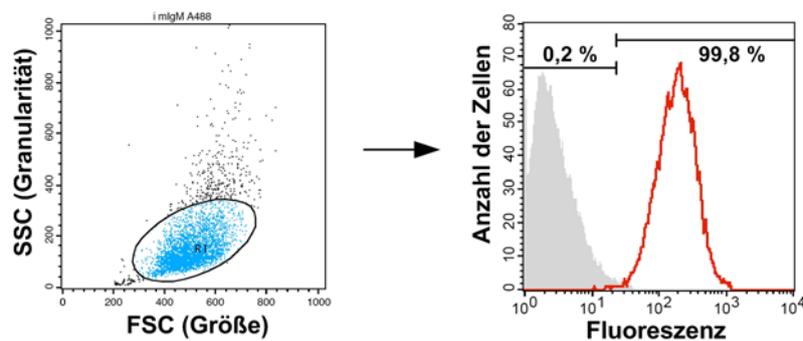


Abb. 13 Beispielhafte Darstellung der Auswertung durchflusszytometrischer Messungen

Im linken Diagramm ist die Granularität (SSC) gegen die Größe (FSC) der Zellen aufgetragen. Hier wird durch das Setzen einer Region die auszuwertende Zellpopulation festgelegt. Nach der Messung der Probe und der Isotyp-Kontrolle können beide zusammen in einer Histogramm-Darstellung übereinander gelegt werden (rechts). Die höchste Intensität der Isotyp-Kontrolle (grau) wird als Schwellenwert definiert. Zellen mit einer starken Antikörperbindung (rot) gelten als positiv, wenn ihre Fluoreszenzintensität über dem Schwellenwert liegt. In dem hier dargestellten Beispiel sind 99,8 % der Zellen positiv.

Sortieren von Zellen mittels Durchflusszytometer - FACS

Mittels FACS (fluorescence activated cell sorting) lassen sich Zellen einer fluoreszenzmarkierten Population von der Gesamtpopulation separieren. Die zu sortierende Zellpopulation wurde nach Ablösen von der Oberfläche mittels Trypsin/EDTA in PBS aufgenommen und in einem mit Ethanol (70 %) gereinigten FACS anhand des Markers GFP separiert. Die separierten Zellen wurden hierbei in ein mit BSA (4 %) beschichtetes Röhrchen, in welchem 5 ml Kulturmedium (20 % FKS) vorgelegt war, sortiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (300 x g bei RT für

5 Minuten) wurden die Zellen in Kulturmedium resuspendiert und mit ca. 3000 Zellen/cm² in Kulturflaschen kultiviert.

2.2.5 Nachweis der adipogenen Differenzierung

Oil red O-Färbung

Dient zur qualitativen Färbung eingelagerter Lipidtropfen in den Adipozyten. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 30 Minuten in Formalin (10 %) fixiert. Formalinreste wurden durch zweimaliges Waschen mit destilliertem Wasser entfernt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit Isopropanol (60 %) für 3 Minuten. Die Zellkerne wurden durch einen Inkubationsschritt mit einem DAPI-Reagenz (1 µg/ml) angefärbt. Die Färbung der Lipidvakuolen erfolgte direkt anschließend mit einer frisch angesetzten Oil red O-Färbelösung (0,18 %) für 5 Minuten. Die Zellen wurden wieder mit destilliertem Wasser gewaschen und bis zur Dokumentation in PBS bei 4 °C gelagert.

Adipogenesis-Assay

Mit Hilfe des Adipogenesis-Assays erfolgte die Quantifizierung der Oil red O-gefärbten Adipozyten. Durch rotierendes Inkubieren der Oil red O-gefärbten Zellen mit Isopropanol (60 %) auf einem Schüttler (100 UpM für 30 Minuten bei RT) löst sich der Oil red O – Farbstoff aus den Lipidtropfen. Anschließend wurde die Absorption bei der Wellenlänge 492 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 620 nm in einer 96-Loch Platte mittels eines Photometers gemessen. Der Wert der Absorption ist proportional zu dem gebildeten Fett in den Lipidtropfen der adipogen differenzierten Zellen.

2.2.6 Nachweis der osteogenen Differenzierung

Alizarinrot-Färbung

Mittels Alizarinrot kann die osteogene Kalzifizierung nachgewiesen werden. Alizarinrot bildet bei pH 4,2 mit Kalzium einen Chelatkomplex und dient so zum Nachweis von Kalzium. Die osteogen induzierten Kulturen sowie die Medium-Kontrolle wurden mit Formalin (4 %) fixiert und vorsichtig dreimal mit Wasser gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation für 30 Minuten bei RT in einer 2%-igen Alizarinrot-Lösung (pH 4,2 mit 10 % Ammoniumhydroxid eingestellt). Nach Entfernen der Alizarinrot-Lösung folgten vier Waschschriffe mit Wasser und die mikroskopische Dokumentation. Die kalzifizierte extrazelluläre Matrix der Osteoblasten erscheint rot.

von Kossa-Färbung

Die von Kossa-Färbung dient dem indirekten Nachweis von Kalzium im Gewebe durch Darstellung von Phosphaten und Karbonaten. Die in der Silbernitratlösung angebotenen Silberionen reagieren mit den Karbonat- und Phosphationen des Kalkes und verdrängen die Kalziumionen. Diese Silberionen werden durch Aldehyde zu metallischem Silber reduziert. Zum Nachweis der osteogenen Kalzifizierung wurden die osteogen induzierten Proben sowie die Medium-Kontrolle für 10 Minuten in 4 % Formalin fixiert und dreimal vorsichtig mit Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 1 Stunde dunkel bei RT in einer 5 %-igen Silbernitratlösung inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurde das gebundene Silber mittels der formaldehydhaltigen Reduktionslösung für 1 Minute inkubiert. Durch die Reduktion zu elementarem Silber erscheint in der Extrazellulären Matrix eingelagertes Kalzium dunkel braun bis schwarz.

2.2.7 Nachweis der chondrogenen Differenzierung

Alzianblau-Färbung

Alzianblau färbt Sulfat- und Karboxylgruppen in sauren Mukopolysacchariden und Glykoproteinen. Alzianblau ist ein wasserlöslicher, basischer Phtalozyaninfarbstoff. Die blaue Farbe ist auf das Kupfer im Molekül zurückzuführen. Der positiv geladene Farbstoff geht eine elektrostatische Bindung mit den sauren Gruppen der Mukopolysaccharide ein, die negativ geladen sind. Von den 3D-Aggregaten wurden mittels Gefriermikrotom 7 µm dünne Schnitte angefertigt. Die Gewebeschnitte wurden bei 37 °C auf einer Wärmeplatte für 10 Minuten erwärmt und getrocknet. Mit einem Fettstift wurden dann die Schnitte umrandet und mit 70 % Ethanol für 10 Minuten fixiert. Nach einem Waschschrift mit PBS erfolgte die Inkubation über Nacht in einer Alzianblau-Lösung (1 % Alzianblau in 3 % Essigsäure). Mit einem Waschschrift mittels 70 %-igem Ethanol wurde die ungebundene Färbelösung entfernt. In einer anschließenden Gegenfärbung wurden die Zellkerne mit Kernechtrot gefärbt.

2.2.8 Telomerlängen- und Telomeraseaktivitätsbestimmung

Bestimmung der Telomeraseaktivität

Das „Telomerase Repeat Amplification Protocol“ (TRAP) bietet die Möglichkeit, die Aktivität des Enzyms Telomerase über das Anfügen von Telomer-Wiederholungen (TTAGGG) zu messen und diese relativ gegen einen internen Standard auszudrücken. Dazu wurde das Kit „Telo TAGGG Telomerase PCR ELISAPlus-Assay“ (Roche) verwendet. Im Folgenden ist kurz das Prinzip in 2 Schritten dargestellt:

1. Elongation und Amplifikation:

Während des ersten Schrittes addiert die Telomerase der zu untersuchenden Zellen Telomer-Wiederholungen (TTAGGG) an das 3'Ende des Biotin-markierten synthetischen P1-TS-Primers. Diese Elongationsprodukte sowie der im gleichen Reaktionsgefäß enthaltene Interne Standard (IS), werden nun mittels PCR amplifiziert. Zur Verwendung kommen dabei der Biotin-markierte Primer P1-TS und der Anker-Primer P2. Die PCR-Produkte, welche aus den Elongationsprodukten der Telomerase resultieren, enthalten die telomerasespezifischen (TTAGGG)_n Sequenzen, während der IS ein 216 bp großes PCR-Produkt bildet.

2. Detektion durch ELISA:

Das in zwei Aliquots geteilte PCR-Produkt wird denaturiert und anschließend hybridisiert. Die zur Hybridisierung benutzte Digoxigenin-(DIG)-markierte Detektions-Sonde ist entweder zum Amplifikationsprodukt der Telomerase (P3-T) oder des IS (P3-Std) komplementär. Über den Biotin-markierten P1-TS Primer binden die gebildeten Produkte an die Streptavidin-markierte Mikrotiterplatte. Der Antikörper gegen Digoxigenin ist an Meerrettich-Peroxidase (Anti-DIG-HRP) gebunden und kann das Peroxidase-Substrat TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) sensitivieren (Farbumschlag von gelb nach blau). Die Intensität des entstandenen Farbumschlags kann anschließend am ELISA-Reader gemessen werden.

Die Bestimmung der Telomeraseaktivität wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Kontrolle wurde die Telomeraseaktivität der telomerasenegativen Saos-2 Zellen bestimmt.

Ein Pellet aus 2×10^5 Zellen wurde in 200 µl Lysepuffer resuspendiert, 30 Minuten auf Eis inkubiert und mit $20.000 \times g$ bei 4 °C für 20 Minuten zentrifugiert. 175 µl des Überstandes wurden in ein neues steriles Reaktionsgefäß überführt und entweder direkt weiterverwendet oder bei -80 °C gelagert.

Die Elongation des Primer P1-TS-Biotin durch das Enzym Telomerase und die Amplifikation der Produkte wurden in einem PCR-Lauf durchgeführt. Jeder Ansatz hatte ein Volumen von 50 µl und war wie in Tab. 13 zusammengesetzt.

Tab. 13 Zusammensetzung des Elongations- und Amplifikationsansatzes

Reagenz	Inhalt	Volumen, 50 µl
Reaktions-Mix	Telomerasesubstrat (Primer P1-Ts-Biotin), Anker Primer (P2), Taq-DNA-Polymerase, Nukleotide	25 µl
Interner Standard (IS)	Standard, 216 bp	5 µl
H ₂ O		17,5 µl
Zelllysat		2,5 µl

Von jeder Probe wurde eine Negativkontrolle durch 10-minütiges Denaturieren der Telomerase bei 85 °C hergestellt. Außerdem wurde je ein Ansatz mit 1 µl Kontrolltemplate low bzw. high verwendet, der entweder 0,001 mol/µl oder 0,1 mol/µl einer 8 Telomerwiederholungen langen

Kontroll-DNA enthielt. Zu diesen beiden Ansätzen wurde noch 1,5 µl Lysepuffer pipettiert. Ein weiterer Ansatz enthielt nur 2,5 µl Lysepuffer.

Tab. 14 Parameter der PCR

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Elongation Primer P1-Ts-Biotin	25 °C	20 min	1
Amplifikation:			
Denaturierung	94 °C	30 s	25
Annealing	50 °C	30 s	25
Elongation	72 °C	90 s	25
Finale Elongation	72 °C	10 min	1

Für jede Probe wurden 2 Reaktionsgefäße mit 10 µl Denaturierungsreagenz (0,5 % NaOH) vorbereitet und mit je 2,5 µl des Amplifikationsproduktes resuspendiert. Nach 10-minütiger Inkubation bei RT wurde ein Reaktionsgefäß mit 100 µl Hybridisierungspuffer T (Detektions-Probe zum Telomerase-Amplifikationsprodukt) und das andere Reaktionsgefäß mit 100 µl Hybridisierungspuffer IS (Detektions-Probe zum IS) versetzt und die Ansätze kräftig gemischt. Die Zubereitung der Negativkontrollen erfolgte auf die gleiche Weise mit Hybridisierungspuffer T. Nach Überführung von je 100 µl der einzelnen Ansätze auf eine Streptavidin-markierte Mikrotiterplatte inkubierten die Ansätze für 2 Stunden bei 37 °C unter ständigem Schütteln von 300 U/min. Danach wurde der Hybridisierungsmix vollständig entfernt und jede Kavität dreimal mit 250 µl Waschpuffer gewaschen. Im nächsten Schritt wurden 100 µl einer Anti-DIG-HRP-Lösung hinzugegeben und für 30 Minuten bei RT schüttelnd (300 U/min) inkubiert. Die belegten Kavitäten der Mikrotiterplatte wurden anschließend fünfmal mit Waschpuffer gewaschen und die Ansätze dann mit je 100 µl TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin)-Substrat 15 Minuten bei RT unter Schütteln (300 U/min) inkubiert. Ohne Entfernung des Substrats wurden 100 µl Stoppreagenz (5 % Schwefelsäure) zugegeben. Dies sorgt für einen Farbumschlag von blau zu gelb. Anschließend wurde die Absorption (A) bei der Wellenlänge 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 690 nm am ELISA-Reader innerhalb der nächsten 30 Minuten gemessen.

$$\text{Berechnung Kontrolltemplate} = \frac{\text{Absorption Kontrolltemplate} - \text{Absorption Lysepuffer}}{\text{Absorption des Internen Standards (IS) des Kontrolltemplates}}$$

Der Quotient muss zwischen 0,2 und 0,5 (low) bzw. 2,0 und 4,0 (high) liegen.

Es wurde immer das Kontrolltemplate „high“ für die Auswertung verwendet, da relativ hohe Telomeraseaktivitäten detektiert wurden.

Berechnung der relativen Telomeraseaktivität (RTA):

$$\text{RTA} = \frac{(A_{\text{Probe}} - A_{\text{negativ-Kontrolle}}) / A_{\text{interner Standard der Probe}}}{(A_{\text{Kontrolltemplate}} - A_{\text{Lysepuffer}}) / A_{\text{interner Standard der Kontrolle}}} \times 100$$

Bestimmung der Telomerlänge

Die mittlere Telomerlänge der Zellen wurde mit der Flow-FISH-Methode bestimmt. Das Prinzip dieser Methode ist die Hybridisierung einer Telomersequenz-komplementären PNA-Sonde (CCCTAA)₃, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC gekoppelt ist, an die Telomere. Die Stärke des Fluoreszenzsignals der Sonde ist dabei proportional zur Länge der telomerischen DNA.

Die Messung erfolgte an Interphase-Zellen und die 2n-Population wurde von der 4n-Population durch zusätzliche Färbung mit dem DNA-Farbstoff LDS751 abgegrenzt. Zur Messung der Telomerlänge wurden nur Zellen mit 2n DNA-Gehalt einbezogen. Die Messung erfolgte mit einem Durchflusszytometer, wobei das Fluoreszenzsignal von FITC in Fluoreszenzeinheiten (kMESF) innerhalb der 2n-Population ermittelt wurde.

Zur Bestimmung der mittleren Länge der Telomere einer Zellpopulation wurden in jedem Reaktionsgefäß Rinderthymozyten als interne Kontrolle mitgeführt. Diese sind dafür besonders gut geeignet, da ihre Population im Durchflusszytometer gegen die meisten humanen und murinen Zellen aufgrund ihrer Größe und Granularität klar abgrenzbar ist. Die Telomerlänge dieser Kontrollzellen wurde zuvor mit einer unabhängigen Methode der Telomerlängenbestimmung (Telomer Restriktions Fragment - TRF) gemessen und war in den hier verwendeten Zellen 19,515 kbp.

Wird das Fluoreszenzsignal dieser Kontrollpopulation mit dem der Zellen ins Verhältnis gesetzt, kann die mittlere Telomerlänge ermittelt werden. Da Zellen eine Eigenfluoreszenz besitzen, wurden die Zellen der gleichen Population ohne Sonde gemessen und deren Signal subtrahiert.

Die hSGSC wurden trypsinisiert und in Aufnahmepuffer resuspendiert. Die kryokonservierten fixierten Rinderthymozyten wurden aufgetaut und ebenfalls in Aufnahmepuffer aufgenommen. Alle Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt, dazu wurden drei Proben mit Sonde („tel“ für Telomere) und drei ohne Sonde („unst“ für nicht gefärbt) in 1,5 ml Reaktionsgefäßen vorbereitet.

Hybridisierung der PNA-FITC-Sonde:

Jeweils 2×10^5 zu untersuchende Zellen und 1×10^5 Rinderthymozyten wurden 30 Sekunden bei $20.000 \times g$ zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in $300 \mu\text{l}$ ($100 \mu\text{l}/1 \times 10^5$) Hybridisierungsmix „tel“ bzw. „unst“ resuspendiert. Dieser Mix enthielt sowohl deionisiertes Formamid als auch die Hybridisierungs-Sonde (nur in „tel“). Die Reaktionsgefäße wurden anschließend umgehend im Wasserbad für 15 Minuten bei $87 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert, um die DNA zu denaturieren. Zur Hybridisierung der Sonde wurden die Proben 90 Minuten bei RT dunkel inkubiert. Zum Entfernen der überschüssigen Sonde wurden die Proben dreimal mit 1 ml Waschpuffer¹ gewaschen, wobei der Puffer im ersten Waschschrift ohne vorheriges Entfernen des Hybridisierungsmixes zugegeben wurde. Nach Zugabe des Waschpuffers wurden die Zellen resuspendiert. Die Zentrifugation zwischen den Waschschriften erfolgte mit $2.000 \times g$ für 5 Minuten bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Der Überstand wurde bei den ersten zwei Waschschriften bis auf ca. $100 \mu\text{l}$

abgesaugt und beim dritten Waschschrift bis auf ca. 80 µl. Diesen Schritten folgte ein vierter Waschschrift mit 1 ml Waschpuffer². Die Zellen wurden diesmal mit 900 x g für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand bis auf ca. 50 µl abgesaugt. Für die DNA-Markierung wurden die Zellen in 300 µl LDS-Lösung resuspendiert, in FACS-Röhrchen überführt und 20 Minuten bei RT dunkel inkubiert. Bis zur Messung und während der Messung wurden die Proben dann auf Eis dunkel gelagert.

Die Fluoreszenz von LDS571 wurde im Floreszenz3-Kanal des Durchflusszytometers und die von FITC im Floreszenz1-Kanal ermittelt.

Die mittlere Telomerlänge (TL) berechnete sich wie folgt:

$$TL [kbp] = \frac{K562 \text{ „unst“} - K562 \text{ „tel“}}{Thy \text{ „unst“} - Thy \text{ „tel“}} \times 19,515 \text{ kbp (} = TL \text{ Thymozyten)}$$

Die Bestimmung der Telomeraseaktivität und der Telomerlängen erfolgten zusammen mit Dr. Ute Brassat in der Arbeitsgruppe Telomer-/Stammzellbiologie von Prof. Dr. T. Brümmendorf am Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf.

Senescence-Assay

Zum Nachweis von seneszenten Zellen in den Stammzellkulturen wurde das "Senescence histochemical staining kit" (Sigma-Aldrich) benutzt. Das Prinzip beruht auf dem enzymatischen Umsatz einer Färbelösung durch SA-β-Galaktosidase (bei pH 6) und des daraus resultierenden blauen Produkts. Unter den Bedingungen ist SA-β-Galaktosidase in seneszenten Zellen aber nicht in ruhenden Zellen oder Tumorzellen nachweisbar. Dazu wurden die Zellen mit einer Formaldehyd-Glutaraldehydlösung für 6 Minuten bei RT fixiert und nach dreimaligem Waschen mit PBS für 8 Stunden mit der vorgewärmten Färbelösung (Kaliumferrizyanid, Kaliumferrozyonide, X-gal [5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside] in DMSO, Zitronensäure) bei 37 °C (ohne CO₂) inkubiert. SA-β-Galaktosidase positive und damit seneszente Zellen erscheinen anschließend blau.

2.2.9 Automatisierte Bildverarbeitung

Zur adipogenen Differenzierung wurden 2 x 10⁴ Zellen in einem 4 cm² Kulturgefäß mit Glasboden (Becton Dickinson) ausgesät. Ab dem Erreichen der Konfluenz erfolgte die Kultivierung mit adipogenem Differenzierungsmedium bzw. Kontrollmedium. Nach einer Induktionszeit von 28 Tagen wurden die Zellen fixiert und mit Oil red O (ORO) und DAPI-gefärbt. Hellfeld- und Fluoreszenzaufnahmen mit einer Gesamtfläche von je 16,8 mm x 8,0 mm wurden mit einem motorisierten, inversen Mikroskop mit einem 10 x Objektiv und einer SIS CC12 CLR Farbkamera (1376 x 1032 Pixel) von jedem Kulturgefäß gerastert aufgenommen. Durch die optische Absorption des ORO-Farbstoffs konnten die Fetttropfen und durch die Fluoreszenz

Emission des DAPI bei 461 nm die Kerne detektiert werden. Die 192 Einzelbilder hatten je eine native Größe von 886 μm x 665 μm .

Die Berechnung der Differenzierungseffizienz erfolgte aus dem Anteil der Zellen mit einer signifikanten Menge an Lipidtropfen in Relation zu der Gesamtzahl der detektierten Zellen. Alle Einzelbilder wurden mit dem kommerziellen Bildverarbeitungsprogramm "Vision Development Module" bearbeitet, der Ablauf war mit "LabView" automatisiert. Der verwendete Algorithmus mit den originalen Vision Funktionen befindet sich im Anhang.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung humaner adulter Stammzellen aus Pankreas und Speicheldrüse

Die Identifizierung und Charakterisierung von Stammzellpopulationen hilft grundlegende entwicklungsbiologische Prozesse besser zu verstehen. Durch das Wissen über die Verteilung von adulten Stammzellen im Körper und deren Differenzierungspotential, wird derzeit davon ausgegangen, dass adulte Stammzellen ein ontogenetisches Relikt embryonaler Stammzellen darstellen. Deren Funktion ist die Aufrechterhaltung und die Regeneration bestimmter Zellpopulationen und damit die Erhaltung essentieller anatomischer und physiologischer Funktionen des Körpers.

Das Wissen über Stammzellen ist immer noch begrenzt, weshalb die intensive Forschung sowie die ausführliche Charakterisierung für das Verständnis grundlegender Vorgänge in Stammzellen zwingend notwendig sind. Unbekannt sind weiterhin die Faktoren, die für den Erhalt des Stammzellpotentials *in vitro* sorgen, oder für die Kontrolle und Steuerung molekularer Vorgänge bei Differenzierungsprozessen.

Durch die vergleichende Charakterisierung primärer Zellen, isoliert aus exokrinem Pankreas und exokriner Speicheldrüse, sollte experimentell deren Stammzellpotential ermittelt werden. Hierbei wurden u. a. die Proliferationskapazität, die Expression von Keimblatt- und Stammzellmarken und das Differenzierungspotential der Zellen untersucht. Um die Ergebnisse der Charakterisierung und Differenzierung der pankreatischen Stammzellen und Speicheldrüsen-Stammzellen besser einordnen zu können, wurden diese den intensiv beforschten mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark gegenüber gestellt.

3.1.1 Morphologie und Proliferationskapazität

Die hohe Proliferationskapazität von Stammzellen stellt *in vitro* ein wesentliches Unterscheidungsmerkmal zu somatischen Zellen dar.

Stammzellen aus dem Knochenmark (hMSC), dem exokrinen Pankreas (hPSC) und der exokrinen Speicheldrüse (hSGSC) wurden mittels ihrer Fähigkeit zur Adhärenz und Proliferation selektioniert. Dazu wurden die aus dem jeweiligen Gewebe enzymatisch und mechanisch isolierten Zellen auf Polystyroloberflächen von Standard-Kulturflaschen

kultiviert. Nicht angehaftete sowie nicht proliferierende Zellen wurden durch die Medienwechsel bzw. bei den Passagen entfernt.

Zur vergleichenden Charakterisierung ihrer Wachstumseigenschaften *in vitro* wurden aus jedem Gewebetyp zwei Populationen isoliert und untersucht. Dabei wiesen die Zellpopulationen aller Isolierungen eine heterogene Morphologie auf. Neben den bipolaren, spindelförmigen Zellen, welche den größten Teil der Populationen ausmachten, fand sich auch ein geringer Anteil großflächiger, multipolarer Zellen (Abb. 14).

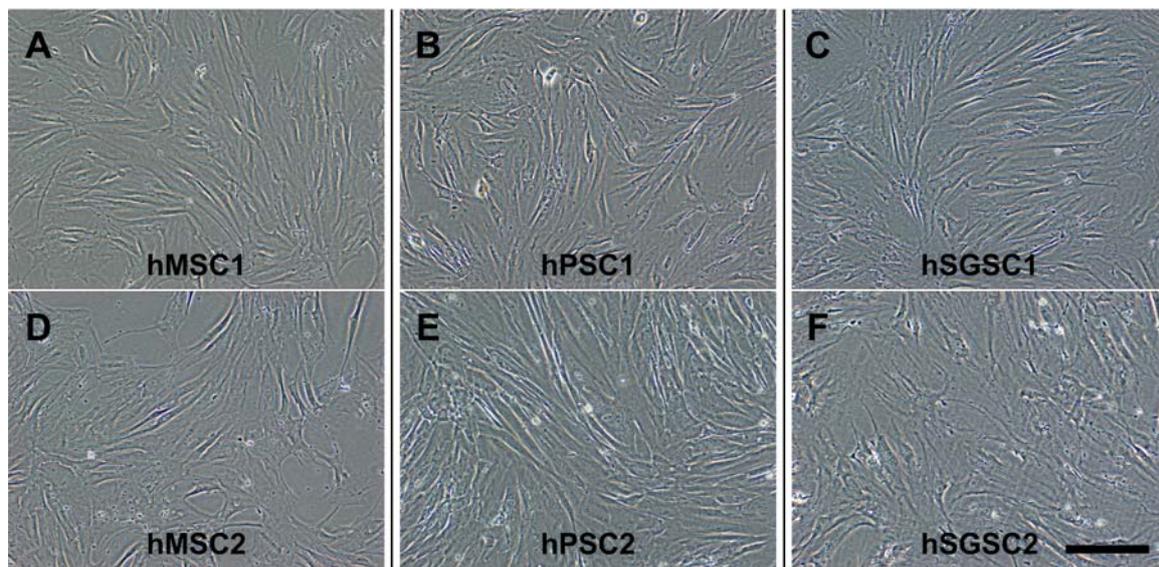


Abb. 14 Morphologie der hMSC (human mesenchymal stem cells), hPSC (human pancreatic stem cells) und hSGSC (human salivary gland stem cells) *in vitro*

Phasenkontrastaufnahmen von je zwei hMSC (A+D), hPSC (B+E) und hSGSC (C+F) Populationen. Der Größenbalken entspricht 200 μm .

In Langzeitstudien wurde das Proliferationsverhalten dieser sechs Populationen untersucht. Des Weiteren wurde bei jeder Passage die korrelierende Zellgröße ermittelt. Die hMSC1- und hMSC2-Populationen proliferierten 126 bzw. 116 Tage in Kultur und verdoppelten sich dabei 36- bzw. 21-mal, bevor sie die Zellteilung einstellten. Dies entspricht einer durchschnittlichen Verdopplungszeit von 3,5 bzw. 5,5 Tagen. Während dieser Zeit nahm die durchschnittliche Größe kontinuierlich um insgesamt 5 μm bzw. 3 μm zu (Abb. 15 A+D). Die beiden hPSC-Populationen verdoppelten sich 35- bzw. 31-mal *in vitro* bevor sie nach 171 bzw. 228 Tagen die Teilung einstellten. Die durchschnittliche Verdopplungszeit lag bei 4,8 und 7,3 Tagen. Ihre durchschnittliche Größe nahm während dieser Zeit um 10 μm bzw. 7 μm zu (Abb. 15 B+E). Die aus den Speicheldrüsen isolierten hSGSC1 und hSGSC2 proliferierten 215 bzw. 255 Tage *in vitro*

und verdoppelten sich dabei 51- bzw. 26-mal, wobei ihre Größe während dieser Zeit um 8 μm bzw. 5 μm zunahm (Abb. 15 C+F). Die durchschnittliche Verdopplungszeit der hSGSC wurde mit 5 bzw. 8,2 Tagen berechnet.

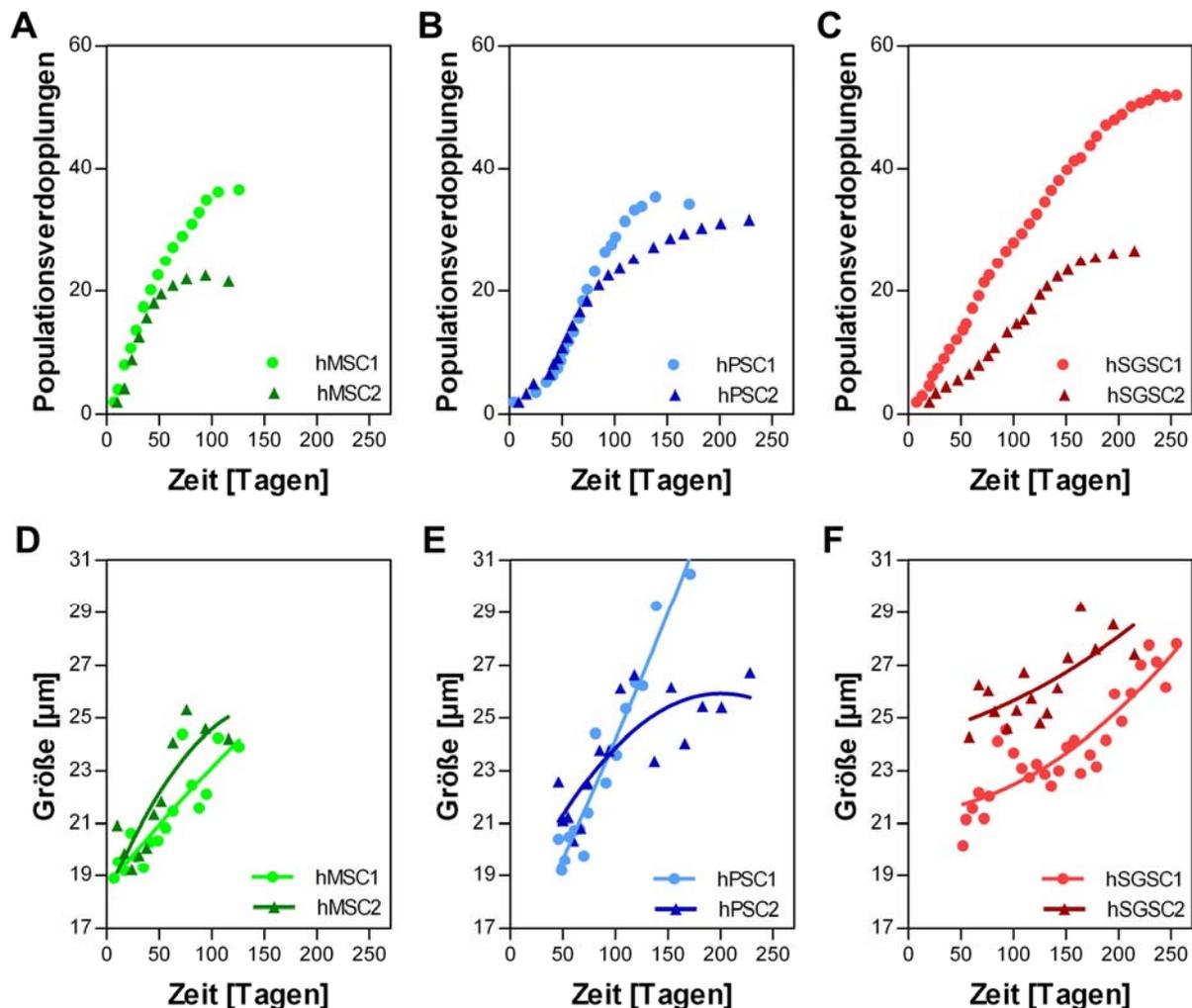


Abb. 15 Wachstumseigenschaften von hMSC, hPSC und hSGSC Populationen *in vitro*

Dargestellt sind die kumulativen Populationsverdopplungen von jeweils zwei hMSC (A), hPSC (B) und hSGSC (C) Populationen und deren durchschnittliche Größe bei den Passagen (D-F) gegen die Zeit *in vitro*. Die Darstellung der Größenveränderung (D-F) wurde durch eine polynomische Trendlinie ergänzt. Die Bestimmung der Größe der Zellen erfolgte mittels impedanzbasierter Durchflusszytometrie.

3.1.2 Zellklonierung der hPSC und hSGSC

Mit der Klonierung von Zellen wird versucht, eine homogene Zellpopulation zu gewinnen und gleichzeitig ihre Proliferationskapazität überprüft. Die Proliferationskapazität von Stammzellen ist ein wichtiges Merkmal hinsichtlich ihrer therapeutischen Anwendung und damit ein essentieller Faktor bei der Regeneration eines Gewebes. Daher wurde die klonale Proliferationskapazität der hPSC1 und hSGSC1 anhand vier

klonierter Einzelzellen überprüft. Als Ausgangspopulationen für diese Studie dienten Zellen nach zwölf Populationsverdopplungen (PD) *in vitro*.

Die hPSC1 waren in der Lage, aus einer einzelnen Zelle eine Population von $2,6 \times 10^5$ Zellen zu bilden (Abb. 16 A-C). Dies entspricht rechnerisch 16 Verdopplungen und ergibt zusammen mit der Ausgangspopulation eine Gesamtverdopplungszahl von 28, welche geringfügig unter der Verdopplungszahl der unklonierten hPSC1 mit 35 PD liegt. Einzelzellen der hSGSC1 waren nach der Zellklonierung dagegen zu 23, 25, 29 und 33 (28 ± 5) Populationsverdopplungen in der Lage, bevor sie die Teilung einstellten (Abb. 16 D-G). Dies entspricht einer Gesamtverdopplungszahl von 35, 37, 41 und 45 (40 ± 5), womit auch die klonierten hSGSC1 eine etwas geringere Verdopplung als die unklonierten hSGSC1 mit 52 PD erreichten (Abb. 16 H).

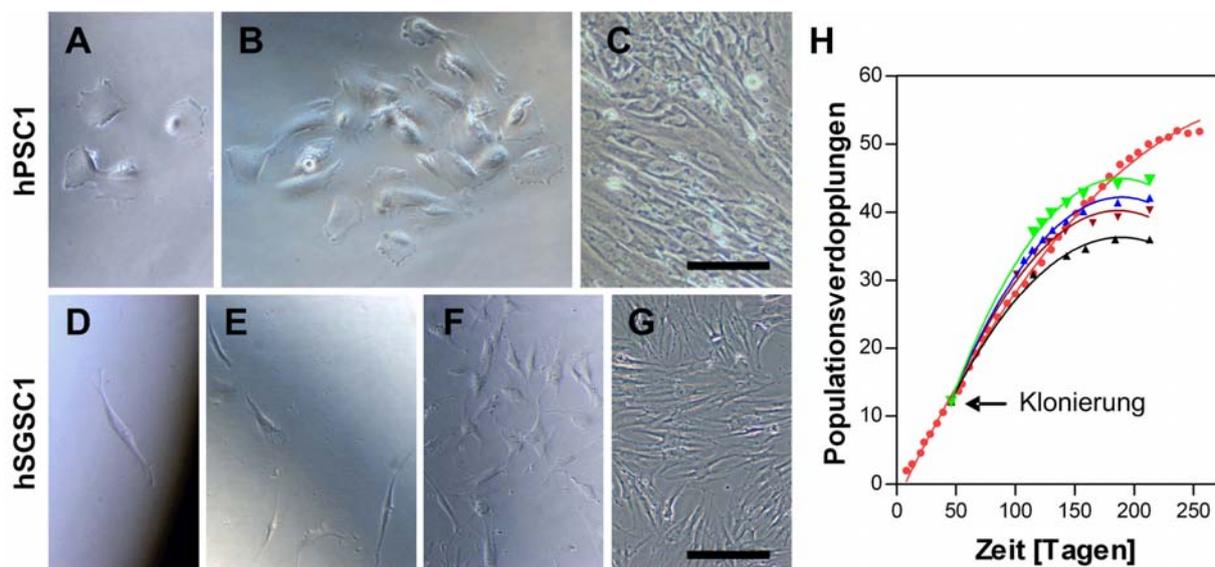


Abb. 16 Zellklonierung der hPSC und hSGSC

Phasenkontrastaufnahmen der hPSC1 nach Zellklonierung und unterschiedlichen Populationsverdopplungen *in vitro* (A-C). Phasenkontrastaufnahme der hSGSC1 nach Zellklonierung und unterschiedlichen Populationsverdopplungen *in vitro* (D-G). Wachstumseigenschaften der klonierten hSGSC1 (H): Dargestellt sind die kumulativen Populationsverdopplungen gegen die Zeit *in vitro* von vier klonierten hSGSC1 (schwarz, braun, blau, grün) im Vergleich zu den unklonierten hSGSC1 (rot), jeweils ergänzt durch eine polynomische Trendlinie. Der Größenbalken entspricht in A-C $100 \mu\text{m}$ und in D-G $200 \mu\text{m}$.

3.1.3 Telomerlängen, Telomeraseaktivität und Seneszenz in hPSC und hSGSC

Die hohe, aber begrenzte Proliferationsfähigkeit der hPSC und hSGSC sowie deren Größenzunahme lassen auf einen *in vitro* ablaufenden Alterungsprozess der Zellen schließen. Eine Möglichkeit des zellulären Alterns ist die replikative Seneszenz. Dabei

nimmt die Telomeraseaktivität und deren Einfluss auf die Telomerlängen eine wichtige Rolle ein. Beim Durchlaufen des Zellzyklus verkürzen sich die repetitiven Sequenzen der Telomere TTAGGG aufgrund der unvollständigen DNA-Replikation am Chromosomenende (End-Replikations-Problem). Ist das Enzym Telomerase in Zellen aktiv, sorgt dieses für eine Verlängerung bzw. Aufrechterhaltung der Telomersequenzen, wie es bei embryonalen Stammzellen, Leukozyten und Krebszellen der Fall ist. Die meisten somatischen Zellen besitzen keine Telomeraseaktivität, was *in vitro* zu replikativer Seneszenz und damit zu begrenzter Zellteilung führen kann. Um mögliche Auswirkungen der Seneszenz in den hPSC und hSGSC festzustellen, erfolgte die Bestimmung der Telomerlängen, der Telomeraseaktivität und die Untersuchung eines Seneszenz-Markers, der SA- β -Galaktosidase.

Während der Kultivierung der hPSC1 und hSGSC1 konnte ein Verkürzen der Telomere nachgewiesen werden. Die Telomere der hPSC1 verkürzten sich durchschnittlich um 106 ± 50 Basenpaare (bp) je Populationsverdopplung über 17 PD, anschließend stagnierte die durchschnittliche Länge der Telomere bei ca. 6,5 kbp während der restlichen Zeit in Kultur (Abb. 17 A). Die hSGSC1 zeigten eine durchschnittliche Verkürzung um 106 ± 11 bp je Populationsverdopplung während 20 PD (15 – 35 PD) und stagnierten bei ca. 5,5 kbp (Abb. 17 B).

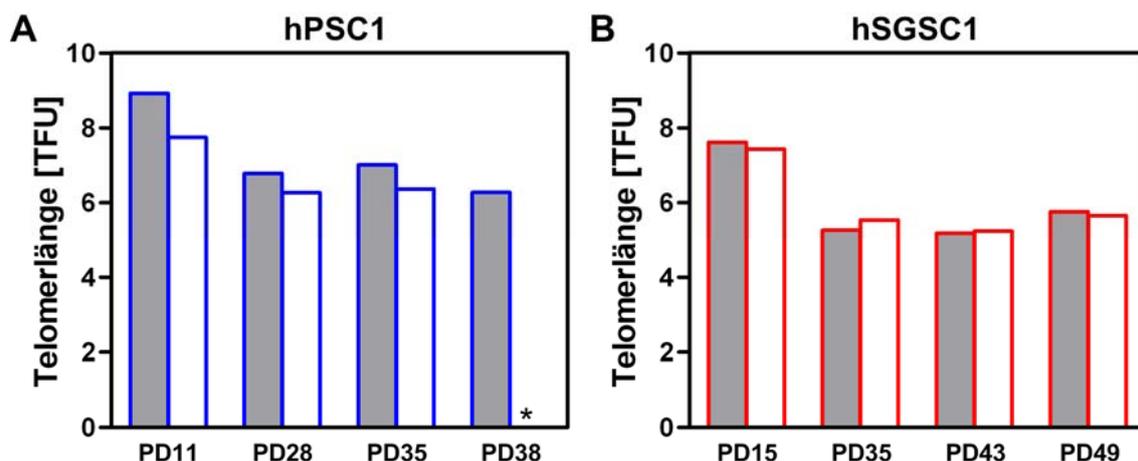


Abb. 17 Telomerlängen der hPSC und hSGSC

Mittels Flow-FISH (fluorescence in situ hybridisation) ermittelte Telomerlängen der hPSC1 (A) und hSGSC1 (B). Dargestellt sind die Telomerlängen in TFU (telomere fluorescence unit) als Doppelbestimmung nach verschiedenen Populationsverdopplungen (PD) *in vitro*. Eine TFU entspricht 1 kbp.

* Einfachbestimmung

Mittels eines TRAP-Assays (telomere repeat amplification protocol) wurde die Telomeraseaktivität der hPSC1 nach 10 und 35 PD und die der hSGSC1 nach 12 und

48 PD *in vitro* bestimmt. Zu keinem dieser Zeitpunkte konnte eine Telomeraseaktivität nachgewiesen werden. Als Referenz diente die humane Telomerase-negative epitheliale Zelllinie SAOS-2 (sarcoma osteogenic), als positive Referenz eine aus humanen embryonalen Nieren gewonnene Zelllinie HEK-293T.

Mit Hilfe eines Seneszenz-Assays können SA- β -Galaktosidase exprimierende Zellen durch eine Blaufärbung nachgewiesen werden. In Stammzellen aus allen drei untersuchten Geweben (Knochenmark, Pankreas, Speicheldrüse) konnte nach wenigen Populationsverdopplungen *in vitro* (bis 20 PD) keine SA- β -Galaktosidase nachgewiesen werden (Abb. 18 A-C). Nach einer längeren Kultivierungszeit konnten allerdings seneszente Zellen nachgewiesen werden. Nach 36 PD *in vitro* konnte in den hMSC1 SA- β -Galaktosidase nachgewiesen werden (Abb. 18 D). Auch in den hPSC1 und hSGSC1-Kulturen konnten nach 33 PD bzw. 47 PD SA- β -Galaktosidase positive Zellen nachgewiesen werden (Abb. 18 E+F).

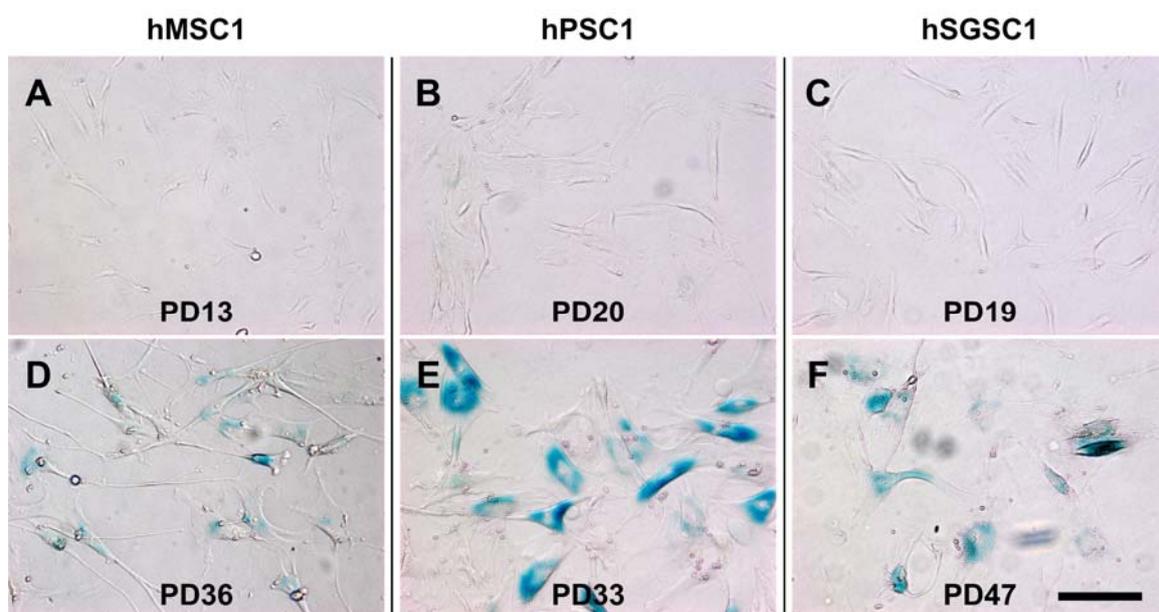


Abb. 18 Nachweis von Seneszenz bei hMSC, hPSC und hSGSC

Hellfeldaufnahmen von hMSC1 (A+D), hPSC1 (B+E) und hSGSC1 (C+F) nach unterschiedlichen Populationsverdopplungen (PD) *in vitro* und SA- β -Galaktosidase Nachweis. SA- β -Galaktosidase positive Zellen sind blau gefärbt. Der Größenbalken entspricht 200 μ m.

Die nicht vorhandene Telomeraseaktivität, die Verkürzung der Telomere und die SA- β -Galaktosidase positiven Zellen in Kombination mit der Größenzunahme über die Zeit der Kultivierung bestätigen die in den hPSC und hSGSC ablaufende replikative Seneszenz.

3.1.4 Expressionsprofil von Stammzell- und Keimblattmarkern

Aufgrund der heterogenen Morphologie der Stammzellpopulationen erfolgte deren Überprüfung hinsichtlich spontan auftretender Differenzierung. Dazu erfolgte die Untersuchung der Expression verschiedener Stammzell- und Keimblattmarker.

Charakterisierung auf mRNA Ebene

Da die Expression bestimmter Gene auf gewisse Zelltypen beschränkt ist, können diese Proteine als Marker für bestimmte Zelltypen benutzt werden. Nach 25 PD *in vitro* erfolgte die Untersuchung der mRNA-Expression hinsichtlich unterschiedlicher Stammzell- und Keimblattmarkern in hPSC2 und hSGSC2. Die Zellen wurden auf die Expression von Stammzellmarkern wie CD9, Nestin, Oct-4 (octamer-4) und Nanog untersucht. Zusätzlich erfolgte die Untersuchung der Expression von Markerproteinen, die unterschiedlichen Zelltypen der drei embryonalen Keimblätter zugeordnet werden können. Als Marker für das ektodermale Keimblatt diente PGP9.5 (protein gene product 9.5), als mesodermaler Marker wurde BMP-2 (bone morphogenic protein-2) untersucht und für das endodermale Keimblatt diente das Protein Albumin als Marker. Zur internen Kontrolle wurde die Expression des Enzyms GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) untersucht. Als Positivkontrolle und Funktionstest der individuellen Primer diente humane RNA, isoliert aus verschiedenen fötalen und adulten Organen.

In hPSC2 und hSGSC2 konnten die Stammzellmarker CD9 und Nestin sowie die Marker für embryonale Stammzellen Oct4 und Nanog nachgewiesen werden.

PGP9.5, ein Protein, das von reifen Neuronen exprimiert wird, konnte in hPSC2 und hSGSC2 als ektodermaler Marker nachgewiesen werden. hPSC2 und hSGSC2 exprimierten auch BMP-2 ein Marker für das mesodermale Keimblatt. BMP-2 wird in verschiedenen Organen wie der Lunge, Leber, Milz und Dünndarm exprimiert, induziert die Knochen- und Knorpelbildung und spielt eine wichtige Rolle während der Embryonalentwicklung.

Als Marker für das endodermale Keimblatt diente das von Hepatozyten exprimierte Albumin. In hSGSC2 konnte die mRNA, welche das Protein Albumin kodiert, nachgewiesen werden, während die hPSC2 negativ für diese mRNA waren (Abb. 19).

	hPSC2	- K	hSGSC2	- K	+ K	
GAPDH						
CD9						Stammzell- marker
Nestin						
Oct4						
Nanog						
PGP9.5						
BMP-2						mesodermaler Marker
Albumin						endodermaler Marker

Abb. 19 Nachweis verschiedener Stammzell- und Keimblattmarker bei hPSC und hSGSC

Dargestellt sind die durch Gelelektrophorese aufgetrennten Produkte der RT-PCR. Interne Kontrolle: GAPDH; Stammzellmarker: CD9, Nestin, Oct4, Nanog; Ektodermaler Marker: PGP9.5; Mesodermaler Marker: BMP-2; Endodermaler Marker: Albumin; positiv Kontrolle (+K): kommerziell erhältliche humane RNA verschiedener fötaler und adulter Organe; negativ Kontrolle (-K): bei der Reversen Transkription nicht transkribierte RNA.

Qualitative Charakterisierung der Proteinexpression

Nach der Untersuchung von Stammzell- und Keimblattmarkern auf mRNA-Ebene erfolgte der Nachweis der Proteine mittels qualitativer Immunzytochemie. Dafür wurden fixierte und permeabilisierte Zellen nach 20 - 25 PD *in vitro* auf die Expression der Stammzellmarker Nestin, SSEA-1 (stage-specific embryonic antigen-1) und AP (alkaline phosphatase), der ektodermalen Marker PGP9.5 (protein gene product 9.5), NF (neurofilament) und GFAP (glial fibrillary acidic protein), der mesodermalen Marker α -SMA (α -smooth muscle actin), Kollagen Typ 2 sowie der endodermalen Marker Amylase, Albumin, Zytokeratine 18 und 19 (CK18 und CK19) und pan-Zytokeratine (CK 1, 2, 5, 6, 7, 8, 11, 14, 16, 17 und 18) untersucht.

Zellen der hMSC1 waren positiv für den Nachweis des von reifen Neuronen exprimierenden Proteins NF und des Astrozyten Markers GFAP, also Zelltypen ektodermalen Ursprungs. Die mesodermale Differenzierungsrichtung konnte durch den Nachweis von α -SMA, CK18 und CK19 und die endodermale Differenzierung durch den Nachweis von Albumin gezeigt werden. Alle Zellen der hMSC waren positiv für Vigilin, ein ubiquitäres RNA-bindendes Protein des endoplasmatischen Retikulums,

welches bei translationaler Aktivität exprimiert wird (Abb. 20). Die Stammzellmarker Nestin, SSEA-1 und alkaline Phosphatase konnten nicht nachgewiesen werden. Weiterhin waren die hMSC1 negativ für den neuronalen Marker PGP9.5, für das Chondrozyten-spezifische Kollagen Typ 2, das Verdauungsenzym Amylase und die epithelialen pan-Zytokeratine.

Für die hPSC2 und die hSGSC1 konnte nach 22 PD *in vitro* die Differenzierung in ektodermale, mesodermale und endodermale Richtung nachgewiesen werden. Dabei war ein Teil der Zellen positiv für die Neuronen spezifische Proteine NF und PGP9.5 oder für das Astrozyten typische GFAP. Zellen der hPSC2- und hSGSC1-Kulturen exprimierten das mesodermale α -SMA glatter Muskelzellen und waren positiv für die endodermalen pan-Zytokeratine. Weiterhin waren Zellen der hPSC2 und hSGSC1 positiv für die Stammzellmarker SSEA-1 und Nestin. Der Stammzellmarker AP wurde nur von einem Teil der hPSC2, aber von allen hSGSC1 exprimiert. Das ubiquitäre Vigilin wurde von allen hPSC2 und hSGSC1 exprimiert (Abb. 20). Das von Chondrozyten produzierte Kollagen Typ 2 sowie die endodermalen Proteine Amylase, Albumin und die Zytokeratine 18 und 19 konnten in den hPSC2 wie auch in den hSGSC1 immunzytochemisch nicht nachgewiesen werden.

In den Populationen der hMSC, hPSC und hSGSC wurden spontane Differenzierungen in unterschiedliche Zelltypen der drei embryonalen Keimblättern nachgewiesen. Zusätzlich konnte in den hPSC und hSGSC die Expression verschiedener embryonaler und adulter Stammzellmarker gezeigt werden.

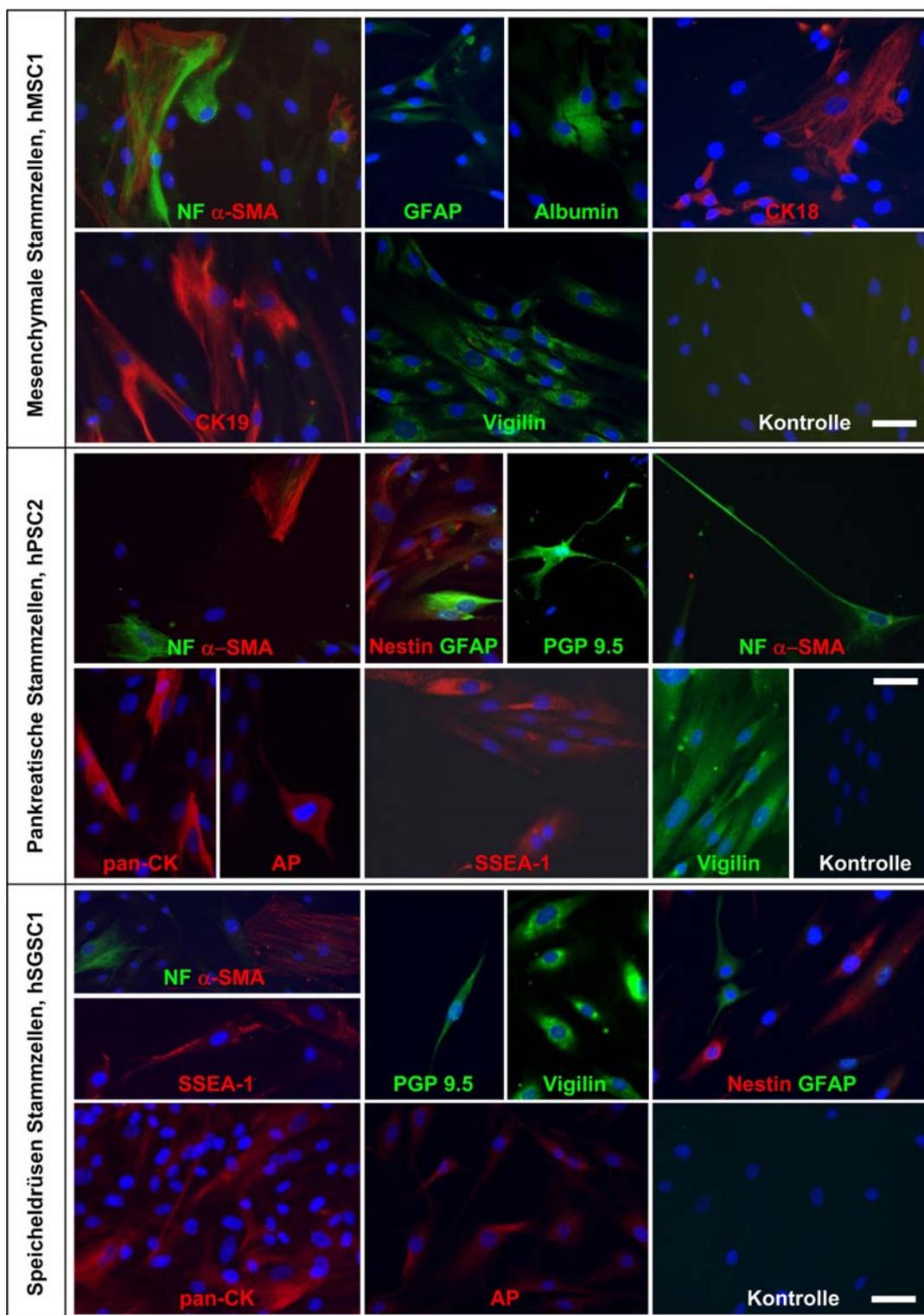


Abb. 20 Immunzytochemischer Nachweis verschiedener Stammzell- und Keimblattmarker bei hMSC, hPSC und hSGSC

Nach 25 PD *in vitro* wurden bei den hMSC1 die Proteine NF und α -SMA, GFAP, Albumin, CK18, CK19 und Vigilin nachgewiesen. Die Kontrolle wurde mit Cy3- und FITC-markierten Sekundärantikörpern inkubiert. Bei den hPSC2 erfolgte nach 22 PD *in vitro* ein positiver Nachweis der Proteine NF und α -SMA, Nestin und GFAP, PGP9.5, pan-CK, AP, SSEA-1 und Vigilin. Die Kontrolle wurde mit FITC-markiertem Sekundärantikörper inkubiert. Die hSGSC1 waren nach 20 PD *in vitro* positiv für den Nachweis der Proteine NF und α -SMA, SSEA-1, PGP9.5, Vigilin, Nestin und GFAP, pan-CK und AP. Die Kontrolle wurde mit FITC-markiertem Sekundärantikörper inkubiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Der Größenbalken entspricht 50 μ m.

Quantitative Charakterisierung der Proteinexpression

Um die Stammzellen aus Pankreas und Speicheldrüse im Vergleich zu den mesenchymalen Stammzellen und anderen adulten Stammzellpopulationen bezüglich ihres Stammzellpotentials einordnen zu können, erfolgte die Bestimmung ihres Oberflächen-Expressionsprofils. Dazu wurden die hMSC1+2, hPSC1+2 und hSGSC1+2 nach 13 - 35 PD mittels Durchflusszytometrie auf die Expression bestimmter adulter und embryonaler Stammzellmarker untersucht. Die Zellen wurden mit den jeweiligen fluoreszenzmarkierten Antikörpern behandelt und der Anteil positiver Zellen gegen die Isotyp-Kontrolle gemessen. Alle Untersuchungen erfolgten als Doppelbestimmung.

Alle sechs hier untersuchten Populationen waren positiv für die Tetraspanine CD9 (tetraspanine 29) und CD81 (tetraspanine 28). Dies sind Membranproteine, welche von adulten und embryonalen Stammzellen exprimiert werden (Tab. 15)^{83, 95, 117, 122, 124}.

Die Stammzellmarker CD29 (integrin beta 1), CD44 (hyaluronic acid receptor), CD73 (ecto-5'-nucleotidase), CD90 (thymocyte differentiation antigen 1), CD105 (endoglin) und Nestin wurden in den letzten 10 Jahren auf diversen adulten Stammzellen, die aus dem Knochenmark, dem Nabelschnurblut, dem Fettgewebe, dem Pankreas, der Milz und dem Herzen isoliert waren, nachgewiesen^{54, 73, 96, 106, 130, 142, 145, 165, 173}. Diese Stammzellmarker waren auch auf den hier untersuchten Stammzellen aus dem Knochenmark, dem Pankreas und der Speicheldrüse in hohem Maße positiv (Tab. 15).

Weiterhin wurden die hMSC, hPSC und hSGSC auf die Anwesenheit von embryonalen Markern überprüft. Das Glykolipid SSEA-3 und das Glykoprotein TRA-1-60 (tumor rejection antigen 1-60) werden von humanen undifferenzierten embryonalen Stammzellen exprimiert und bei der Differenzierung heruntergeregelt^{46, 103}. Diese drei embryonalen Marker konnten weder auf den untersuchten adulten mesenchymalen, noch auf den pankreatischen und Speicheldrüsen-Stammzellen nachgewiesen werden. Alle untersuchten Stammzellkulturen waren außerdem negativ für die hämatopoetischen Marker CD45 (protein tyrosine phosphatase, receptor type C), CD117 (C-kit) und CD133 (prominin-1) sowie für den Endothelzell-Marker CD31 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1) (Tab. 15).

Die vom Haupthistokompatibilitätskomplex codierten MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Proteinkomplexe spielen eine zentrale Rolle bei der Immunerkennung. Proteine der MHC-Klasse-I wie HLA-A, -B, -C sind auf allen kernhaltigen Zellen des menschlichen

Organismus vorhanden und dienen der Antigenpräsentation für T-Lymphozyten (T-Killerzellen) und damit der zellvermittelten Immunantwort. HLA-DR ist ein Protein der MHC-Klasse-II, ein transmembranes Glykoprotein, welches hauptsächlich von Antigenpräsentierenden Zellen wie Makrophagen, B-Lymphozyten oder Dendritischen Zellen, exprimiert wird. In beiden Messungen waren alle sechs Populationen positiv für die MHC-Klasse-I Proteine HLA-A, -B, -C und negativ für das MHC-Klasse-II Protein HLA-DR (Tab. 15).

Das Adhäsionsprotein CD106 (vascular cell adhesion molecule 1), welches auf aktivierten Endothelzellen, aber auch auf mesenchymalen Stammzellen nachgewiesen wurde ^{119, 130}, war auch auf den hier untersuchten hMSC exprimiert. Für Stammzellen aus Pankreas und Speicheldrüse war der Nachweis für CD106 negativ (Tab. 15).

CD271 (nerve growth factor receptor) war ursprünglich als Marker für neuronale Zellen des zentralen und peripheren Nervensystems beschrieben. Mittlerweile ist bekannt, dass Zellen mesenchymalen, epithelialen oder hämatopoetischen Ursprungs CD271 exprimieren. Auch mesenchymale Stammzellen aus dem Fettgewebe waren positiv für CD271 ¹¹⁴. In den in dieser Arbeit untersuchten hMSC konnte ebenfalls die Expression von CD271 in einem Teil der Population nachgewiesen werden. Die pankreatischen und Speicheldrüsen-Stammzellen waren hingegen negativ für CD271 (Tab. 15).

Tab. 15 Expressionsprofil von hMSC, hPSC und hSGSC

	hMSC1		hMSC2		hPSC1		hPSC2		hSGSC1		hSGSC2	
Adulte Stammzellmarker												
CD9	++++	++++	++++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
CD81	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
CD29	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
CD44	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
CD73	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
CD90	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
CD105	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
CD271	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nestin	++++	++++	+++	++++	++++	++++	++	+++	++++	+++	+++	+++
Embryonale Stammzellmarker												
SSEA-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TRA-1-60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hämatopoetische Marker												
CD45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD117	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD133	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Endotheliale Marker												
CD31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD106	+++	++	++++	++++	-	-	-	-	-	-	-	-
MHC												
HLA-A,B,C	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
HLA-DR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Die Zellen wurden mit dem entsprechenden Antikörper und der korrespondierenden Isotyp-Kontrolle gefärbt und die Fluoreszenzintensität mittels Durchflusszytometrie gemessen. Die Fluoreszenz der Isotyp-Kontrolle diente als Schwellenwert für die Bestimmung des jeweiligen positiven Anteils. Für jede Zellpopulation erfolgte eine Doppelbestimmung. Der Anteil positiver Zellen wurde zusammengefasst. (-) entspricht < 3 %; (+) entspricht 3 – 25 %; (++) entspricht 26 – 50 %; (+++) entspricht 51 – 75 %; (++++) entspricht 76 – 100 % positive Zellen.

Zusammenfassend besitzen die Stammzellpopulationen aus Pankreas und Speicheldrüse ein ähnliches Oberflächen-Expressionsprofil wie die mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark. Allerdings unterscheiden sie sich in der Expression von CD271 und CD106.

3.2 Induzierte Differenzierung von hMSC, hPSC und hSGSC in mesenchymale Richtung

Neben der Proliferationsfähigkeit bestimmt das Differenzierungspotential und damit die Fähigkeit unterschiedliche spezifische Zelltypen zu bilden, die Potenz von Stammzellen. Nachdem die spontane Differenzierung in Zelltypen der drei embryonalen Keimblätter für die endodermalen hPSC und hSGSC gezeigt werden konnte, erfolgte nun die Untersuchung der gezielten Differenzierbarkeit in die mesodermale Richtung (adipogen, chondrogen und osteogen). Als Vergleich dienten die hMSC aus dem Knochenmark, deren hohes Differenzierungspotential in mesenchymale Richtung bekannt ist.

3.2.1 Adipogene Differenzierung

Die Di- und Triglyzeride enthaltenden Lipidtropfen in Adipozyten dienen als Energiespeicher des Körpers. Dabei wird die für den Stoffwechsel der Zelle nicht benötigte Energie zur Synthese von Fettsäuren im Zytosol benutzt und diese hauptsächlich als Triglyzeride in den Lipidtropfen gespeichert. Bei Energiebedarf werden die Triglyzeride durch Lipolyse wieder zu Glycerin und Fettsäuren hydrolysiert und damit stehen die Fettsäuren wieder der Energiegewinnung zur Verfügung.

Zur adipogenen Differenzierung wurden die hMSC1, hPSC1 und hSGSC1 bei Erreichen der Konfluenz in adipogenem Differenzierungsmedium kultiviert. Als Hauptinduktionsfaktoren dienten dabei IBMX, Indomethazin, Dexamethason und Insulin. Bei erfolgreicher adipogener Induktion stellen die Zellen die Teilungsaktivität ein, und differenzieren sichtbar durch die Einlagerung kleiner Fetttröpfchen zu Präadipozyten. Durch die anhaltende Einlagerung von Fettsäuren und die Verschmelzung der Fetttropfen nehmen diese im Verlauf der Differenzierung zu reifen Adipozyten an Größe zu. Eine weitere Folge der adipogenen Differenzierung ist die morphologische Veränderung von der spindelförmigen Stammzelle über den Präadipozyten in die sphärische Form des ausgereiften Adipozyten. Mittels des fettlöslichen Farbstoffs Oil red O können die Lipidtropfen rot gefärbt werden.

Bei hMSC1 zeigte nach 28-tägiger Differenzierung ein großer Teil der Zellen eingelagerte Lipidtropfen, wobei die Größe und Anzahl der Lipidtropfen in den einzelnen Zellen wie auch die Form der differenzierten Zellen variierte (Abb. 21 A). Auch bei hSGSC1 konnten nach 28-tägiger Differenzierung die in Form von Fetttropfen

eingelagerten Fettsäuren in einem Teil der Zellen nachgewiesen werden (Abb. 21 C). Die Verteilung der adipogen differenzierten Zellen in den hSGSC- wie auch in den hMSC-Kulturen war heterogen und erfolgte teilweise in Clustern (Abb. 36). Die Kulturen der hPSC1 zeigten nach 20-tägiger adipogener Induktion keine eingelagerten Lipidtröpfchen, weiterhin ihre spindelförmige Morphologie, einen Rückgang in der Zellzahl und keine adipogene Differenzierung (Abb. 21 B). Bei der Kultivierung ohne adipogen induzierende Faktoren konnten in allen drei Stammzellkulturen keine Lipidtröpfchen nachgewiesen werden (Abb. 21 D-F).

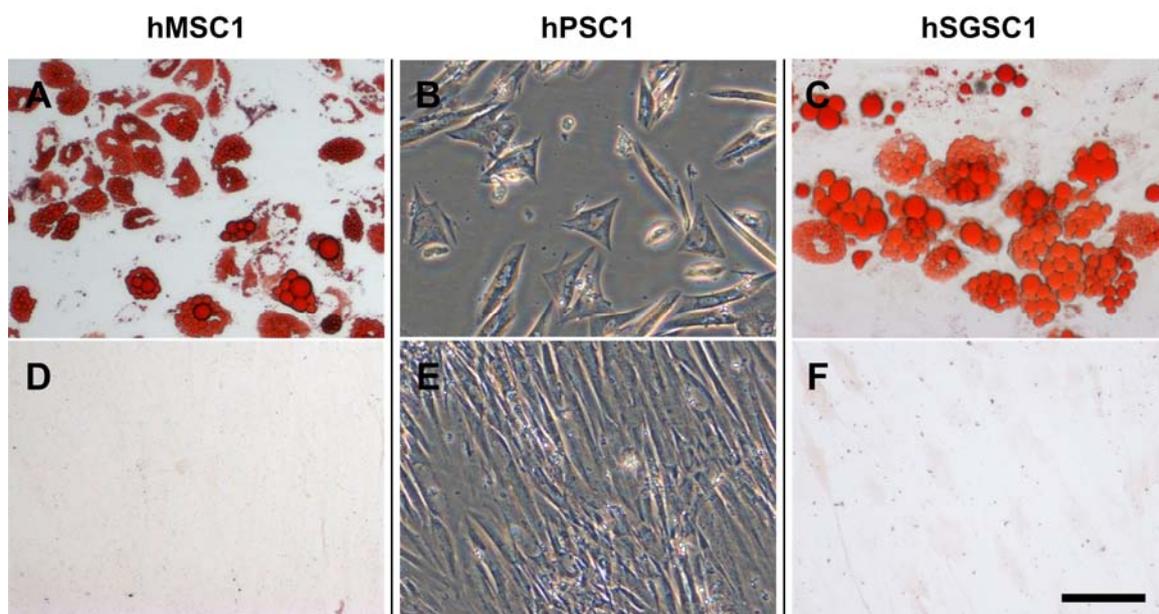


Abb. 21 Adipogene Differenzierung der hMSC, hPSC und hSGSC

Dargestellt sind Hellfeldaufnahmen der adipogen induzierten Kulturen von hMSC1 (28 Tage, A) und hSGSC1 (28 Tage, C) und Phasenkontrastaufnahmen der hPSC1 (20 Tage, B) nach Fixierung und Färbung mit Oil red O. Die adipogen differenzierten Stammzellen haben Lipidtröpfchen (rot) eingelagert (A+C). Die Mediumkontrollen (D-F) sind negativ. Der Größenbalken entspricht 100 μm .

Zur Quantifizierung der adipogenen Differenzierung der Stammzellen erfolgte die Quantifizierung der mRNA-Expression der Proteine ADRP (adipose differentiation related protein), PPARG (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) und Perilipin, welche bei der adipogenen Differenzierung entscheidende Funktionen übernehmen, mittels realtime-PCR. Dabei wurden die mRNA gegen β -Tubulin normalisiert und dann die Erhöhung in Bezug auf die Differenzierungskontrolle berechnet. ADRP ist ein Lipidtröpfchen-assoziiertes Protein, welches bereits wenige Stunden nach der adipogenen Induktion exprimiert wird, jedoch nicht in ausgereiften Adipozyten präsent ist. Der sich im Zellkern befindende PPARG reguliert als Transkriptionsfaktor verschiedene Gene, welche für den Glukose-Metabolismus der Zelle wie auch für die Fettsäureeinlagerung

verantwortlich sind. Hingegen umhüllt das Phosphoprotein Perilipin die Oberfläche der intrazellulären Lipidtröpfchen und reguliert durch die Kontrolle des Zugangs von Lipasen zu den Fetttropfen die Lipolyse.

Nach 28-tägiger Kultivierung in adipogenem Differenzierungsmedium zeigten die hMSC1 dabei eine deutliche durchschnittliche Erhöhung der mRNA-Expression, welche die Proteine ADRP (15-fach), PPARG (140-fach) und Perilipin (36700-fach) codieren (Abb. 22).

Die hPSC1 zeigten nach 18-tägiger adipogener Induktion durchschnittlich eine 5-fache Erhöhung der mRNA-Expression für den frühen adipogenen Marker ADRP, eine 15-fache Erhöhung der mRNA-Expression des Transkriptionsfaktors PPARG, aber keine Erhöhung der mRNA, welche das Lipidtröpfchen-assoziierte Perilipin kodiert (Abb. 22).

Die adipogene Differenzierung in hSGSC1 führte nach 28-tägiger adipogener Induktion zu einer durchschnittlichen Erhöhung der Genexpression der drei untersuchten Proteine, wobei die mRNA für ADRP 9-fach, für PPARG 5-fach und für Perilipin 27000-fach im Vergleich zur Kontrolle erhöht war (Abb. 22).

Die Veränderungen der Genexpression der untersuchten mRNA in hMSC1, hPSC1 und hSGSC1 durch die adipogene Induktion bestätigen vor allem bei dem funktionellen Perilipin die Ergebnisse der Oil red O-Färbung (Abb. 21).

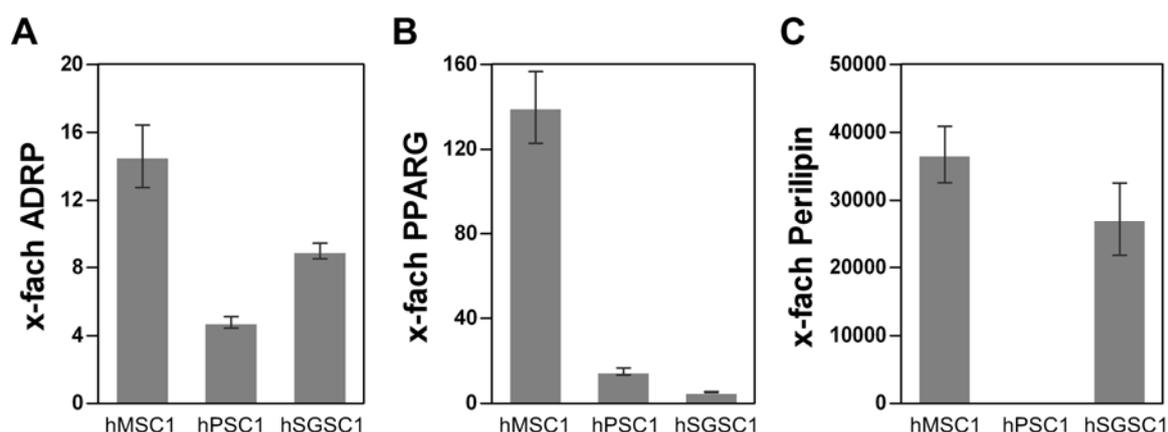


Abb. 22 Veränderung der Expression bestimmter Marker-Gene bei der adipogenen Differenzierung von hMSC, hPSC und hSGSC

Dargestellt ist die Vervielfachung der mRNA nach adipogener Induktion bei hMSC1 (28 Tage, PD11), hPSC1 (18 Tage, PD19) und hSGSC1 (28 Tage, PD19), welche ADRP, PPARG und Perilipin codieren, im Vergleich zur Kontrolle, mittels real time-PCR. Zur Normierung der Daten diente die Expression von β -Tubulin.

3.2.2 Chondrogene Differenzierung

Während der Chondrogenese differenzieren Stammzellen über das Stadium der Chondroblasten zu reifen Chondrozyten. Die Chondrozyten synthetisieren die Proteine der extrazellulären Matrix wie Proteoglykane, Glykosaminoglykane und Kollagen Typ 2. Wichtige Induktoren sind dabei die zelluläre Kondensation sowie die im Gleichgewicht wirkenden Faktoren für Proliferation und Synthese der extrazellulären Matrix. *In vitro* geschieht dies durch die Kultivierung im Pellet und mit den Mediumzusätzen ITS, L-Ascorbinsäure, Dexamethason und TGF- β 3. Dabei wirkt der Serumersatz ITS proliferativ, während L-Ascorbinsäure, Dexamethason und TGF- β 3 die Synthese der Matrixproteine induzieren.

Die Induktion der chondrogenen Differenzierung der hMSC1, hPSC1 und hSGSC1 erfolgte in 3D-Aggregaten mit den Mediumzusätzen ITS, L-Ascorbinsäure, Dexamethason und TGF- β 3. In Gefrierschnitten der Zellaggregate der drei untersuchten Populationen hMSC1, hPSC1 und hSGSC1, waren nach 28-tägiger Differenzierung die Expression von Proteoglykanen immunzytochemisch vor allem am Rand der Aggregate nachweisbar (Abb. 23 A-C). Erfolgte die Kultivierung der gleichen Zellen ohne induzierende Faktoren, waren die Zellaggregate kleiner, weniger kompakt und dadurch instabiler beim Anfertigen der Kryoschnitte. Diese Aggregate zeigten keine Proteoglykan-Expression (Abb. 23 D-F).

Durch die Färbung mit Alzianblau können Strukturen der extrazellulären Matrix wie Glykosaminoglykane (Mukopolysaccharide) nachgewiesen werden. Nach 28-tägiger Kultivierung der hMSC1, hPSC1 und hSGSC1 in chondrogenem Differenzierungsmedium zeigten die Schnitte der Aggregate aller drei Kulturen eine deutliche Blaufärbung der Glykosaminoglykanen (Abb. 23 G-I). Die Zellkerne waren mit Kernechtrot gegengefärbt. Deutlich lassen sich die Strukturen der extrazellulären Matrixproteine erkennen. Die proliferierenden Bereiche, gekennzeichnet durch viele Zellkerne, lassen sich von den differenzierten Bereichen, erkennbar durch wenige Zellkerne und viel Matrix, unterscheiden. Erfolgte die Kultivierung der drei Kulturen ohne induzierende Faktoren konnten keine Glykosaminoglykane nachgewiesen werden (Abb. 23 J-L).

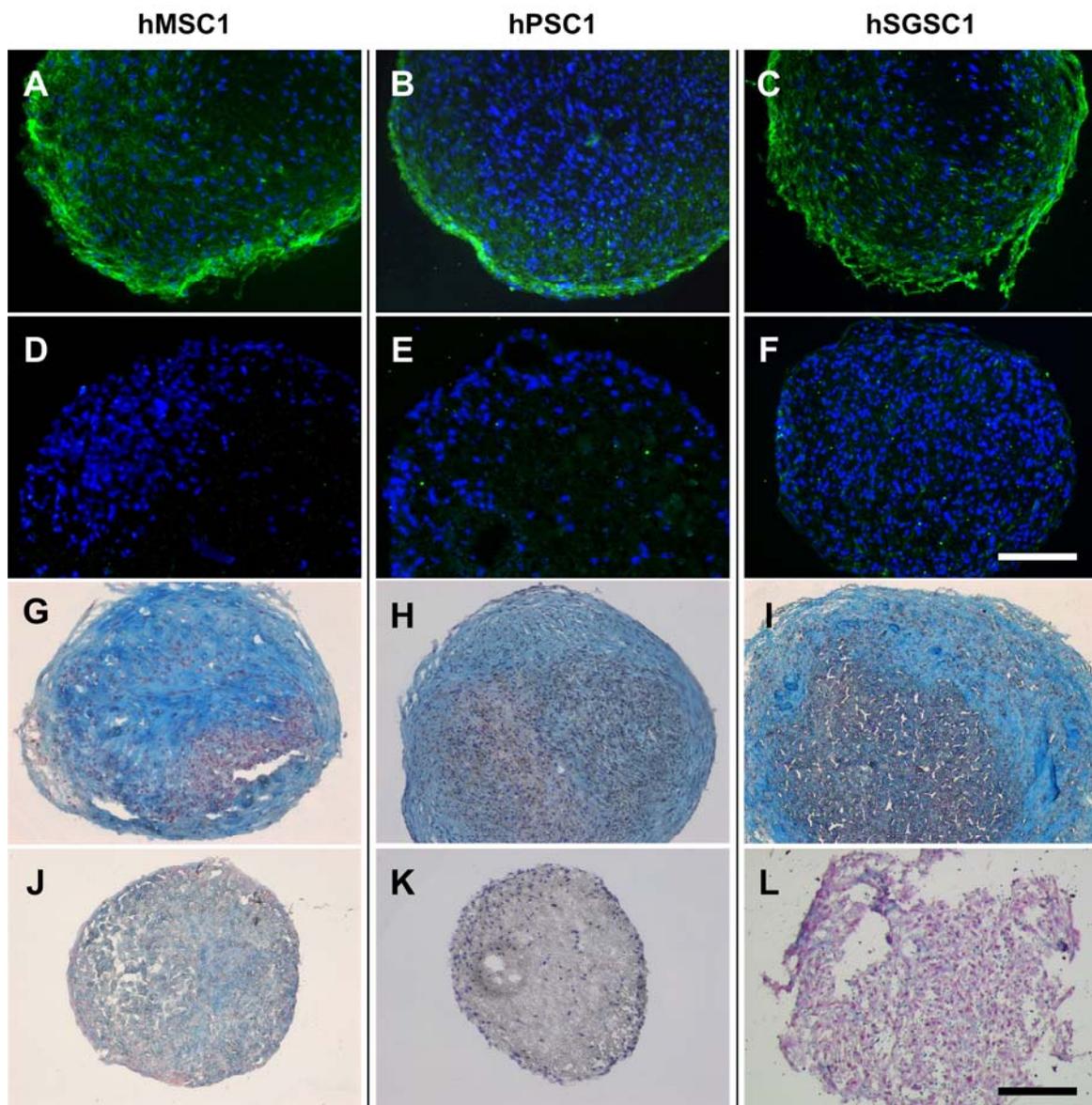


Abb. 23 Chondrogene Differenzierung der hMSC1, hPSC1 und hSGSC1 in 3D-Aggregaten

Die Zellen wurden für 28 Tage in chondrogenem Differenzierungsmedium (A, B, C und G, H, I) oder der Medium-Kontrolle (D, E, F, und J, K, L) kultiviert. Nach der Fixierung konnte Proteoglykan (grün) in den Gefrierschnitten induzierter Aggregate immunzytochemisch nachgewiesen werden (A-C). Die Zellkerne waren mit DAPI (blau) gegengefärbt. Die von Chondrozyten gebildete extrazelluläre Matrix mit den sauren Mukosubstanzen ist durch Alzianblau blau gefärbt (G-I). Die Zellkerne waren mit Hämatoxylin gegengefärbt. Der Größenbalken entspricht in A-F 100 μm , in G-L 200 μm .

3.2.3 Osteogene Differenzierung

Bei der Knochenbildung scheiden die Osteoblasten Kollagene in den extrazellulären Raum aus. In dieses Geflecht aus Kollagen geben die Osteoblasten Kalziumphosphate und Kalziumkarbonate ab. Diese kristallisieren und bilden damit die Knochenmatrix.

Nach 28-tägiger Kultivierung der hMSC1, hPSC1 und hSGSC1 mit osteogen induzierenden Faktoren wie BMP-2, Dexamethason, L-Ascorbinsäure und β -Glycerolphosphat konnte in allen drei Kulturen das fibrilläre, extrazelluläre Matrixprotein Kollagen Typ 1 immunzytochemisch nachgewiesen werden (Abb. 24 A-C). Erfolgte die Kultivierung der gleichen Zellen ohne induzierende Faktoren, war Kollagen Typ 1 nicht nachweisbar (Abb. 24 D-F).

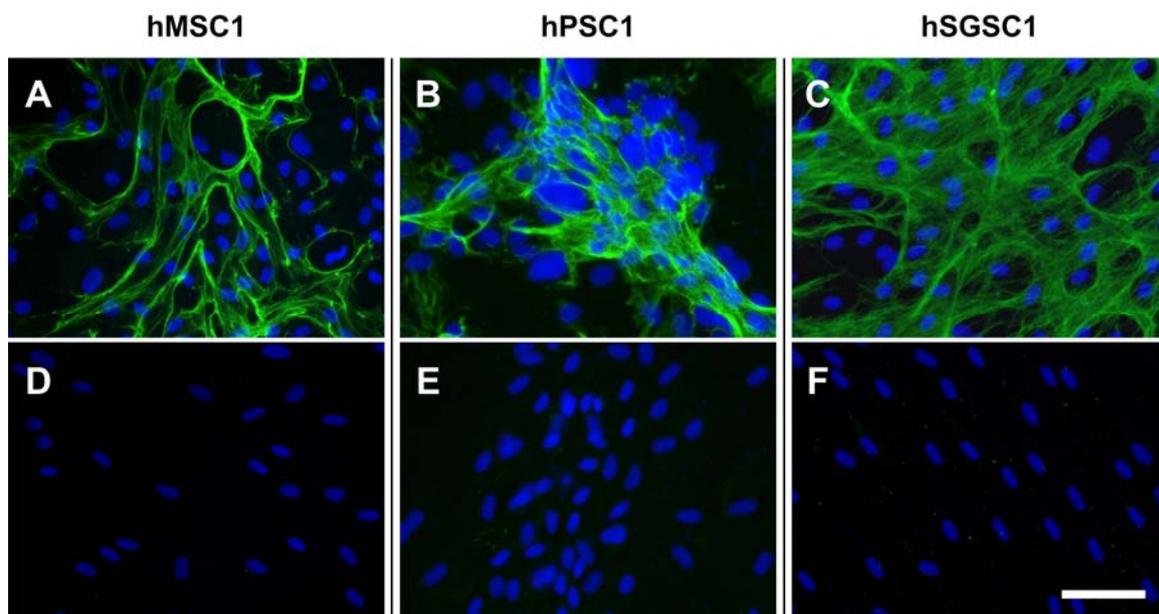


Abb. 24 Kollagenexpression von hMSC1, hPSC1 und hSGSC1

Immunzytochemischer Nachweis von Kollagen Typ 1 (A-C, grün) in hMSC-, hPSC- und hSGSC-Kulturen nach 28-tägiger osteogener Induktion und die Medium-Kontrolle (D-F). Die Zellkerne waren mit DAPI (blau) gegengefärbt. Der Größenbalken entspricht 100 μ m.

Zusätzlich wurden die drei Kulturen auf die osteogene Kalzifizierung überprüft. Zum Nachweis der Kalzifizierung dienten die Färbungen mit Alizarinrot und von Kossa. Alizarinrot bildet mit dem gebildeten extrazellulären Kalzium (Kalziumphosphate und Kalziumkarbonate) einen Chelatkomplex, welcher in der Hellfeldmikroskopie rot erscheint. In allen drei untersuchten Kulturen konnten osteogen kalzifizierte Bereiche anhand der Alizarinrot-Färbung nachgewiesen werden (Abb. 25 A-C). In den mit

Kontrollmedium behandelten Kulturen war kein kalzifizierter Bereich nachweisbar (Abb. 25 D-F).

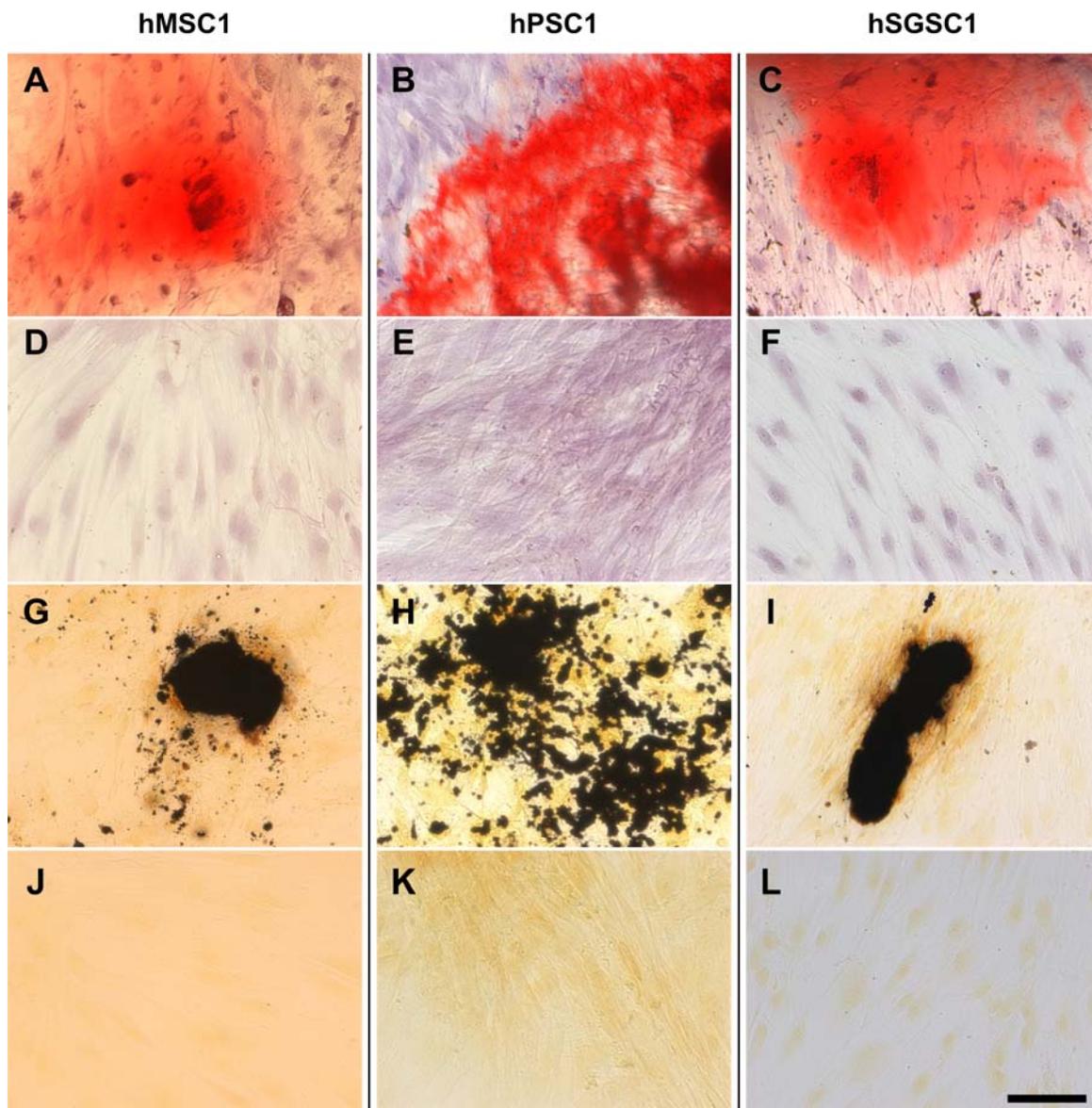


Abb. 25 Osteogene Kalzifizierung von hMSC1, hPSC1 und hSGSC1

Dargestellt sind Hellfeldaufnahmen der osteogenen Kalzifizierung von hMSC1 (8 Tage, A+G), hPSC1 (28 Tage, B+H) und hSGSC1 (17 Tage, C und 12 Tage, I) nach Kultivierung in osteogenem Differenzierungsmedium. Der Nachweis erfolgte mittels Alizarinrot (A-F, rot) und der Silberfärbung von Kossa (G-L, schwarz). Die Medium-Kontrollen sind für die Alizarinrot- (D-F) und für die von Kossa-Färbung (J-L) negativ. Der Größenbalken entspricht 100 μm .

Bei der indirekten von Kossa-Färbung werden die Kalziumionen der in der extrazellulären Matrix eingelagerten Kalziumphosphate und Kalziumkarbonate durch Silberionen ersetzt und diese zu elementarem Silber reduziert. Durch die positive von Kossa-Färbung (schwarz) konnte für die mesenchymalen, pankreatischen und Speicheldrüsen-Stammzellen die osteogene Differenzierung einschließlich der

extrazellulären Kalziumeinlagerung (mineralisierte Knötchen) nachgewiesen werden (Abb. 25 G-I). Die Kultivierung der gleichen Zellen ohne osteogene Induktionsfaktoren führte nicht zur Einlagerung von extrazellulärem Kalzium (Abb. 25 J-L).

Die hier untersuchten hMSC, hPSC und hSGSC differenzierten spontan in verschiedene Zelltypen der drei Keimblätter (3.1.4). Nach gezielter Induktion zeigten die endodermalen pankreatischen Stammzellen die Differenzierung in mesodermale Chondrozyten und Osteoblasten, während die mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark und die Speicheldrüsen-Stammzellen die Differenzierung in Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten zeigten.

3.3 Immortalisierung von Speicheldrüsen-Stammzellen mittels der katalytischen Untereinheit der Telomerase hTERT

3.3.1 Morphologie und Proliferationskapazität

Humane adulte Stammzellen besitzen ein großes Potential für die Regenerative Medizin. Viele ihrer Eigenschaften und Merkmale wie z. B. die transkriptionelle Steuerung der osteogenen Differenzierung sind aber immer noch nicht vollständig verstanden. Um deren Eigenschaften im Detail zu ermitteln, müssen aufgrund ihrer beschränkten Kultivierungszeit *in vitro* regelmäßig primäre adulte Stammzellen isoliert werden. Durch die häufigen Isolierungen unterliegen die Untersuchungen zwangsläufig spender-abhängigen und altersabhängigen Schwankungen. Um diese Schwankungen zu umgehen wäre es hilfreich, Stammzelllinien zur Verfügung zu haben, welche unbegrenzt *in vitro* kultiviert werden können und trotzdem Stammzeleigenschaften besitzen.

Durch die Transduktion der hSGSC1 mit der katalytischen Untereinheit der humanen Telomerase (hTERT, human telomerase reverse transcriptase) sollte eine dauerhafte Zelllinie mit Stammzellpotential generiert werden. Nach 29 PD und 47 PD in Kultur wurden hSGSC1 mit dem Vektorkonstrukt hTERT-GFP retroviral transduziert. Als Kontrolle dienten hSGSC1, welche mit einem Leervektor-GFP (LV-GFP) transduziert wurden. Anhand des Reporterproteins GFP konnte mittels Fluoreszenzmikroskopie der Erfolg der Integration des hTERT-Gens kontrolliert werden (Abb. 26 C).

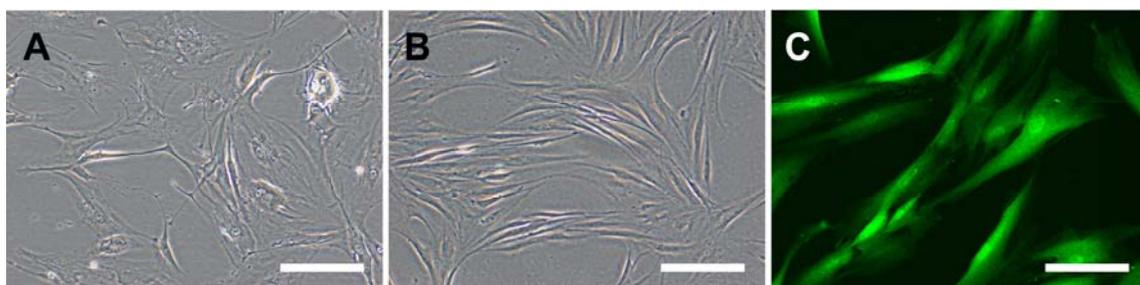


Abb. 26 Morphologische Veränderung der hSGSC durch die Transduktion mit hTERT

Zu sehen sind Phasenkontrastaufnahmen von hSGSC1 nach 51 PD *in vitro* (A) und 15 PD nach der Transduktion mit hTERT-GFP (B) sowie Fluoreszenzaufnahmen von hSGSC1 15 PD nach der Transduktion mit hTERT-GFP (C). Der Größenbalken entspricht in A+B 200 μm und in C 100 μm .

Die transduzierten Zellen proliferierten *in vitro* und nach zehn Populationsverdopplungen wurden sie anhand des Reporterproteins GFP mittels Durchfluss-

zytometrie sortiert. Der Anteil GFP exprimierender hSGSC1-PD29-hTERT konnte von 7 % auf 95 %, der hSGSC1-PD29-LV von 30 % auf 82 % und der hSGSC1-PD47-hTERT von 86 % auf 98 % erhöht werden. Die hSGSC1-PD47-LV hatten bereits nach 2 PD die Proliferation eingestellt. Die Eigenschaften der GFP-sortierten transduzierten hSGSC1 wurden anschließend in Langzeitstudien untersucht, bevor diese nach 377 Tagen (PD29+) bzw. 366 Tagen (PD47+) beendet wurden.

Die Morphologie der transduzierten, sortierten hSGSC1 veränderte sich vor allem bei den hSGSC1-PD47-hTERT hin zu einem höheren Anteil spindelförmiger, bipolarer Zellen (Abb. 26 A+B).

Die mit dem Leervektor-transduzierten (LV-GFP) hSGSC1 wuchsen langsam und stellten nach 14 PD (PD29+) die Proliferation ein (Abb. 27 A). Die hSGSC1-PD29-hTERT verdoppelten sich 74-mal in 377 Tagen und hatten mit durchschnittlich 5 Tagen eine ähnliche Verdopplungszeit wie die nativen hSGSC1 (Abb. 27 A). Dagegen verdoppelten sich die hSGSC1-PD47-hTERT 164-mal in 366 Tagen, womit sich die durchschnittliche Verdopplungszeit durch die Integration von hTERT auf 2,2 Tage verkürzte (Abb. 27 B). Die Untersuchung der Größenentwicklung der hTERT-GFP-transduzierten hSGSC1 zeigte für beide Kulturen eine deutliche Abnahme der durchschnittlichen Zellgröße. Die hSGSC1-PD29-hTERT nahmen in den ersten 100 Tagen nach der Sortierung von 24 μm auf 25 μm zu, bevor sie in den nächsten 277 Tagen auf eine Größe von 22 μm abnahmen (Abb. 27 C). Die hSGSC1-PD47-hTERT verringerten kontinuierlich ihre durchschnittliche Größe. In dem Zeitraum von 366 Tagen nach der Transduktion verringerte sich deren Größe von 22 μm auf 18 μm (Abb. 27 D).

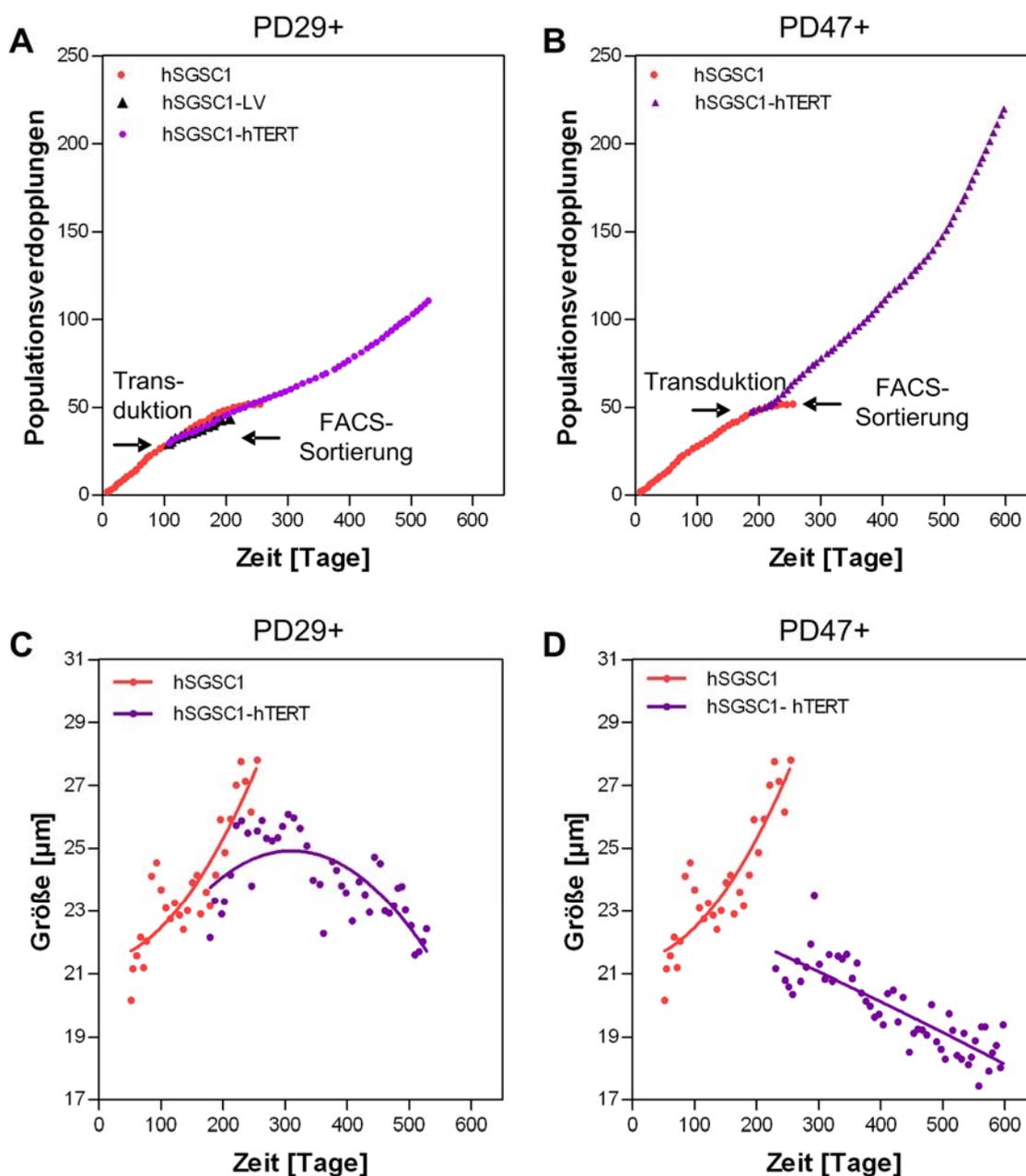


Abb. 27 Wachstumseigenschaften der hTERT-transduzierten hSGSC1 *in vitro*

Dargestellt sind die Populationsverdopplungen der mit hTERT-GFP (violett, A+B) und LV-GFP (schwarz, A) transduzierten hSGSC1 Populationen *in vitro* gegen die Zeit, im Vergleich zu den unbehandelten hSGSC1 (rot, A+B). Die Größenentwicklung in Suspension der beiden transduzierten hSGSC1-Populationen (PD29+, PD47+) *in vitro* gegen die Zeit (violett), im Vergleich zu den unbehandelten hSGSC1 (rot) ist in C und D dargestellt.

Die Daten zeigen die erfolgreiche Immortalisierung der hSGSC1, was durch die hohe Zahl der Populationsverdopplungen und die lange Kultivierungszeit belegt wird.

3.3.2 Telomeraseaktivität, Telomerlängen und Seneszenz

Aufgrund der Abnahme der Zellgröße und der unbegrenzten Proliferation der immortalisierten hSGSC1 wurde auf den Rückgang der Alterungsprozesse geschlossen. Um dies zu bestätigen, erfolgte die Untersuchung der Telomeraseaktivität, der Telomerlängen sowie der Seneszenz.

Die Bestimmung der Telomeraseaktivität mit Hilfe des "TRAPeze ELISA Telomerase Detection Kit" erfolgte von nativen, immortalisierten und den Leervektor tragenden hSGSC1. Als Negativkontrolle diente die Zelllinie Saos-2, eine primäre Osteosarcoma-Zelllinie, als Positivkontrolle wurden HEK-293T-Zellen verwendet. Dabei zeigten die nativen hSGSC1-PD29 sowie die mit dem Leervektor-GFP (PD29+12 LV) transduzierten Zellen keine Telomeraseaktivität. In den hSGSC1-PD29-hTERT konnte mit einem relativen Wert von 910 (PD29+23), 1020 (PD29+34) und 500 (PD29+52) Telomeraseaktivität nachgewiesen werden, diese Werte lagen alle deutlich unter dem der positiven HEK-293T mit 1600 (Abb. 28 A). Die nativen hSGSC1-PD47 wiesen ebenfalls keine Telomeraseaktivität auf. Dagegen zeigten die immortalisierten hSGSC1-PD47-hTERT eine Telomeraseaktivität, die mit Werten im Bereich von 500 - 600 über 52 PD konstant war (Abb. 28 B).

Mittels Flow-FISH wurde von den gleichen Zellen in Dreifachbestimmungen die Telomerlänge bestimmt. Dabei konnte gezeigt werden, dass durch die stabile Integration von hTERT die durchschnittliche Länge der Telomere in hSGSC1-PD29 von 5,1 kbp auf 16,7 kbp, 19,2 kbp und 23,5 kbp nach 23, 34 und 52 Populationsverdopplungen zunahm. Dies entspricht einer durchschnittlichen Verlängerung der Telomere um 354 Basenpaare je Populationsverdopplung. Die Telomere der mit dem GFP-Leervektor-transduzierten hSGSC1 (PD29+12 LV) lagen mit 6,5 kbp in dem Bereich der unbehandelten Zellen (Abb. 29 A). Für die hSGSC1-PD47 konnte eine Verlängerung der Telomere von 6,5 kbp auf 10,2 kbp innerhalb 31 PD nach der Transduktion gezeigt werden. Dies entspricht einer durchschnittlichen Verlängerung um 119 bp je Populationsverdopplung. Während der Kultivierung von weiteren 20 (PD47+51) und 32 PD (PD47+83) stagnierte die Länge der Telomere im Bereich von 9 - 12 kbp (Abb. 29 B).

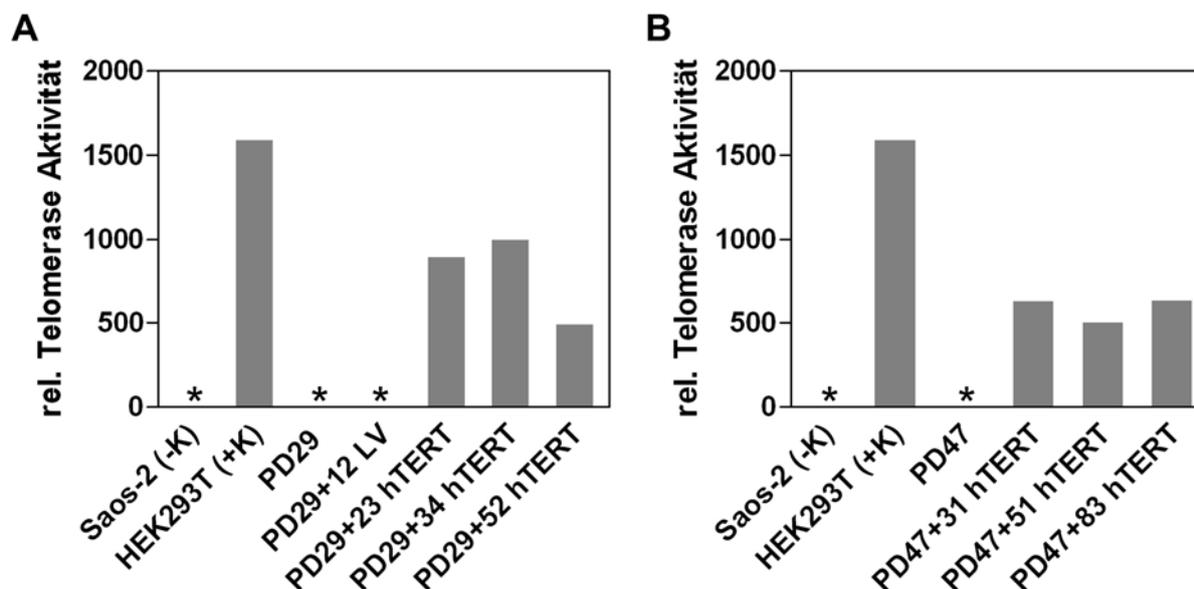


Abb. 28 Telomeraseaktivität der hTERT-GFP-transduzierten hSGSC

Mittels TRAP-Assay ermittelte Telomeraseaktivität der hTERT-GFP-transduzierten hSGSC1-Populationen (A, PD29+ und B, PD47+) sowie Zellen, welche als Negativ- (Saos-2, -K) und Positiv- (HEK293T, +K) Kontrolle dienen. Dargestellt ist die relative Telomeraseaktivität zum Zeitpunkt der Transduktion und zu unterschiedlichen Zeitpunkten danach. (*) kennzeichnet Messwerte unterhalb der Detektionsgrenze.

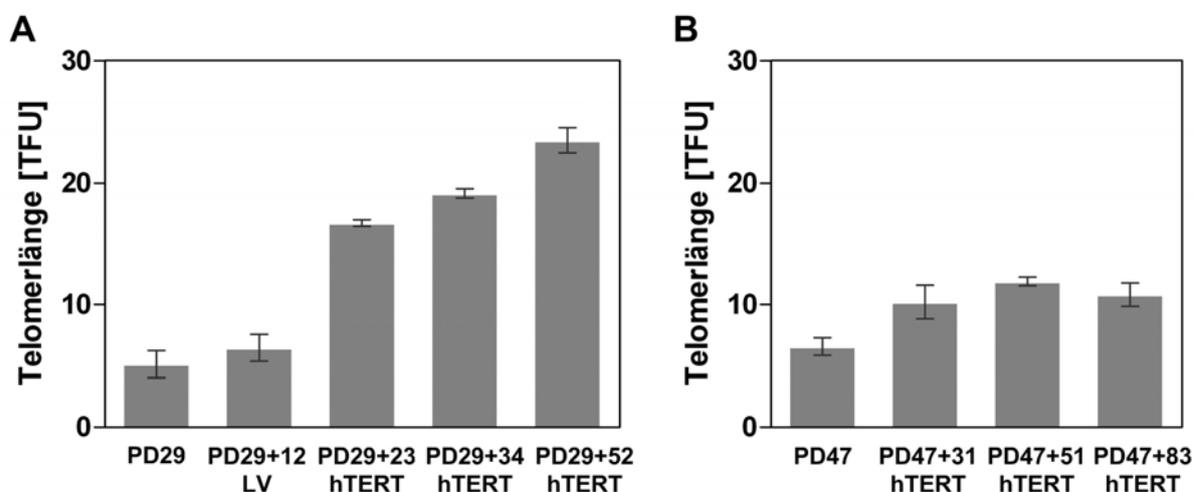


Abb. 29 Telomerlängen der hTERT-GFP-transduzierten hSGSC

Mittels Flow-FISH ermittelte Telomerlängen von zwei hTERT-GFP-transduzierten hSGSC1-Populationen (A, PD29+ und B, PD47+). Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung der Telomerlängen in TFU (telomere fluorescence unit) zum Zeitpunkt der Transduktion und zu unterschiedlichen Zeitpunkten danach. 1 TFU entspricht 1 kbp.

Weiterhin wurde in den immortalisierten hSGSC1 die SA- β -Galaktosidaseaktivität überprüft. Die hSGSC1 waren vor der hTERT-Integration (PD29 + PD47) SA- β -Galaktosidase positiv. In den immortalisierten hSGSC1-Kulturen nahm mit zunehmenden Populationsverdopplungen bei beiden, hSGSC1-PD29-hTERT und hSGSC1-PD47-hTERT, der Anteil SA- β -Galaktosidase-positiver Zellen deutlich ab (Abb. 30).

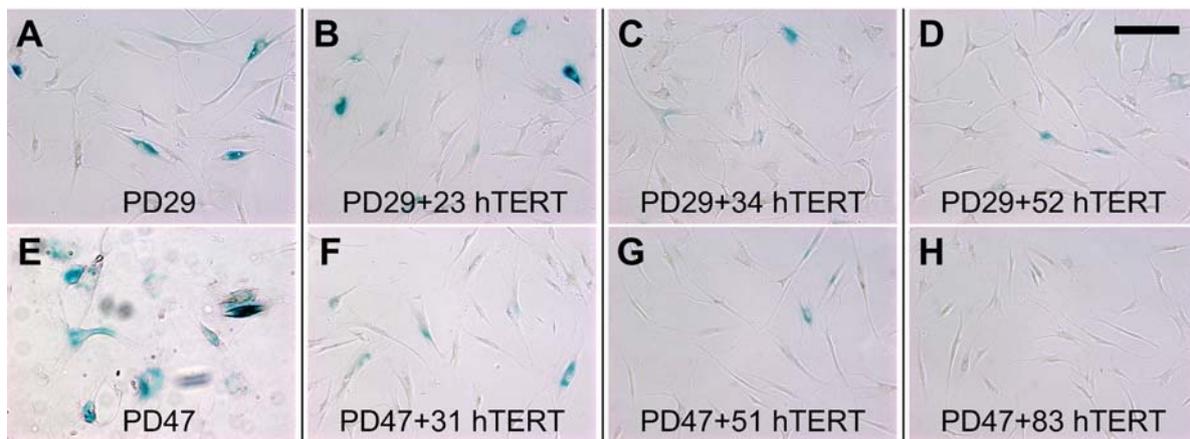


Abb. 30 Rückgang der Seneszenz bei hTERT-GFP-immortalisierten hSGSC1

Nachweis der SA-β-Galaktosidase als Seneszenz-Marker in hSGSC1 zum Zeitpunkt der Transduktion und zu unterschiedlichen Zeitpunkten danach. Seneszente Zellen sind blau gefärbt. Der Größenbalken entspricht 200 µm.

In den Telomerase-negativen hSGSC1 konnte somit durch die Integration der katalytischen Untereinheit hTERT die Telomerase erfolgreich aktiviert werden. Zudem zeigten sich eine Zunahme der Telomerlängen und ein Rückgang des Anteils seneszenter Zellen.

3.3.3 Expressionsprofil

Die aufgrund der stabilen Integration von hTERT immortalisierten hSGSC1 wurden zur Bestimmung ihres Stammzellpotentials auf ihr Oberflächen-Expressionsprofil untersucht.

Die immortalisierten hSGSC1-PD29-hTERT wurden nach 44 PD und die hSGSC1-PD47-hTERT nach 44, 78 und 169 PD im Durchflusszytometer auf die quantitative Expression verschiedener (Stammzell-)Marker untersucht. Dabei zeigte sich für die adulten Stammzellmarker CD9, CD81, CD29, CD44, CD73 und CD90 keine Veränderung zu den unbehandelten Zellen (Tab. 16). Alle Marker wurden in hohem Maße von den immortalisierten hSGSC1-PD29-hTERT und hSGSC1-PD47-hTERT exprimiert. Durch die Transduktion unverändert blieb auch die Expression der embryonalen Stammzellmarker SSEA-1 und Tra-1-60 und der Marker für mesenchymale Stammzellen CD271. Alle drei Proteine waren nicht nachweisbar. Auch die Expression der hämatopoetischen Marker CD45, CD117 und CD133 sowie der endothelialen Marker CD31 und CD106 blieben unverändert und waren auch nach der ektopischen Telomerase-Expression nicht nachweisbar. Ebenfalls unverändert durch die Immortalisierung blieb die hohe

Expression der MHC-Klasse-I Proteine HLA-A, -B, -C und das nicht exprimierte MHC-Klasse-II Protein HLA-DR auf den hSGSC1 (Tab. 16).

Tab. 16 Veränderung des Expressionsprofils bei hSGSC1 nach der Immortalisierung durch hTERT

	hSGSC1 PD21-PD31	hSGSC1 PD29+44 hTERT	hSGSC1 PD47+44 hTERT	hSGSC1 PD47+78 hTERT	hSGSC1 PD47+169 hTERT
adulte Stammzellmarker					
CD9	98 ± 1 %	97 %	97 %	99 %	97 %
CD81	98 ± 1 %	99 %	99 %	99 %	99 %
CD29	99 ± 1 %	99 %	99 %	99 %	99 %
CD44	99 ± 1 %	99 %	99 %	99 %	99 %
CD73	99 ± 1 %	99 %	99 %	99 %	99 %
CD90	95 ± 5 %	99 %	99 %	99 %	99 %
CD105	92 ± 5 %	73 %	78 %	91 %	60 %
CD271	0 ± 0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
Nestin	80 ± 10 %	56 %	95 %	97 %	96 %
embryonale Stammzellmarker					
SSEA-3	0 ± 0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
Tra-1-60	0 ± 0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
hämatopoetische Marker					
CD45	0 ± 0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
CD117	0 ± 0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
CD133	0 ± 0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
endotheliale Marker					
CD31	0 ± 0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
CD106	0 ± 0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
MHC					
HLA-A,B,C	99 ± 1 %	99 %	95 %	99 %	99 %
HLA-DR	0 ± 0 %	0 %	0 %	0 %	0 %

Die Zellen wurden mit dem entsprechenden Antikörper und der korrespondierenden Isotyp-Kontrolle gefärbt und die Fluoreszenzintensität mittels Durchflusszytometrie gemessen. Die Bestimmung des jeweiligen Anteils positiver Zellen erfolgte gegen die Isotyp-Kontrolle. Die Werte entsprechen dem Anteil positiver Zellen in Prozent, auf ein Prozent gerundet.

Das Typ1 Membran Glykoprotein CD105 (Endoglin) ist Teil des TGF- β -Rezeptor-Komplexes und ist an der Bindung der Wachstumsfaktoren TGF- β 1 und TGF- β 3 sowie BMP2 und BMP7 beteiligt und damit Teil des TGF- β -Signalwegs. CD105 ist an der Organisation des Zytoskeletts beteiligt und wurde bisher auf Endothelzellen, Makrophagen, Fibroblasten, glatten Muskelzellen und adulten Stammzellen verschiedenen Ursprungs nachgewiesen. Die Expression von C105 auf den hSGSC1-hTERT schwankte. Von einer einheitlich hohen Expression vor der hTERT-Integration

(92 ± 5 %) sank der Anteil CD105-exprimierender Zellen in der hSGSC1-PD47-hTERT im Zeitraum bis 44 PD nach der hTERT-Integration auf 78 %. Nach weiteren 34 PD exprimierten 91 % der hSGSC1-PD47-hTERT CD105. Nach insgesamt 169 PD nach der hTERT-Integration lag der Anteil CD105 positiver Zellen bei 60 %. Bei den hSGSC-PD29-hTERT nahm die Expression von CD105 nach 44 PD auf 73 % ab (Tab. 16).

Das Intermediärfilament Nestin, welches in unterschiedlichen adulten Stammzellen exprimiert wird und oft auf Stammzellen aus dem Pankreas nachgewiesen wurde, konnte nach einer hohen Expression (80 ± 10%) in den unbehandelten hSGSC1 auf 95 %, 97 % und 96 % der hSGSC1-PD47-hTERT nachgewiesen werden. In den hSGSC1-PD29-hTERT sank der Anteil Nestin exprimierender Zellen nach 44 PD auf 56 % (Tab. 16).

Auch nach der Immortalisierung durch die stabile Integration von hTERT und die daraus resultierende ektopische Expression der Telomerase zeigen die hSGSC1 weiterhin den Phänotyp adulter Stammzellen.

3.3.4 Adipogene Differenzierung

Da die hSGSC1 auch nach der Immortalisierung ein Expressionsprofil von Stammzellen zeigen, wurde exemplarisch anhand der adipogenen Differenzierung überprüft, inwiefern sie weiterhin auch noch Differenzierungspotential besitzen. Dazu wurden hSGSC1 vor (PD29 und PD47) und zu unterschiedlichen Zeiten nach der Integration von hTERT (PD29+24, PD29+62 und PD47+41, PD47+120, PD47+172) für 28 Tage in adipogenem Differenzierungsmedium kultiviert. Der Nachweis der von Adipozyten gebildeten Lipidtropfen erfolgte mittels Oil red O-Färbung. Die hSGSC1-PD29-hTERT konnten nach verschiedenen Populationsverdopplungen nicht adipogen differenziert werden, sie zeigten keine Einlagerung von Lipidtropfen (nicht gezeigt). In hSGSC1, nach 47 PD *in vitro*, konnten nach adipogener Induktion nur sehr kleine Lipidtropfen nachgewiesen werden (Abb. 31 A). Nach deren Immortalisierung zeigten die Zellen mit zunehmender Kultivierungszeit und zunehmenden Populationsverdopplungen auch einen deutlicheren adipogenen Phänotyp. Die Größe der Lipidtropfen nahm zu und die Morphologie einiger adipogen differenzierter Zellen veränderte sich von einer spindelförmigen hin zu einer sphärischen (Abb. 31 C, D). Erfolgte die Kultivierung der gleichen Kulturen in adipogenem Kontrollmedium, war keine Einlagerung von Lipiden und damit keine adipogene Differenzierung nachweisbar (Abb. 31 E-H).

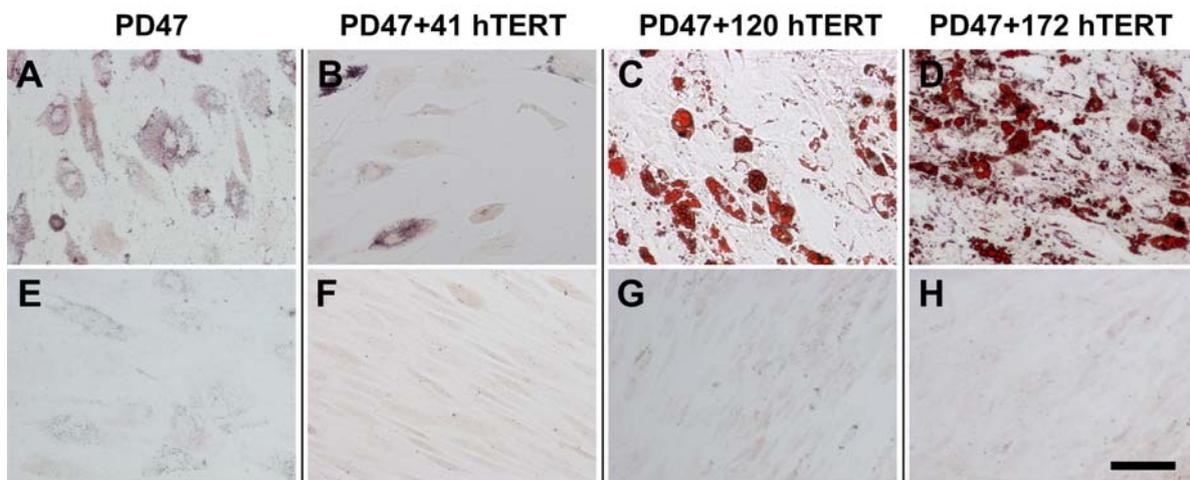


Abb. 31 Adipogene Differenzierung der hTERT-transduzierten hSGSC1

Nach 28-tägiger Kultivierung in adipogenen Differenzierungsmedium wurden die Zellen fixiert und mit Oil red O gefärbt. Dargestellt sind Hellfeldaufnahmen der transduzierten hSGSC1 vor (A+E, PD47) und verschiedene PD nach der Transduktion (B+F, PD47+41; C+G, PD47+120; D+H, PD47+172). Die von den Adipozyten eingelagerten Lipidtropfen sind rot gefärbt. Der Größenbalken entspricht 100 μm .

Die Ergebnisse der histochemischen Oil red O-Färbungen wurden durch eine Hochregulation der Expression adipogener Gene bestätigt. Ebenfalls nach 28-tägiger adipogener Induktion erfolgte die Untersuchung der Expression des Transkriptionsfaktors PPARG, des frühen adipogenen Markerproteins ADRP sowie des Lipidtropfen-assoziierten Proteins reifer Adipozyten, Perilipin. Die Expressionserhöhung der drei Gene nach adipogener Induktion gegenüber der im Kontrollmedium kultivierten hSGSC1 wurde ermittelt. In hSGSC1 konnte nach 29 PD eine Expressionserhöhung aller drei Gene nachgewiesen werden. Nach deren Immortalisierung war zwar die Expression der frühen Marker ADRP und PPARG durch die adipogene Induktion erhöht, eine Erhöhung des funktionellen Perilipin konnte aber weder 24 PD noch 62 PD nach der Immortalisierung in einem relevanten Bereich gezeigt werden (Abb. 32 A-C).

Die hSGSC1 zeigten nach 47 PD durch die adipogene Induktion eine starke Expressionserhöhung der frühen Marker ADRP und PPARG, aber keine Erhöhung des Lipidtropfen-assoziierten Perilipin. Erst durch die Immortalisierung kam es nach 41 PD zu einer leichten (209-fach) und nach 120 PD zu einer starken (27500-fach) Zunahme der Expression von Perilipin (Abb. 32 D-F).

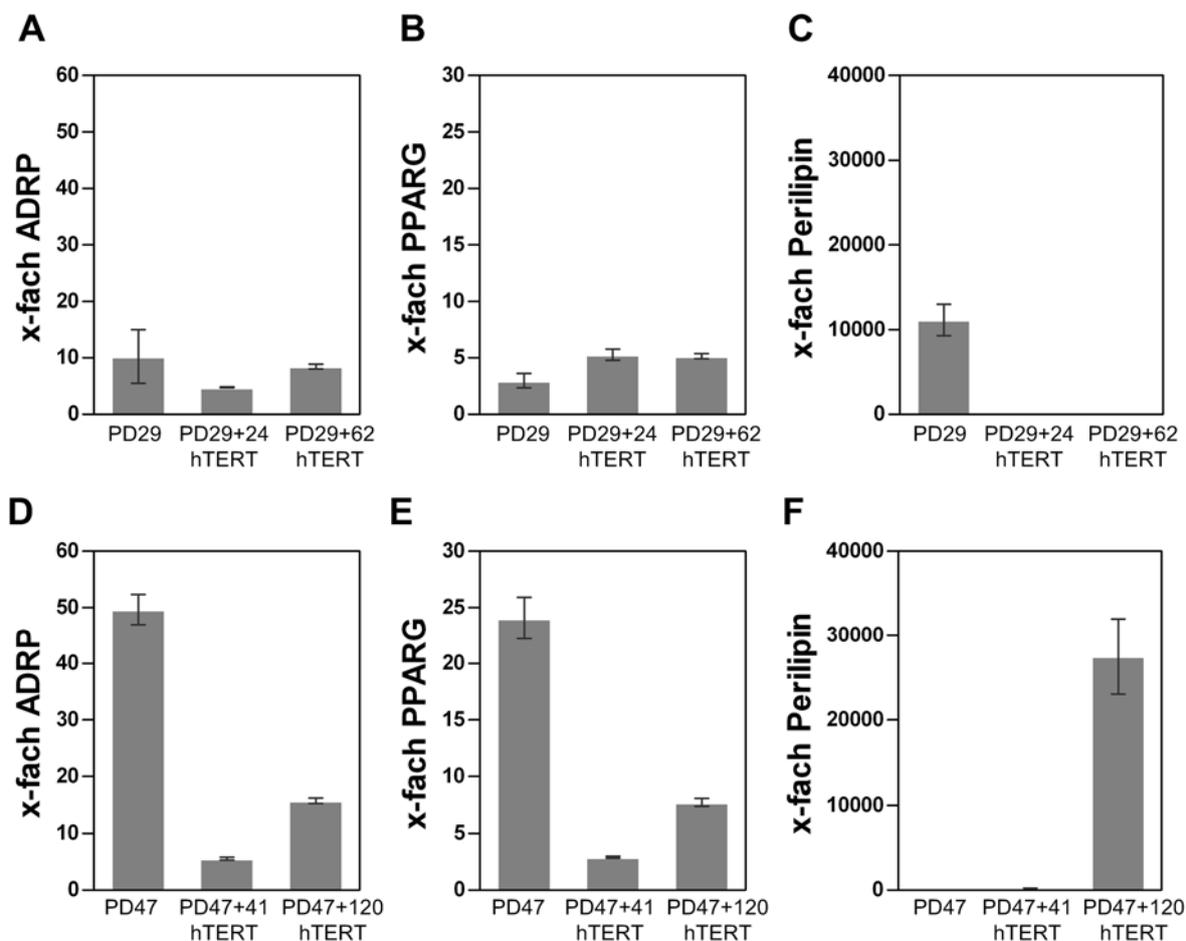


Abb. 32 Genexpressionsveränderung durch die adipogene Differenzierung bei hTERT-GFP-transduzierten hSGSC

Dargestellt ist die mittels real-time PCR ermittelte Vervielfachung der Genexpression von Perilipin, PPARG und ADRP nach 28-tägiger adipogener Induktion der hSGSC1. Die Bestimmung erfolgte vor der Transduktion (PD29 und PD47) und nach unterschiedlichen Populationsverdopplungen nach der Transduktion mit hTERT-GFP (PD29+24, PD29+62 und PD47+41, PD47+120).

Der Verlauf der adipogenen Differenzierung ist in Abb. 33 zusammengefasst. Die Quantifizierung der adipogenen Differenzierung durch drei verschiedene Methoden (real-time PCR, Adipogenesis-Assay, automatisierte Bildverarbeitung) zeigt einen replikativen Verlust der adipogenen Differenzierbarkeit der hSGSC1. Waren nach 19 PD noch ca. 9 % der Zellen differenzierbar, lag der Anteil nach 31 PD nur noch bei ca. 1 % und nach 47 PD bei 0 - 0,5 % (Abb. 33 C). Durch die Immortalisierung der hSGSC änderte sich die adipogene Differenzierungsrate während der ersten 41 PD nicht (0 %). Erst nach der Kultivierung über weitere 79 PD (120 PD nach der Immortalisierung) erlangten die hSGSC ihre Differenzierbarkeit zurück und 7 % der Zellen konnten adipogen differenziert werden (Abb. 33 C). Durch weitere Kultivierung der immortalisierten hSGSC1 (172 PD) wurde sogar die Differenzierungsrate von 9 %, entsprechend der von hSGSC1 nach 19 PD, erreicht (nicht gezeigt).

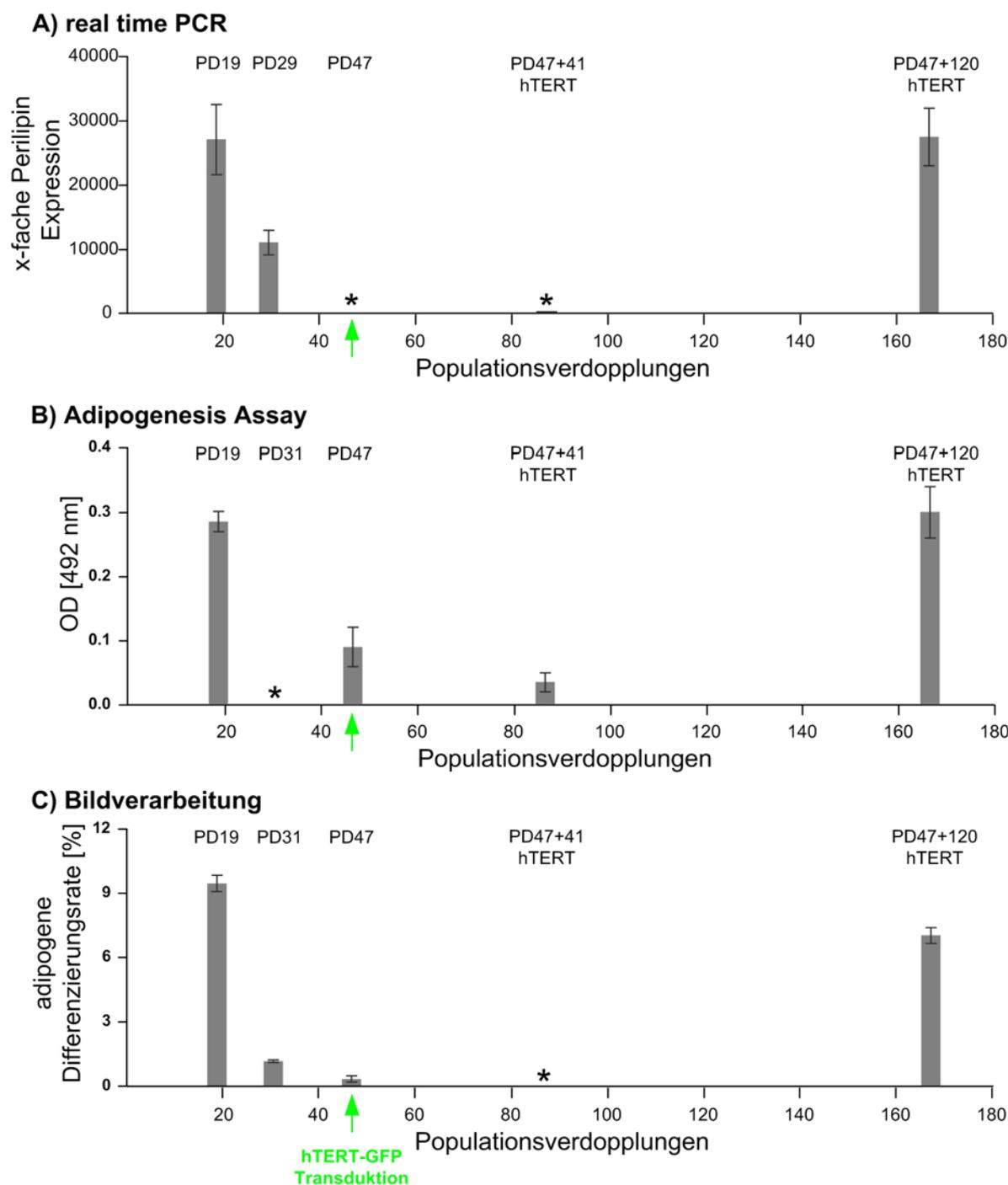


Abb. 33 Verlauf der adipogenen Differenzierung

Zeitlicher Verlauf der adipogenen Differenzierung der hSGSC1 vor und nach der Immortalisierung durch hTERT visualisiert durch drei verschiedene Nachweismethoden. Dargestellt sind die Expressionserhöhung von Perilipin ermittelt mittels real-time PCR (A), die optische Dichte des Lipid-gebundenen Oil red O des Adipogenesis Assays (B) sowie die adipogene Differenzierungsrate ermittelt mittels automatisierter Bildverarbeitung (C) gegen die Populationsverdopplungen *in vitro*. Die Induktion der adipogenen Differenzierung erfolgte über 4 Wochen. (*) kennzeichnet Messwerte unterhalb der Darstellungsgrenze.

3.4 Entwicklung einer automatisierten Bildverarbeitung zur Quantifizierung der adipogenen Differenzierung

Der Nachweis der adipogenen Differenzierung erfolgt üblicherweise qualitativ durch hochauflösende optische Mikroskopie, wobei in der Regel nur wenige Zellen des Bildfeldes berücksichtigt werden. Der quantitative Nachweis der Genexpressionsveränderung, der Aktivität von Glycerolphosphat oder des gespeicherten Lipidvolumens dagegen liefert keine Informationen über die räumliche Verteilung der Adipozyten und der Adipogenese. Für die qualitative und quantitative Analyse der adipogenen Differenzierung bei gleichzeitiger räumlicher Auflösung wurde daher eine automatisierte Bildverarbeitung für hochaufgelöste großflächige Hellfeld- und Fluoreszenzaufnahmen entwickelt.

Zur Untersuchung der Entwicklung der Adipogenese wurden von einer hSGSC1-Kultur PD19 während der vierwöchigen adipogenen Differenzierung (mit 100 nM Dexamethason und 100 nM IGF-1) periodisch großflächige Phasenkontrastaufnahmen gemacht. In Abb. 34 ist der Verlauf der Adipogenese bei hSGSC1 an den entsprechenden Tagen für einen exemplarischen Ausschnitt dargestellt. Lipidtropfen waren in dem hier gewählten Ausschnitt ab dem 9. Tag der Differenzierung sichtbar (Abb. 34 B), in anderen Bereichen bereits nach 4 Tagen. Diese Lipidtropfen nahmen während des weiteren Differenzierungsverlaufs an Größe und Anzahl zu, wobei sich die Morphologie der differenzierenden Zellen von ihrer spindelförmigen Form hin zu einer sphärischen veränderte. Nach 28 Tagen der Differenzierung waren keine Veränderungen mehr zu erkennen und die Studie wurde mit der Fixierung, Oil red O- und DAPI-Färbung der Zellen beendet (Abb. 34 L).

Für die Entwicklung der automatisierten Bildverarbeitung und deren Prüfung wurden verschiedene adipogene Differenzierungsansätze gewählt. Ansätze mit hSGSC1 nach 19 PD und 31 PD in Kultur, zwei Induktionsfaktoren (IGF-1 und Insulin) in der Kombination mit drei unterschiedlichen Dexamethason Konzentrationen (0, 10, und 100 nM) und die Differenzierungskontrolle als doppelter Ansatz resultierten in insgesamt 28 einzelnen Proben.

Diese wurden in Kultivierungskammern mit 4 cm² Wachstumsfläche für 28 Tage mit entsprechendem Medium kultiviert, anschließend fixiert und mit Oil red O- und DAPI-gefärbt. Von allen 28 Ansätzen erfolgte die automatisierte Aufnahme von je 192 Hellfeld- und Fluoreszenzbildern mit einem 10x Objektiv.

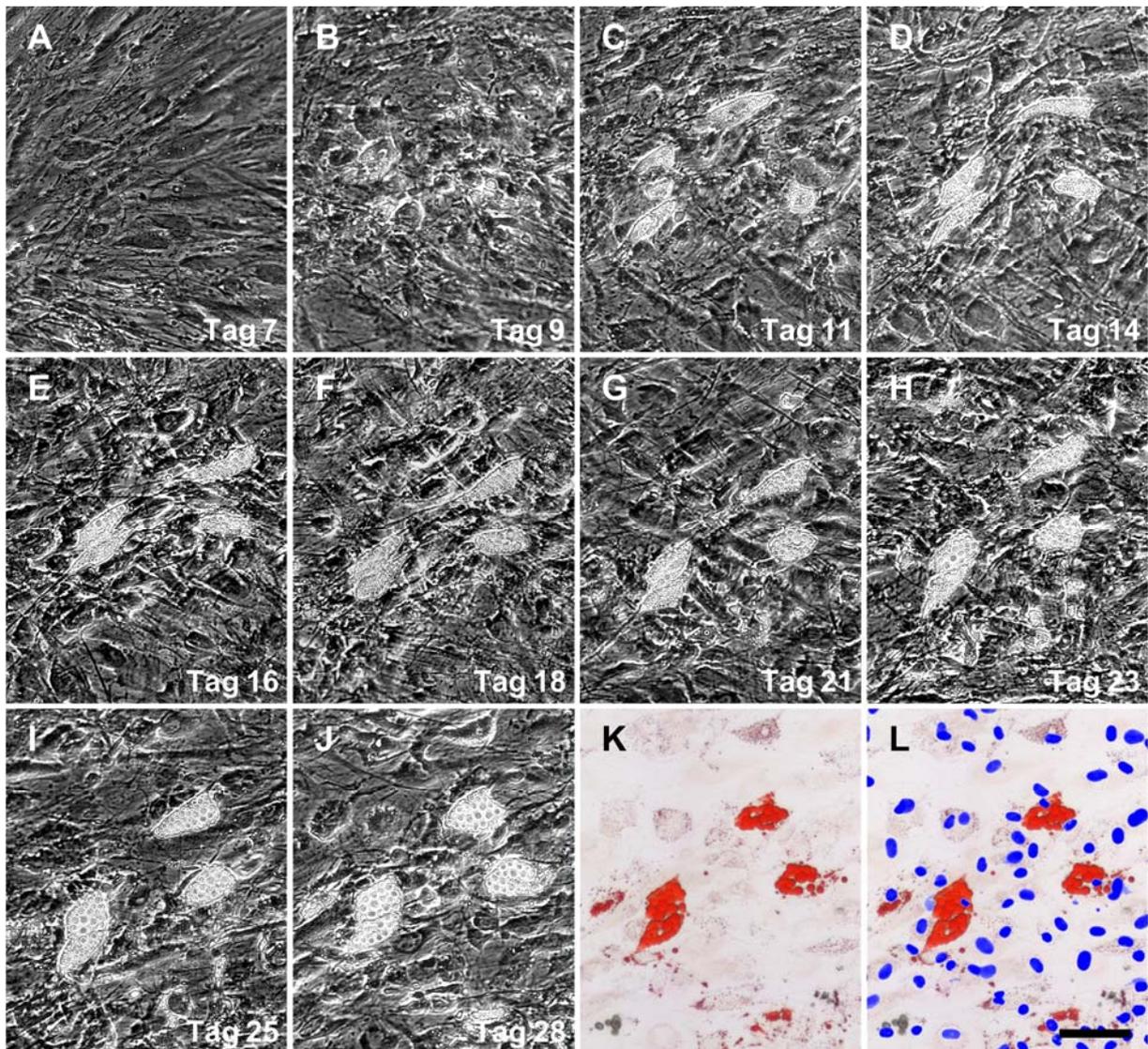


Abb. 34 Zeitlicher Verlauf der Adipogenese bei hSGSC

Dargestellt sind Phasenkontrastaufnahmen des gleichen Ausschnitts während der Kultivierung der hSGSC1 mit adipogenem Differenzierungsmedium zu unterschiedlichen Zeitpunkten (7 - 28 Tage; A-J). Hellfeldaufnahme der Oil red O-gefärbten Kultur (K) und übereinander gelegte Hellfeld- und Fluoreszenzaufnahmen nach Oil red O- und DAPI-Färbung (L). Der Größenbalken entspricht 100 µm.

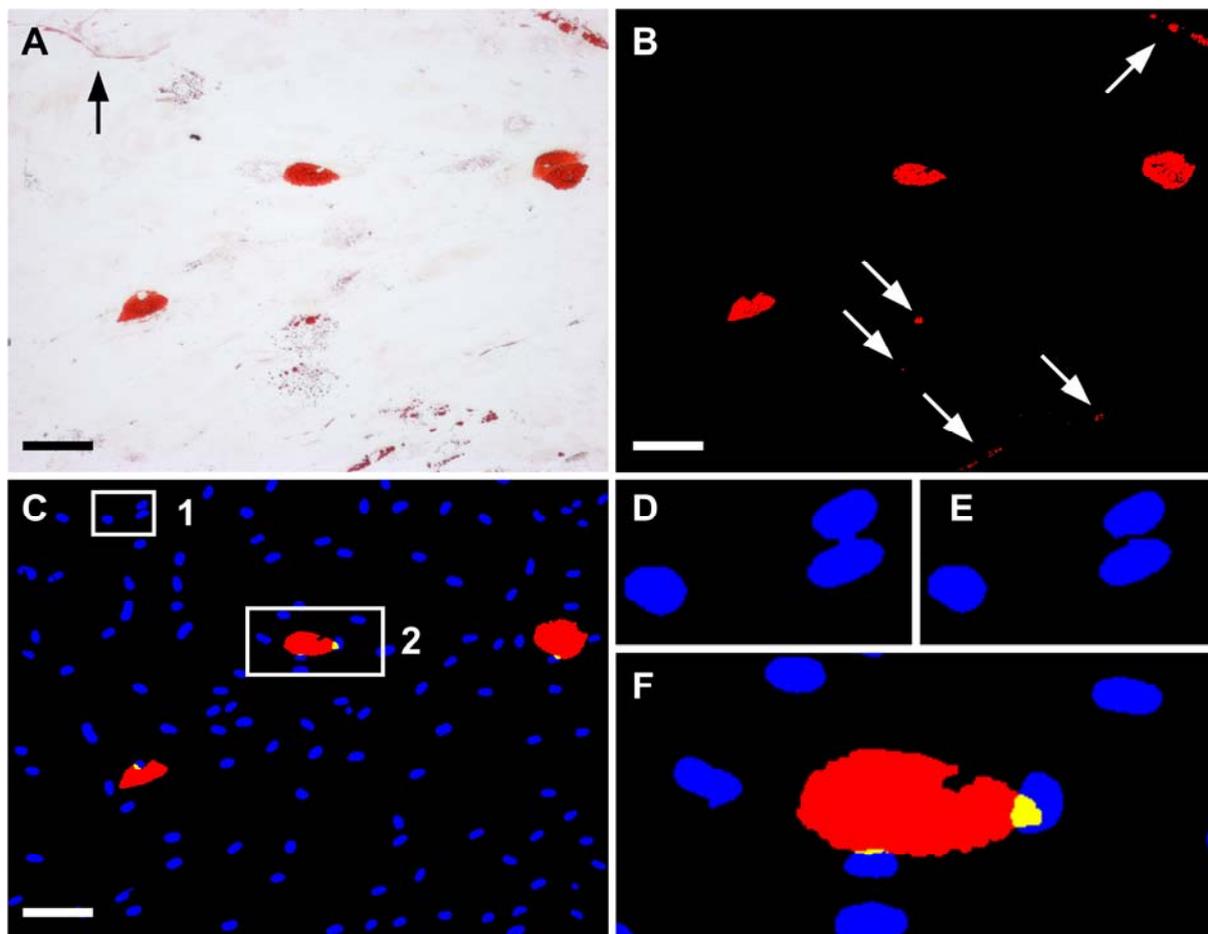


Abb. 35 Funktionsweise der automatisierten Bildverarbeitung

Die Hellfeldaufnahme nach Oil red O-Färbung (A) zeigt drei rote Bereiche und einige kleinere rote Objekte. Der schwarze Pfeil zeigt einen rot gefärbten Bereich, welcher nicht von dem folgenden RGB-Schwellenwert-Filter (rot-gelb-blau) ausgewählt wird (A). Das Ergebnis nach Anwendung des RGB-Filters (B) enthält noch kleine rote Objekte (weiße Pfeile in B), welche von dem folgenden Größen-Filter entfernt werden. Offene Bereiche in den roten Objekten werden gefüllt und anschließend Hellfeld- und Fluoreszenzbild (DAPI) fusioniert (C). Rahmen 1 zeigt Details der Bildverarbeitung in D und E (automatisches Trennen sich berührender Kerne), Rahmen 2 in F (Schnittfeld von roten Objekten und Kernen). Der Größenbalken entspricht 100 μm .

Die Verarbeitung der Einzelbilder erfolgte in einer Abfolge von Bearbeitungsschritten in der Umgebung des kommerziell erhältlichen Bildverarbeitungsprogramm "Vision Development Module", der Ablauf war mit "LabView" automatisiert (Details siehe Anhang). Die Bildverarbeitung beinhaltet den RGB-Farben-Schwellenwert (rot 150 - 255, gelb 0 - 92, blau 0 - 92) für die Hellfeldaufnahmen, um die hellrot gefärbten Artefakte zu unterdrücken (Abb. 35 A, schwarzer Pfeil). Die erhaltenen Objekte wurden basierend auf der durchschnittlichen Größe der Adipozyten gefiltert, wobei zu kleine und zu große Objekte unterdrückt wurden (Abb. 35 B, weiße Pfeile). Es resultierte die Anzahl der roten Cluster N_{red} . Die Fluoreszenzbilder der DAPI gefärbten Zellkerne wurden ebenfalls anhand der durchschnittlichen Größe der Zellkerne gefiltert, wobei überlappende

Zellkerne getrennt wurden und in N_n resultierten (Abb. 35 D+E). Anschließend wurden die Hellfeld- und Fluoreszenzbilder übereinander gelegt (Abb. 35 C) und die Anzahl gemeinsamer Schnittflächen von Adipozyten und Zellkernen berechnet. Dieser Wert wurde als N_{calc} bezeichnet. Wenn ein rotes Cluster mit mehr als einem Zellkern überlappte, erhöhte sich N_{calc} entsprechend (Abb. 35 F). Für den in Abb. 35 (A-C) dargestellte Bildausschnitt wurde die Anzahl der Kerne N_n mit 118, die der roten Cluster N_{red} mit 3 und die Anzahl von Adipozyten N_{calc} mit 4 berechnet.

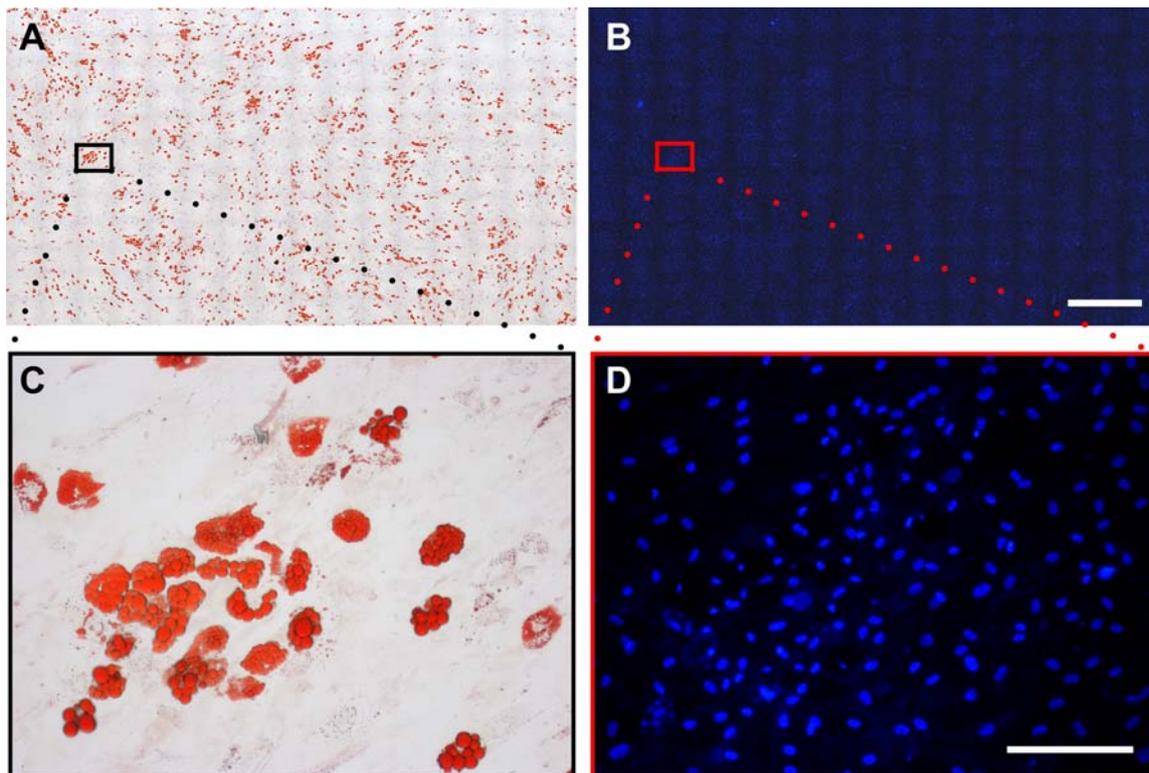


Abb. 36 Heterogenität der adipogenen Differenzierung bei hSGSC

Hellfeld- (A+C) und Fluoreszenzaufnahmen (B+D) der hSGSC1 nach Kultivierung für 28 Tage in adipogenem Differenzierungsmedium (100 nM Dexamethason und 100 ng/ml Insulin) und anschließender Oil red O- und DAPI-Färbung. Je 192 Einzelbilder wurden zu den Übersichtsaufnahmen zusammengefügt (A+B). Der Größenbalken entspricht 2 mm (A+B) und 200 μm (C+D).

Mit der Aufnahme einer Fläche der Größe 16,8 mm x 8,0 mm verschiedener Differenzierungskulturen sollten eine hohe Zellzahl erfasst und detaillierte Informationen zum Verhaltensmuster der adipogenen Differenzierung erhalten werden. Anhand der Fluoreszenzaufnahmen der DAPI gefärbten Zellkerne wurde die Zelldichte mit 24.325 Zellen/ cm^2 \pm 5 % (PD19) und 16.416 Zellen/ cm^2 \pm 8 % (PD31) bestimmt. Beispielhaft sind die Oil red O und DAPI gefärbten Einzelbilder einer hSGSC1 Kultur nach 28-tägiger adipogener Induktion und die aus 192 Einzelbildern zusammengefügt Übersichtsaufnahmen in Abb. 36 dargestellt. Dabei können verschiedene Muster und

Dichten der Zellen erkannt werden. Vor allem ist zu erkennen, dass die adipogene Differenzierung der hSGSC sich heterogen in Clustern vollzieht (Abb. 36 A+C).

Mittels der automatisierten Bildverarbeitung wurde von den Einzelbildern die Anzahl der Oil red O gefärbten Zellen und Cluster (N_{calc}) und die Anzahl der blau gefärbten Zellkerne (N_n) bestimmt. Der Anteil der adipogen differenzierten Zellen erfolgte aus dem Quotienten aus N_{calc}/N_n (Abb. 37 A+B). Dabei zeigen die Kulturen der Mediumkontrolle (MK) (PD19 und PD31) wie auch die vier Differenzierungen mit 0 nM Dexamethason (PD19, PD31 und je Insulin und IGF-1) Anteile adipogen differenzierter Zellen unterhalb der Detektionsgrenze (100 ppm). Die Kulturen der hSGSC PD19, welche mit Insulin und 10 nM bzw. 100 nM Dexamethason behandelt wurden, hatten einen Anteil adipogen differenzierter Zellen im Bereich von 7 – 10 %. Die mit IGF-1 und 10 nM bzw. 100 nM Dexamethason behandelten hSGSC wiesen einen Anteil im Bereich von 6 – 7 % auf. Die hSGSC-Kulturen PD31 zeigten für alle vier Mediumkombinationen (10 nM bzw. 100 nM und je Insulin oder IGF-1) einen Anteil adipogen differenzierter Zellen im Bereich von 1 %.

Zur Evaluation der durch die automatisierte Bildverarbeitung erhaltenen Ergebnisse erfolgte die Quantifizierung des eingelagerten Lipidvolumens mittels Adipogenesis-Assay derselben Proben, sowie die manuelle Auszählung der Adipozyten und Zellkerne von 10 zufällig gewählten Einzelbildern durch drei Personen. Zur Quantifizierung wurde der rote Farbstoff der Lipidtropfen extrahiert und die Absorption bei 492 nm gemessen (Abb. 37 C+D). Zusätzlich zur Medium-Kontrolle (MK) wurde ein leeres Kulturgefäß, welches wie die Kulturen selbst Oil red O gefärbt war, als Hintergrundkontrolle (HK) benutzt, um die vom Kulturgefäß selbst gebundenen Farbstoff zu messen. Die Hintergrundkontrolle wurde als Schwellenwert benutzt. Die Ergebnisse der hSGSC PD19 liegen für alle Medium-Kombinationen mit Dexamethason (10 nM und 100 nM und je Insulin und IGF-1) deutlich über dem Schwellenwert (HK) und der Medium-Kontrolle (MK) (Abb. 37 C). Die Ergebnisse der hSGSC PD31 liegen für alle Medium-Kombinationen im Bereich der Medium-Kontrolle und des Schwellenwerts (Abb. 37 D). Die Ergebnisse der manuellen Auszählung der adipogenen Differenzierung deckten sich mit den Ergebnissen der hier entwickelten Bildverarbeitung.

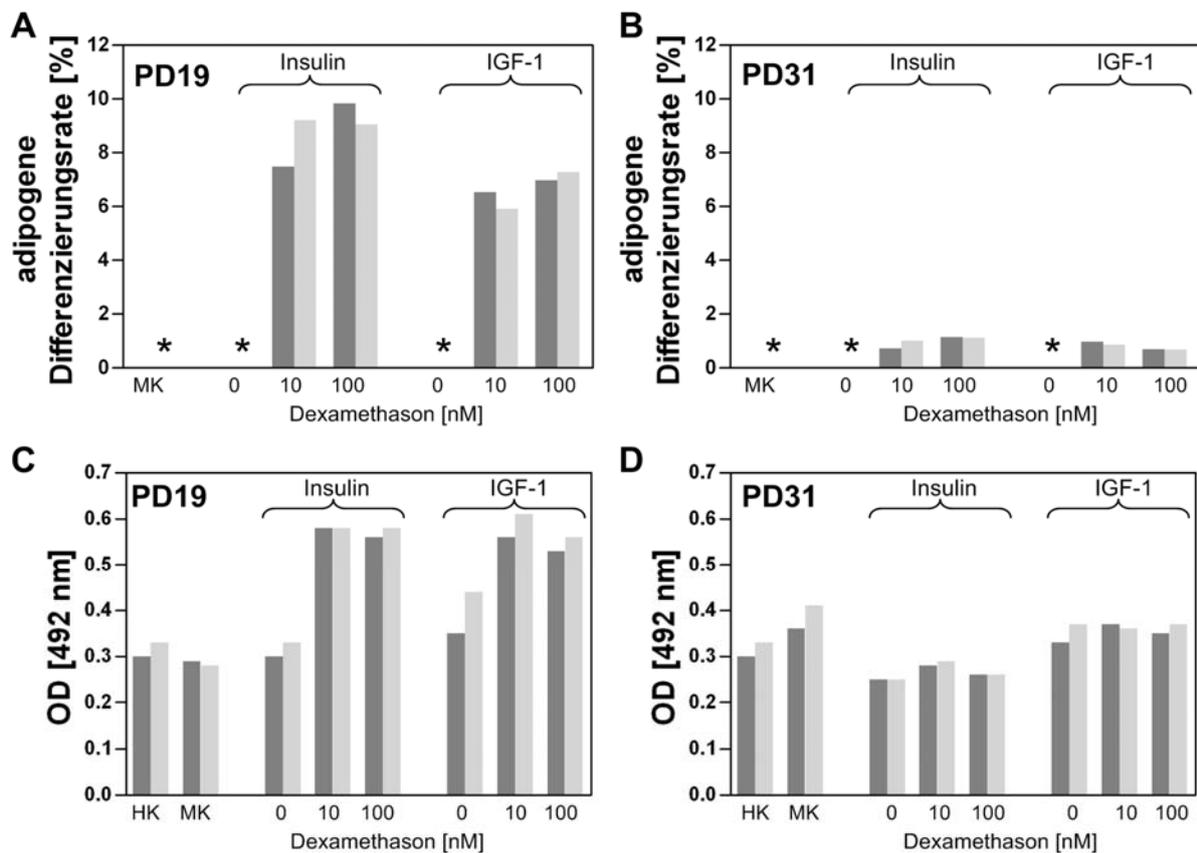


Abb. 37 Quantifizierung der adipogenen Differenzierung mittels automatisierter mikroskopischer Auswertung und dem Adipogenesis-Assay.

Auswertung der Oil red O- und DAPI-gefärbten hSGSC1 (19 und 31PD) nach 28-tägiger adipogener Differenzierung für verschiedene Medium-Kombinationen (Insulin oder IGF-1 mit 0 nM, 10 nM, 100 nM Dexamethason). Die Ergebnisse der automatisierten Bildverarbeitung (A+B) zeigen den Quotienten aus erkannten Adipozyten (N_{calc}) und den Zellkernen (N_n). Beim Adipogenesis-Assay (C+D) ist die optische Dichte der Hintergrund Kontrolle (HK), der Medium-Kontrolle (MK) zusammen mit den Ergebnissen der induzierten Differenzierung mit Insulin und IGF-1 mit unterschiedlichen Dexamethason Konzentrationen (0, 10 und 100 nM) dargestellt. (*) kennzeichnet die Medium-Kontrolle (MK) ohne Differenzierungsfaktoren und jeweils die induzierten Differenzierungen mit 0 nM Dexamethason mit einem Anteil unter 0,01%. Die dunkelgrauen und hellgrauen Balken zeigen die Doppelbestimmung.

Für alle Kulturen konnte mit der automatisierten Bildverarbeitung die gleiche Differenzierungsrate in den Doppelbestimmungen erreicht werden ($p < 0.05$). In Tab. 17 sind exemplarisch Ergebnisse für die Experimente der hSGSC 19 PD nach Kultivierung mit verschiedenen Medien im Vergleich dargestellt. Beide Ansätze, kultiviert mit Insulin oder IGF-1 ohne Zugabe von Dexamethason, konnten die Differenzierungsrate im Vergleich zur Kontrolle nicht erhöhen ($p < 0.05$). Bei den Kombinationen mit Insulin und Dexamethason nahm die Differenzierungsrate mit zunehmender Dexamethason-Konzentration zu ($p < 0.05$). Eine Erhöhung der Dexamethason-Konzentrationen von 10 nM auf 100 nM in Kombination mit IGF-1 konnte die Differenzierungsrate nicht signifikant erhöhen ($p < 0.05$). Zusätzlich entsprechen alle auf der automatisierten Bildverarbeitung basierenden Ergebnisse den manuellen Auszählungen.

Tab. 17 Differenzierungsraten für hSGSC mittels automatisierter Bildverarbeitung bestimmt.

Induktion	Differenzierungsrate [%]
Kontrolle	0,00 ± 0,00
Insulin (100 ng/ml)	0,01 ± 0,07
Insulin (100 ng/ml) + Dexamethason (10 nM)	7,27 ± 4,39 * [†]
Insulin (100 ng/ml) + Dexamethason (100 nM)	9,53 ± 5,22 * [§]
IGF-1 (100 nM)	0,01 ± 0,07
IGF-1 (100 nM) + Dexamethason (10 nM)	6,38 ± 3,99 * [§]
IGF-1 (100 nM) + Dexamethason (100 nM)	6,86 ± 4,21 *

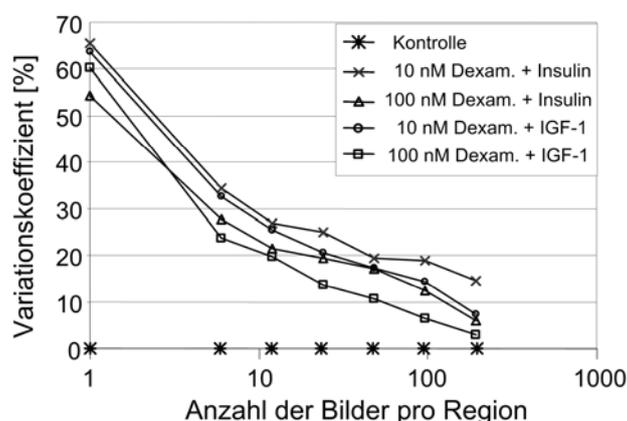
Mittelwerte ± Standardabweichung von 192 ausgewerteten Bildern.

* vs. Kontrolle, [†] vs. Insulin, [§] vs. Insulin + 10 nM Dexamethason,

[§] vs. IGF-1; p < 0.05.

Adipogene Differenzierungsraten der hSGSC1 PD19 nach unterschiedlicher Induktion. Die Berechnung der Differenzierungsraten erfolgte mit der automatisierten Bildverarbeitung, die Signifikanz anhand des t-Tests.

Um die Heterogenität des adipogenen Differenzierungsmusters abschätzen zu können, und um die Größe der aufgenommen Bildfläche zu optimieren, wurden verschieden große Regionen, bestehend aus 1 bis 192 Einzelbildern, betrachtet. Exemplarisch wurde der Variationskoeffizient (definiert als die Standardabweichung dividiert durch den Mittelwert) verschiedener Differenzierungskulturen der hSGSC PD19 in Prozent berechnet (Abb. 38). Dabei sinkt, mit zunehmender Größe der betrachteten Region, der Variationskoeffizient für die unterschiedlichen Kulturen von 55 - 65 % bei einem Bild auf unter 15 % bei 192 betrachteten Bildern.

**Abb. 38 Variationskoeffizient der adipogenen Differenzierung in Regionen unterschiedlicher Größe**

1, 6, 12, 24, 48, 96 und 192 Einzelbilder der PD19 Proben wurden gruppiert und mit der entwickelten Bildverarbeitung ausgewertet. Dargestellt ist der Variationskoeffizient der Differenzierungsrate in Prozent gegen die Anzahl der gruppierten Einzelbilder (logarithmisch).

Hier konnte erfolgreich eine automatisierte Bildverarbeitung zur gleichzeitigen qualitativen und quantitativen Bestimmung der adipogenen Differenzierung entwickelt und getestet werden. Die Heterogenität der adipogenen Differenzierung der hSGSC1 erfordert es, hohe Zellzahlen zu untersuchen. Die verschiedenen Differenzierungsansätze lieferten vergleichbare Ergebnisse wie der Adipogenensis-Assay und die manuellen Auszählungen. Dies unterstreicht die Stabilität des hier gewählten automatisierten Ansatzes der Bildverarbeitung.

4 Diskussion

Stammzellen sind über ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung, der Differenzierung in verschiedene Zelltypen und der Repopulation eines Gewebes *in vivo* definiert¹⁷². Dabei reicht das Differenzierungspotential von „unipotent“, das heißt der Differenzierung in einen einzigen Zelltypen, über „multipotent“, der Beschränkung der Differenzierung innerhalb eines Gewebes, bis hin zu „pluripotent“, der unbeschränkten Differenzierungsfähigkeit. Embryonale Stammzellen sind pluripotent, also unbegrenzt teilungsfähig und in jeden Zelltyp differenzierbar. Diese Eigenschaften prädestinieren embryonale Stammzellen für den Einsatz in der regenerativen Medizin und dem Tissue Engineering. Stammzellen können direkt in eine geschädigte Region injiziert oder über das Blutgefäßsystem verabreicht werden, und so in die geschädigte Region gelangen. Dort können die Stammzellen durch Proliferation, Differenzierung oder Zellfusion verloren gegangene Zellen ersetzen, womit auch verloren gegangene Funktionen wiedererlangt werden können. Im Falle des Tissue Engineering werden Stammzellen *in vitro* differenziert oder zu funktionellen Einheiten konstruiert und erst anschließend in den Körper implantiert, um dort geschädigte Bereiche zu ersetzen. Aufgrund der Tumorbildung bei der Verwendung humaner embryonaler Stammzellen *in vivo* und der Immununverträglichkeit durch die allogene Verwendung werden humane embryonale Stammzellen bisher nicht klinisch eingesetzt. Zusätzlich ist ihre Isolierung aus humanen Blastozysten ethisch bedenklich und gesellschaftlich umstritten.

Adulte Stammzellen hingegen besitzen ein beschränktes Proliferations- und Differenzierungspotential. Allerdings konnte für Stammzellen aus dem Knochenmark die Keimblatt überschreitende gezielte Differenzierung in Zelltypen der drei embryonalen Keimblätter gezeigt werden. Somit können sie als pluripotent eingeordnet werden. Weiterhin zeigen adulte Stammzellen keine Transformation *in vivo* und sind aus vielen Geweben isolierbar. Damit sind sie leicht und ethisch unbedenklich gewinnbar und können auch autolog eingesetzt werden. All diese Vorteile sprechen für die bevorzugte Verwendung adulter Stammzellen in der regenerativen Medizin. Vor ihrem therapeutischen Einsatz steht jedoch die Charakterisierung *in vitro* sowie im Tiermodell. *In vitro* kann das Potential adulter Stammzellen anhand der Proliferationskapazität, des Differenzierungspotentials und des Expressionsprofils bestimmt werden.

Besitzen Zellen isoliert aus Pankreas und Speicheldrüse Stammzellpotential?

Die hier untersuchten humanen Zellen aus Pankreas- (hPSC) und Speicheldrüsen-Gewebe (hSGSC) lagen, bezogen auf ihre Proliferationskapazität, im Bereich mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark, konnten aber fast doppelt so lange kultiviert werden. Bekannte Studien über Stammzellen aus Pankreas und Speicheldrüse konzentrierten sich meist auf deren Differenzierungspotential und Phänotyp, weshalb bisher keine anderen Daten über die Proliferationskapazität oder die Kultivierungsdauer dieser Zellen bekannt sind^{5, 74, 81, 110, 140, 156, 184}. Allerdings zeigen adulte Stammzellen aus anderen Geweben wie dem Fettgewebe, der Zahnpulpa, dem Amnion, dem Nabelschnurblut oder der fötalen Leber eine ähnliche Proliferationskapazität^{25, 62, 96, 175}. Es ist nicht geklärt, ob schnell oder langsam proliferierende Zellen bei gleicher Proliferationskapazität, potenter oder besser geeignet sind für den Einsatz in der Regenerativen Medizin. Es wird allerdings davon ausgegangen, dass Stammzellen *in vivo* sich nur sehr selten teilen und somit trotz ihrer begrenzten Proliferationskapazität lebenslang aktiv sein können. Im Knochenmark z. B. schwinden während der Lebenszeit sowohl die Anzahl mesenchymaler Stammzellen, wie auch deren Proliferationskapazität⁶⁸.

Adulte Stammzellen besitzen *in vitro* eine beschränkte Proliferationskapazität und altern mit zunehmender Zeit in Kultur, u. a. aufgrund der fehlenden Telomeraseaktivität und der daraus resultierenden Telomerverkürzungen. Die Verkürzung der Telomere als Konsequenz des "End-Replikations-Problems" führt zu einer kritischen Telomerlänge^{66, 108}. Wird diese kritische Länge erreicht bzw. unterschritten, wird die Zelle seneszent oder apoptotisch^{64, 139}. Telomerverkürzung kann also als mitotische Uhr, welche die Anzahl der Zellteilungen kontrolliert, bezeichnet werden¹⁵⁰. Apoptose oder Seneszenz, als Antwort auf kritisch kurze Telomere, kann in eukaryotischen Zellen durch die Aktivierung des Enzyms Telomerase, umgangen werden. Das Enzym Telomerase ist eine reverse Transkriptase, welche die Telomere verlängert. Der Ribonukleoproteinkomplex nutzt seine RNA-Komponente TERC (telomerase RNA component) als Template für die Synthese der repetitiven Telomersequenzen durch die katalytische Untereinheit TERT (telomerase reverse transcriptase). Die Variablen, die entscheidend für die Länge der Telomere sind, sind u. a. die initiale Telomerlänge, die Telomerverkürzungsrate je Zellteilung und die Telomerase Expression.

Die Kultivierung der hPSC und hSGSC ging einher mit einer Größenzunahme, einer nicht vorhandenen Telomeraseaktivität, den daraus resultierenden Telomerverkürzungen und einer zunehmenden SA- β -Galaktosidase Expression. Diese Merkmale weisen auf eine *in vitro* ablaufende replikative Seneszenz hin^{20, 44}.

Humane somatische Zellen besitzen keine detektierbare Telomeraseaktivität, was zu sukzessiven Telomerverkürzungen und damit zu reduzierter Proliferationskapazität *in vitro* und *in vivo* führt⁶⁴. Telomeraseaktivität und damit stabile Telomere besitzen Keimbahnzellen, embryonale Stammzellen sowie die meisten Tumorzellen und gelten damit als immortal^{1, 89, 164}. Bei adulten humanen Stammzellen wurde eine niedrige Telomeraseaktivität für Zellen aus der Haut, dem Darm und dem Blut beschrieben^{24, 98, 179}. Im Gegensatz dazu besitzen hMSC aus dem Knochenmark keine Telomeraseaktivität^{7, 152, 188}. Die hier untersuchten hPSC und hSGSC besaßen ebenfalls keine Telomeraseaktivität. Dementsprechend verkürzten sich während der Kultivierung ihre Telomere um ca. 2 kb auf die kritische Telomerlänge von 5 - 7 kb und wurden seneszent. Diese Telomerverkürzung mit Seneszenz als Folge wurde auch schon für mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark beschrieben^{10, 111}.

Hinsichtlich der Nutzung in der regenerativen Medizin ist neben der Fähigkeit zur Selbsterneuerung vor allem das Differenzierungspotential adulter Stammzellen von großer Bedeutung. Die hier untersuchten endodermalen hPSC und hSGSC zeigten spontane Differenzierung in verschiedene Zelltypen der drei Keimblätter. hMSC aus dem Knochenmark sind hingegen als Zellen beschrieben, welche keine spontane Differenzierung bei ihrer Kultivierung zeigen¹³⁰. Die in dieser Arbeit als Referenz benutzten hMSC zeigten aber wie die hPSC und hSGSC spontane Differenzierung in Zelltypen der drei Keimblätter. Ursache für die spontane Differenzierung eines geringen Anteils der untersuchten Stammzellen könnte deren Kultivierung in FKS-enthaltendem Kulturmedium und die asymmetrische Teilung der Stammzellen sein. Dabei teilt sich eine Stammzelle in eine Stammzelle und eine Vorläuferzelle. Die Stammzelle besitzt weiter ein hohes Proliferations- und Differenzierungspotential, während die Vorläuferzelle diesbezüglich eingeschränkt ist. Die Vorläuferzelle teilt sich weiterhin, dabei nimmt aber mit jeder Zellteilung sowohl ihr Proliferations- wie auch Differenzierungspotential ab. Dabei ist sie dem Einfluss verschiedener Zytokine, Hormone und Wachstumsfaktoren, welche sich im FKS-Anteil des Mediums befinden, ausgesetzt. Diese Faktoren spielen

eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Selbsterneuerung *in vitro*, können in Zellen aber auch verschiedene Differenzierungen induzieren.

Nach gezielter Induktion differenzierten die pankreatischen und Speicheldrüsen-Stammzellen in chondrogene und osteogene Richtung. Adipogene Stimulation führte nur bei hSGSC zur Einlagerung von Lipidtropfen und damit zur Differenzierung zu Adipozyten. Die hPSC differenzierten nicht zu einem adipogenen Phänotyp. Für hMSC war auch hier, wie Pittenger et al. bereits 1999 nachgewiesen hatte, die gezielte Differenzierung in alle drei mesenchymale Richtungen möglich¹³⁰. Aufgrund der ähnlichen Proliferationskapazität und des ähnlichen Expressionsprofils zu den mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark war auch die Differenzierbarkeit in adipogene Richtung erwartet worden. Für hMSC konnte DiGirolamo et al. zeigen, dass die adipogene Differenzierungsrate von PD4 zu PD15 von 70 - 90 % auf 0 % abnimmt, dabei aber die osteogene Differenzierungsrate konstant hoch bleibt⁴². Da die ersten Differenzierungsversuche mit hPSC aufgrund der Verfügbarkeit ab PD7 mit hPSC PD12 durchgeführt wurden, könnten die hPSC also aufgrund der Kultivierungszeit bereits ihre adipogene Differenzierbarkeit verloren haben. Im Gegensatz zu den von DiGirolamo et al. beschriebenen hMSC, die nach PD15 nicht nur ihre adipogene Differenzierbarkeit verloren, sondern auch seneszent wurden und ihre Teilung einstellten, proliferierten die hPSC noch weitere 23 Verdopplungen, bevor sie ihre Teilung einstellten.

Untersuchungen des Phänotyps der hPSC und hSGSC zeigten mit CD9⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD73⁺, CD81⁺, CD90⁺, CD105⁺ und Nestin⁺ und CD45⁻, CD117⁻ und CD133⁻ ein zu den hMSC aus dem Knochenmark ähnliches Oberflächen-Expressionsprofil, unterschieden sich aber bei der Expression von CD106 und CD271. Dieses Expressionsprofil ist auch auf anderen adulten Stammzellen aus dem Nabelschnurblut, der Leber, dem Fettgewebe, dem Pankreas und der Speicheldrüse nachgewiesen^{28, 96, 106, 130, 140, 145, 189}, weshalb es als gewebeübergreifender Phänotyp adulter Stammzellen bezeichnet werden könnte. CD271 konnte bisher nur auf mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark nachgewiesen werden und gilt damit als selektiver Marker für diese hMSC²⁷. Das Adhäsionsprotein und Integrin-Rezeptor CD106 wird von mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark, aber nicht von adulten Stammzellen, isoliert aus Fettgewebe oder Nabelschnurblut, exprimiert^{36, 96, 130, 189}. Die Beschränkung der Expression von CD106 und CD271 auf hMSC konnte mit den Untersuchungen hier

bestätigt werden. Die hMSC waren positiv für CD106 und CD271, während hPSC und hSGSC beide Proteine nicht exprimierten.

Ursprünglich wurde angenommen, dass die Expression von Oct4 und Nanog auf Gewebe und Zellen embryonalen Ursprungs beschränkt ist oder diese sogar Marker für Totipotenz darstellen^{123, 129}. Oct4, Sox2 und Nanog kontrollieren die Pluripotenz und Selbsterneuerung von hES über die Bindung der Promotorregion einer Vielzahl von Genen, die wichtige Transkriptionsfaktoren codieren. Nachdem Oct4 aber auch in Stammzellen des Knochenmarks (MAPC), des Fruchtwassers und hämatopoetischen Stammzellen nachgewiesen wurde, galt es auch als Marker für pluripotente adulte Stammzellen^{78, 133, 158}. Tai et al. konnte zeigen, dass Oct4 von verschiedenen adulten Stammzellen aus Niere, Brustepithel, Pankreas, Mesenchym, Leber und des Verdauungstrakts exprimiert wird, nicht aber in deren differenzierten somatischen Nachkommen. Für Tai et al. war die Tatsache, dass Oct4 auch in Krebszellen exprimiert wird, ein Beweis dafür, dass die Entstehung von Krebs auf entartete Stammzellen und nicht auf entartete somatische Zellen zurückzuführen ist.

Das hohe Proliferationspotential sowie das Potential spontan wie auch gezielt Keimblatt-übergreifend zu differenzieren, zeigt die hohe Potenz der endodermalen Stammzellen aus Pankreas und Speicheldrüse. Dazu kommen die Expression embryonaler Marker sowie ein den mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark ähnliches Expressionsprofil. Diese Eigenschaften charakterisieren die hier untersuchten Zellen aus exokrinem Pankreas und exokriner Speicheldrüse als multipotente adulte Stammzellen.

Behalten Stammzellen nach Immortalisierung ihre Potenz?

Sowohl für die Grundlagenforschung *in vitro*, aber vor allem für den spenderabhängigen Einsatz beim Tissue Engineering sind hohe Zellzahlen erforderlich. Um diese hohen Zellzahlen zu erreichen, ist es unbedingt erforderlich, die Fähigkeit der adulten Stammzellen zur Selbsterneuerung zu erhöhen. Dies kann zum einen durch die genetische Modifikation der Zellen erfolgen, oder durch die Identifikation der Faktoren, die für die Aufrechterhaltung der Proliferation *in vivo* zuständig sind und deren Nutzung unter optimierten *in vitro* Kulturbedingungen. Bei der Optimierung der Kulturbedingungen gab es kaum einen Fortschritt in den letzten Jahren. Trotz großer Chargenschwankungen ist aufgrund der enthaltenen Zytokine und Wachstumsfaktoren

fötale Kälberserum (FKS) weiterhin essentieller Mediumbestandteil. Zwar wurden Zellen, auch adulte Stammzellen, in serumfreiem Medium kultiviert und charakterisiert, ohne jedoch eine Erhöhung der Proliferationskapazität oder des Differenzierungspotentials zu bewirken.

Die Verlängerung der Lebensfähigkeit von Zellen *in vitro* kann durch das Einbringen viraler Onkogene wie des humanen Papillomavirus Type 16 E6/E7 Gen, des Simian Virus 40 large T Antigens oder des Gens für die katalytische Untereinheit der Telomerase (hTERT) erreicht werden^{75, 94, 162, 178}. Überexpression von hTERT verlängert die Lebenszeit *in vitro*, indem sie der Telomerverkürzung entgegenwirkt. Dies konnte für Fibroblasten, retinale Epithelzellen, Osteoblasten, mesenchymale und hämatopoetische Stammzellen gezeigt werden^{17, 151, 152, 182, 188}.

Durch die Integration der katalytischen Untereinheit hTERT konnte in beiden Telomerase-negativen hSGSC-Populationen (hSGSC1-PD29-hTERT und hSGSC1-PD47-hTERT) erfolgreich Telomerase aktiviert werden. Dabei zeigten beide immortalisierten Populationen bis zum Abschluss der Studien eine unbegrenzte Proliferation über 420 Tage. Während dieser Zeit verhielten sich die beiden hSGSC1-Populationen unterschiedlich. Die zu einem späteren Zeitpunkt transduzierten hSGSC1-PD47-hTERT teilten sich doppelt so oft wie die hSGSC1-PD29-hTERT, obwohl sie eine nur halb so hohe Telomeraseaktivität zeigten. Die hohe Telomeraseaktivität der hSGSC1-PD29+ könnte der Grund für die dauerhafte kontinuierliche Verlängerung der Telomere gegenüber der minimalen Verlängerung bei den hSGSC1-PD47-hTERT sein. Bei der gezeigten Telomerverkürzung von ca. 100 bp je Zellteilung reicht eine niedrige Telomeraseaktivität für den Ausgleich des Verlusts. Hingegen könnte eine hohe Telomeraseaktivität wie bei den hSGSC1-PD29+ nach Ausgleich des Verlusts zusätzlich noch für eine Verlängerung der Telomere sorgen.

Unbeeinflusst von der Immortalisierung blieb die Expression der meisten Stammzellmarker, womit die hSGSC1 weiterhin ein Expressionsprofil ähnlich den hMSC zeigten. Lediglich die Expression von CD105 nahm in beiden Populationen ab. Hingegen nahm die Expression von Nestin in den hSGSC1-PD47-hTERT zu, während sie in den hSGSC1-PD29-hTERT abnahm.

Die Unterschiede der beiden Populationen nach der Immortalisierung können verschiedene Gründe haben. Zum einen ist unklar, wie oft hTERT durch die Retroviren in

das Genom der Zellen eingebaut wurde. Zum anderen kann auch der Ort der Insertation des hTERT-Gens von Zelle zu Zelle, und damit die Expression, variieren²⁹. Ebenfalls relevant könnte die Lebenszeit *in vitro* zum Zeitpunkt der Transduktion sein. Im Gegensatz zu den hSGSC1 nach 29 Populationsverdopplungen zeigten die PD47 bereits Anzeichen von Seneszenz und ihre Telomere hatten eine kritische Länge erreicht. Obwohl die hSGSC durch die stabile Integration von hTERT keine Anzeichen von Fehlfunktionen oder Transformation zeigten, bleibt das Problem des zufälligen Einbaus der viralen Gene in das Genom und das dadurch erhöhte Risiko der Mutation anderer Gene.

Während der Kultivierung zeigten die hSGSC1 einen replikativen Verlust der adipogenen Differenzierung, wie dies auch schon für hMSC beschrieben wurde¹¹⁵. Der Verlauf der Differenzierung während der Kultivierung konnte quantitativ durch die Expression des Lipidtropfen-assoziierten Proteins Perilipin, mittels Adipogenesis-Assay sowie einer selbst entwickelten automatisierten Bildverarbeitung gezeigt werden. Die entwickelte Bildverarbeitung beruht auf großflächigen Aufnahmen der adipogen differenzierten Kulturen. Nach Färbung der von Adipozyten eingelagerten Fetttropfen und der Zellkerne, kann die Anzahl adipogen differenzierter Zellen sowie die Gesamtzellzahl bestimmt und damit die Differenzierungsrate berechnet werden.

Die drei quantifizierenden Methoden zeigten ein vergleichbares Ergebnis, wobei ausschließlich die entwickelte Bildverarbeitung eine absolute Differenzierungsrate zum Ergebnis hat. Die damit ermittelten Differenzierungsraten nahmen von 9 % (PD19) auf 1 % (PD31) und 0,5 % (PD47) ab, bevor die hSGSC1 ihre Teilung einstellten. Nach der Immortalisierung zeigten die hSGSC1-PD29-hTERT keine detektierbare adipogene Differenzierung. Die hSGSC1-PD47-hTERT zeigten 40 PD nach der stabilen hTERT-Integration ebenfalls keine Differenzierung. Nach 120 PD differenzierten jedoch 7 % und nach weitem 52 PD sogar 9 % der hSGSC1-PD47-hTERT zum adipogenen Phänotyp. Im Gegensatz zu den von Simonsen et al. beschriebenen immortalisierten hMSC, konnten hier die hSGSC1 nicht ohne den Verlust des Differenzierungspotentials immortalisiert werden¹⁵². Dafür erlangten die hSGSC-hTERT-PD47 ihre zwischenzeitlich verloren gegangene Fähigkeit zur adipogenen Differenzierung wieder zurück. Ein weiterer Unterschied zu den Studien von Simonsen war der Zeitpunkt der hTERT-Integration. Simonsen transduzierte die hMSC bereits nach 12 PD. Zu diesem Zeitpunkt hatten die hMSC noch ihre volle Differenzierungsfähigkeit. Die hier durchgeführte

Transduktion bei den hSGSC erfolgte nach 29 und 47 PD *in vitro*. Zu diesem Zeitpunkt konnten bereits Telomerverkürzungen, Seneszenz und Rückgang der Differenzierbarkeit gezeigt werden.

Wie zuverlässig ist die entwickelte automatisierte mikroskopische Quantifizierung der adipogenen Differenzierung?

Herkömmlich verwendete Methoden zur Quantifizierung der adipogenen Differenzierung ermöglichen nur die relative Quantifizierung oder berücksichtigen nur eine geringe Zellzahl und somit einen kleinen Bereich der Population. Im Gegensatz zu molekularbiologischen Methoden wie real-time PCR und Enzymaktivitätsbestimmungen (GPDH) zeigt die hier entwickelte automatisierte Bildverarbeitung einen orts aufgelösten Zusammenhang zwischen der Gesamtzellzahl und der Anzahl mit adipogenem Phänotyp. Durch die großflächige Aufnahme von 192 Einzelbildern erfolgte die Untersuchung einer hohen Zellzahl im Bereich von 30.000.

Die mittels automatisierter Bildverarbeitung berechneten Differenzierungsraten stimmen im Rahmen der Messgenauigkeit mit der optischen, manuellen Auszählung von zehn zufällig gewählten Einzelbildern von jedem der 28 Kultivierungsansätze überein. Auch die Ergebnisse des Adipogenesis-Assay unterstützen die Ergebnisse, wobei die hier entwickelte Bildverarbeitung eine höhere Sensitivität aufweist. Dies wird vor allem bei niedrigen Differenzierungsraten deutlich. Wie von Koopman et al. und Kinkel et al. beschrieben, konnte auch hier eine unspezifische rosa Hintergrundfärbung festgestellt werden, die zur Detektion von „falsch-positiven“ Ereignissen führen kann^{91, 99}. Durch den hier verwendeten variablen RGB-Schwellenwert konnte im Gegensatz zu der Graustufenauswertung von Koopman et al. die Hintergrundfärbung effektiv unterdrückt werden⁹⁹.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Anwesenheit von Dexamethason eine Voraussetzung für die adipogene Differenzierung der hSGSC1 darstellt. Dabei liegt die optimale Dexamethason-Konzentration zwischen 10 und 100 nM, da der Einsatz von 100 nM nicht zu einer entsprechenden Erhöhung der Differenzierungsrate führt. Dies stimmt mit den Daten aus der Literatur für murine 3T3-L1 Präadipozyten und humane mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark überein^{60, 130}. Die benutzten Insulin- und IGF-1-Konzentrationen zeigten einen vergleichbaren Einfluss auf die adipogene

Differenzierung. Aus den Ergebnissen lässt sich also keine Präferenz für Insulin oder IGF-1 für ein optimiertes adipogenes Differenzierungsprotokoll für hSGSC ableiten.

Die hier entwickelte Bildverarbeitung führte bei allen Ansätzen zu vergleichbaren Ergebnissen. Dies unterstreicht die Stabilität des Ansatzes, wobei die hohe Standardabweichung auf die Heterogenität der adipogenen Differenzierung in hSGSC zurückzuführen ist. Das Verhalten des Variationskoeffizienten zeigt die Notwendigkeit einer großflächigen Untersuchung. Ein einzelnes Bild kann nur zum qualitativen Nachweis der Differenzierung, aber nicht zu einer Aussage über Quantität, Differenzierungseffizienz und Differenzierungsheterogenität genutzt werden. Die großflächigen Aufnahmen waren Voraussetzung, um Aussagen über das Differenzierungsverhalten bezüglich der Zellverteilung machen zu können. Deutlich konnten unterschiedlich dichte Zellbereiche und verschiedene Muster der rot gefärbten Adipozyten erkannt werden, was auf eine heterogene adipogene Differenzierung der hSGSC in Clustern schließen lässt. Dies könnte auf die klonale Entstehung der Zellcluster aus sehr potenten hSGSC zurückzuführen sein. Zusätzlich könnte der induzierende Einfluss der differenzierten Zellen auf ihre Nachbarn zu der Clusterbildung beigetragen haben.

Weiterhin ist durch einfaches Anpassen der benutzten Filter und Parameter die entwickelte Bildverarbeitung auch für andere Zellen und Differenzierungen anwendbar. Dies konnte z. B. durch die Bestimmung der adipogenen Differenzierungsrate von humanen mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark gezeigt werden. So konnte die hier entwickelte automatisierte Bildverarbeitung auch zur Bestimmung der adipogenen Differenzierungsrate bei mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark eingesetzt werden.

Zusammenfassend konnten die in dieser Arbeit untersuchten Zellen aus Pankreas und Speicheldrüse aufgrund ihrer hohen Proliferationskapazität, ihres Stammzell-Expressionsprofils und ihres Keimblatt-übergreifenden Differenzierungspotentials als zueinander ähnliche multipotente adulte Stammzellen charakterisiert werden. Aufgrund der ontogenetischen Entstehung der beiden Gewebe aus dem embryonalen Darmrohr könnte eine gemeinsame endodermale Stammzelle der Ursprung der hPSC und hSGSC darstellen. Durch die Überexpression von hTERT konnten die Stammzellen aus der Speicheldrüse zu einer Stammzelllinie immortalisiert werden. Mit ihren charakteristischen Stammzeleigenschaften und der unbegrenzten Proliferationskapazität

stellen sie damit ein dauerhaft zu verwendendes Studienobjekt für die Untersuchung adulter Stammzellen dar. Desweiteren wurden methodische Verbesserungen auf dem Gebiet der Bildauswertung zur Charakterisierung des Differenzierungspotentials entwickelt und erfolgreich angewandt.

Ausblick

Der potentielle Nutzen von embryonalen wie auch adulten Stammzellen für die Regenerative Medizin ist unumstritten. Adulte Stammzellen werden aufgrund ihrer autologen Verwendung und leichten Zugänglichkeit bereits in klinischen Studien eingesetzt. Durch die Generierung induzierter pluripotenter Stammzellen (iPS) wird seit 2006 an einer möglichen Alternative zu den ethisch problematischen humanen embryonalen Stammzellen gearbeitet. Mittlerweile konnte auch der letzte Beweis ihrer Pluripotenz durch die Erzeugung fertiler Mäuse aus murinen iPS erbracht werden^{85, 185}. Die Möglichkeit, aus somatischen Zellen iPS zu generieren, eröffnet ein neues Forschungsgebiet und eventuell auch neue Möglichkeiten für die Regenerative Medizin.

Den in dieser Arbeit charakterisierten adulten Stammzellen hPSC und hSGSC konnte ein hohes Differenzierungspotential in die mesodermale Richtung nachgewiesen werden. In weiterführenden Studien müssen sie allerdings intensiver hinsichtlich ihres Differenzierungspotentials in endodermale und ektodermale Richtung untersucht werden, um ihr gesamtes Potential einschätzen zu können. Bezüglich ihrer regenerativen Fähigkeiten *in vivo* sind außerdem Studien im Tiermodell nötig. Dadurch könnte unter anderem die Repopulation von zerstörten Drüsen und die Produktion exokriner Sekrete untersucht werden. Vor allem erfüllen die Stammzellen aus der Speicheldrüse (hSGSC) mit ihrem hohen Differenzierungspotential und der leichten Zugänglichkeit wichtige Kriterien für ihren zukünftigen, autologen, therapeutischen Einsatz und sind daher für In-vivo-Versuche bevorzugt einzusetzen.

Um die durch stabile Integration von hTERT generierten Stammzelllinien hSGSC1-hTERT hinsichtlich Veränderungen aufgrund der Immortalisierung näher zu charakterisieren, sollten Untersuchungen der Genexpression mittels eines Genchips durchgeführt werden. Außerdem muss deren Differenzierbarkeit in Zelltypen der endodermalen und ektodermalen Keimblätter überprüft werden. Unabhängig davon stellt diese Stammzelllinie mit ihren charakteristischen Stammzeleigenschaften und der unbegrenzten Proliferationskapazität ein dauerhaft zu verwendendes Studienobjekt für die Untersuchung adulter Stammzellen dar. Bei der Charakterisierung adulter Stammzellen fehlen neben spezifischen Markern auch generell gut charakterisierte, Spender unabhängige, langzeitstabile Vergleichskulturen.

Bei der Generierung neuer Stammzellpopulationen, wie z. B. den hochpotenten iPS, ist eine Charakterisierung zwingend notwendig. Um neue Populationen bezüglich ihres Differenzierungspotentials einordnen zu können, ist vor allem der Einsatz quantifizierender Methoden sinnvoll. Zur detaillierten Untersuchung der adipogenen Differenzierung kann z. B. die in dieser Arbeit entwickelte Bildverarbeitung eingesetzt werden. Das automatisierte Verfahren bietet neben der qualitativen und quantitativen Analyse der adipogenen Differenzierungen, orts aufgelöste Informationen der Adipogenese sowie eine standardisierte Auswertung.

5 Literaturverzeichnis

1. Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, Goldstein S, Younglai EV, Futcher AB, Greider CW, Harley CB (1992) Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 10114-8
2. Altiock S, Xu M, Spiegelman BM (1997) PPARgamma induces cell cycle withdrawal: inhibition of E2F/DP DNA-binding activity via down-regulation of PP2A. *Genes Dev* 11: 1987-98
3. Awad HA, Halvorsen YD, Gimble JM, Guilak F (2003) Effects of transforming growth factor beta1 and dexamethasone on the growth and chondrogenic differentiation of adipose-derived stromal cells. *Tissue Eng* 9: 1301-12
4. Backesjo CM, Li Y, Lindgren U, Haldosen LA (2006) Activation of Sirt1 decreases adipocyte formation during osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells. *J Bone Miner Res* 21: 993-1002
5. Baertschiger RM, Bosco D, Morel P, Serre-Beinier V, Berney T, Buhler LH, Gonelle-Gispert C (2008) Mesenchymal stem cells derived from human exocrine pancreas express transcription factors implicated in beta-cell development. *Pancreas* 37: 75-84
6. Baeyens L, De Breuck S, Lardon J, Mfopou JK, Rooman I, Bouwens L (2005) In vitro generation of insulin-producing beta cells from adult exocrine pancreatic cells. *Diabetologia* 48: 49-57
7. Banfi A, Bianchi G, Notaro R, Luzzatto L, Cancedda R, Quarto R (2002) Replicative aging and gene expression in long-term cultures of human bone marrow stromal cells. *Tissue Eng* 8: 901-10
8. 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: 189-200
9. Battula VL, Bareiss PM, Trembl S, Conrad S, Albert I, Hojak S, Abele H, Schewe B, Just L, Skutella T, Buhring HJ (2007) Human placenta and bone marrow derived MSC cultured in serum-free, b-FGF-containing medium express cell surface frizzled-9 and SSEA-4 and give rise to multilineage differentiation. *Differentiation* 75: 279-91
10. 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: 675-82
11. Beattie GM, Levine F, Mally MI, Otonkoski T, O'Brien JS, Salomon DR, Hayek A (1994) Acid beta-galactosidase: a developmentally regulated marker of endocrine cell precursors in the human fetal pancreas. *J Clin Endocrinol Metab* 78: 1232-40
12. Betts DH, Perrault SD, King WA (2008) Low oxygen delays fibroblast senescence despite shorter telomeres. *Biogerontology* 9: 19-31
13. Bhandari N, Figueroa DJ, Lawrence JW, Gerhold DL (2008) Phospholipidosis assay in HepG2 cells and rat or rhesus hepatocytes using phospholipid probe NBD-PE. *Assay Drug Dev Technol* 6: 407-19
14. Bi W, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR, de Crombrughe B (1999) Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet* 22: 85-9
15. Bianco P, Robey PG (2001) Stem cells in tissue engineering. *Nature* 414: 118-21
16. Blackburn EH, Gall JG (1978) A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in Tetrahymena. *J Mol Biol* 120: 33-53
17. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE (1998) Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279: 349-52
18. Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC, Tatarkiewicz K, Song KH, Sharma A, O'Neil JJ (2000) In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 7999-8004
19. Bouwens L, Wang RN, De Blay E, Pipeleers DG, Kloppel G (1994) Cytokeratins as markers of ductal cell differentiation and islet neogenesis in the neonatal rat pancreas. *Diabetes* 43: 1279-83
20. Braig M, Lee S, Lodenkemper C, Rudolph C, Peters AH, Schlegelberger B, Stein H, Dorken B, Jenuwein T, Schmitt CA (2005) Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* 436: 660-5
21. Brasaemle DL, Barber T, Wolins NE, Serrero G, Blanchette-Mackie EJ, Londos C (1997) Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein. *J Lipid Res* 38: 2249-63

22. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L (1994) Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 331: 889-95
23. Brittberg M, Tallheden T, Sjogren-Jansson B, Lindahl A, Peterson L (2001) Autologous chondrocytes used for articular cartilage repair: an update. *Clin Orthop Relat Res*: S337-48
24. Broccoli D, Young JW, de Lange T (1995) Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 9082-6
25. Brummendorf TH, Dragowska W, Zijlmans J, Thornbury G, Lansdorp PM (1998) Asymmetric cell divisions sustain long-term hematopoiesis from single-sorted human fetal liver cells. *J Exp Med* 188: 1117-24
26. Buckwalter JA (1983) Proteoglycan structure in calcifying cartilage. *Clin Orthop Relat Res*: 207-32
27. Buhring HJ, Battula VL, Treml S, Schewe B, Kanz L, Vogel W (2007) Novel markers for the prospective isolation of human MSC. *Ann N Y Acad Sci* 1106: 262-71
28. Bunnell BA, Flaatt M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C (2008) Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods* 45: 115-20
29. Bushman F, Lewinski M, Ciuffi A, Barr S, Leipzig J, Hannenhalli S, Hoffmann C (2005) Genome-wide analysis of retroviral DNA integration. *Nat Rev Microbiol* 3: 848-58
30. Caplan AI, Bruder SP (2001) Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med* 7: 259-64
31. Carfi M, Croera C, Ferrario D, Campi V, Bowe G, Pieters R, Gribaldo L (2008) TBTC induces adipocyte differentiation in human bone marrow long term culture. *Toxicology* 249: 11-8
32. Carrel A (1912) On the permanent life of tissue outside the organism *J Exp Med* 15: 516-528
33. Cavaleri F, Scholer HR (2003) Nanog: a new recruit to the embryonic stem cell orchestra. *Cell* 113: 551-2
34. Chin MH, Mason MJ, Xie W, Volinia S, Singer M, Peterson C, Ambartsumyan G, Aimiwu O, Richter L, Zhang J, Khvorostov I, Ott V, Grunstein M, Lavon N, Benvenisty N, Croce CM, Clark AT, Baxter T, Pyle AD, Teitell MA, Pelegrini M, Plath K, Lowry WE (2009) Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. *Cell Stem Cell* 5: 111-23
35. Choi Y, Ta M, Atouf F, Lumelsky N (2004) Adult pancreas generates multipotent stem cells and pancreatic and nonpancreatic progeny. *Stem Cells* 22: 1070-84
36. Conget PA, Minguell JJ (1999) Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol* 181: 67-73
37. Cserjesi P, Brown D, Ligon KL, Lyons GE, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Olson EN (1995) Scleraxis: a basic helix-loop-helix protein that prefigures skeletal formation during mouse embryogenesis. *Development* 121: 1099-110
38. Czyz J, Wiese C, Rolletschek A, Blyszczuk P, Cross M, Wobus AM (2003) Potential of embryonic and adult stem cells in vitro. *Biol Chem* 384: 1391-409
39. Deslex S, Negrel R, Vannier C, Etienne J, Ailhaud G (1987) Differentiation of human adipocyte precursors in a chemically defined serum-free medium. *Int J Obes* 11: 19-27
40. Diaz-Romero J, Nesic D, Grogan SP, Heini P, Mainil-Varlet P (2008) Immunophenotypic changes of human articular chondrocytes during monolayer culture reflect bona fide dedifferentiation rather than amplification of progenitor cells. *J Cell Physiol* 214: 75-83
41. Diaz G, Batetta B, Sanna F, Uda S, Reali C, Angius F, Melis M, Falchi AM (2008) Lipid droplet changes in proliferating and quiescent 3T3 fibroblasts. *Histochem Cell Biol* 129: 611-21
42. 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: 275-81
43. Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, Weisenthal LM, Mitsumoto H, Chung W, Croft GF, Saphier G, Leibel R, Golland R, Wichterle H, Henderson CE, Eggan K (2008) Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 321: 1218-21
44. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, 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: 9363-7
45. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8: 315-7
46. Draper JS, Pigott C, Thomson JA, Andrews PW (2002) Surface antigens of human embryonic stem cells: changes upon differentiation in culture. *J Anat* 200: 249-58
47. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE (2006) Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 126: 677-89

48. Evans MJ, Kaufman MH (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292: 154-6
49. Falanga V, Kirsner RS (1993) Low oxygen stimulates proliferation of fibroblasts seeded as single cells. *J Cell Physiol* 154: 506-10
50. Flores I, Benetti R, Blasco MA (2006) Telomerase regulation and stem cell behaviour. *Curr Opin Cell Biol* 18: 254-60
51. Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luria EA, Ruadkow IA (1974) Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol* 2: 83-92
52. Gallo R, Gambelli F, Gava B, Sasdelli F, Tellone V, Masini M, Marchetti P, Dotta F, Sorrentino V (2007) Generation and expansion of multipotent mesenchymal progenitor cells from cultured human pancreatic islets. *Cell Death Differ* 14: 1860-71
53. Gitelman SE, Kirk M, Ye JQ, Filvaroff EH, Kahn AJ, Derynck R (1995) Vgr-1/BMP-6 induces osteoblastic differentiation of pluripotential mesenchymal cells. *Cell Growth Differ* 6: 827-36
54. Gleiberman AS, Encinas JM, Mignone JL, Michurina T, Rosenfeld MG, Enikolopov G (2005) Expression of nestin-green fluorescent protein transgene marks oval cells in the adult liver. *Dev Dyn* 234: 413-21
55. Gmyr V, Kerr-Conte J, Belaich S, Vandewalle B, Leteurtre E, Vantuyghem MC, Lecomte-Houcke M, Proye C, Lefebvre J, Pattou F (2000) Adult human cyokeratin 19-positive cells reexpress insulin promoter factor 1 in vitro: further evidence for pluripotent pancreatic stem cells in humans. *Diabetes* 49: 1671-80
56. Gorjup E, Danner S, Rotter N, Habermann J, Brassat U, Brummendorf TH, Wien S, Meyerhans A, Wollenberg B, Kruse C, von Briesen H (2009) Glandular tissue from human pancreas and salivary gland yields similar stem cell populations. *Eur J Cell Biol* 88: 409-21
57. Green H, Meuth M (1974) An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell* 3: 127-33
58. Green H, Kehinde O (1975) An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell* 5: 19-27
59. Greenberg AS, Egan JJ, Wek SA, Garty NB, Blanchette-Mackie EJ, Londos C (1991) Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets. *J Biol Chem* 266: 11341-6
60. Gregoire FM, Smas CM, Sul HS (1998) Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 78: 783-809
61. Greider CW, Blackburn EH (1985) Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* 43: 405-13
62. Gronthos S, Brahimi J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, DenBesten P, Robey PG, Shi S (2002) Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res* 81: 531-5
63. Harley CB, Futcher AB, Greider CW (1990) Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345: 458-60
64. Harley CB (1991) Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat Res* 256: 271-82
65. Harley CB, Vaziri H, Counter CM, Allsopp RC (1992) The telomere hypothesis of cellular aging. *Exp Gerontol* 27: 375-82
66. Hayflick L, Moorhead PS (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25: 585-621
67. Hayflick L (1965) The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res* 37: 614-36
68. Haynesworth SE (1994) Diminution of the number of mesenchymal stem cells as a cause for skeletal aging., in *Musculoskeletal Soft-tissue Aging: Impact on Mobility*, American Academy of Orthopaedic Surgeons, Rosemont, IL, USA
69. Herrera MB, Bruno S, Buttiglieri S, Tetta C, Gatti S, Deregibus MC, Bussolati B, Camussi G (2006) Isolation and characterization of a stem cell population from adult human liver. *Stem Cells* 24: 2840-50
70. Hess D, Li L, Martin M, Sakano S, Hill D, Strutt B, Thyssen S, Gray DA, Bhatia M (2003) Bone marrow-derived stem cells initiate pancreatic regeneration. *Nat Biotechnol* 21: 763-70
71. Hickok NJ, Haas AR, Tuan RS (1998) Regulation of chondrocyte differentiation and maturation. *Microsc Res Tech* 43: 174-90
72. Hisatomi Y, Okumura K, Nakamura K, Matsumoto S, Satoh A, Nagano K, Yamamoto T, Endo F (2004) Flow cytometric isolation of endodermal progenitors from mouse salivary gland differentiate into hepatic and pancreatic lineages. *Hepatology* 39: 667-75

73. Hoogduijn MJ, Crop MJ, Peeters AM, Van Osch GJ, Balk AH, Ijzermans JN, Weimar W, Baan CC (2007) Human heart, spleen, and perirenal fat-derived mesenchymal stem cells have immunomodulatory capacities. *Stem Cells Dev* 16: 597-604
74. Huang H, Tang X (2003) Phenotypic determination and characterization of nestin-positive precursors derived from human fetal pancreas. *Lab Invest* 83: 539-47
75. Hung SC, Yang DM, Chang CF, Lin RJ, Wang JS, Low-Tone Ho L, Yang WK (2004) Immortalization without neoplastic transformation of human mesenchymal stem cells by transduction with HPV16 E6/E7 genes. *Int J Cancer* 110: 313-9
76. Janus 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: 843-50
77. Janssens S, Dubois C, Bogaert J, Theunissen K, Deroose C, Desmet W, Kalantzi M, Herbots L, Sinnaeve P, Dens J, Maertens J, Rademakers F, Dymarkowski S, Gheysens O, Van Cleemput J, Bormans G, Nuyts J, Belmans A, Mortelmans L, Boogaerts M, Van de Werf F (2006) Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 367: 113-21
78. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM (2002) Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418: 41-9
79. Jones EA, Kinsey SE, English A, Jones RA, Straszynski L, Meredith DM, Markham AF, Jack A, Emery P, McGonagle D (2002) Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. *Arthritis Rheum* 46: 3349-60
80. Joraku A, Sullivan CA, Yoo JJ, Atala A (2005) Tissue engineering of functional salivary gland tissue. *Laryngoscope* 115: 244-8
81. Kajahn J, Gorjup E, Tiede S, von Briesen H, Paus R, Kruse C, Danner S (2007) Skin-derived human adult stem cells surprisingly share many features with human pancreatic stem cells. *Eur J Cell Biol*
82. Kaji K, Norrby K, Paca A, Mileikovsky M, Mohseni P, Woltjen K (2009) Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature* 458: 771-5
83. Kanatsu-Shinohara M, Toyokuni S, Shinohara T (2004) CD9 is a surface marker on mouse and rat male germline stem cells. *Biol Reprod* 70: 70-5
84. Kanda Y, Matsuda M, Tawaramoto K, Kawasaki F, Hashiramoto M, Matsuki M, Kaku K (2008) Effects of sulfonylurea drugs on adiponectin production from 3T3-L1 adipocytes: implication of different mechanism from pioglitazone. *Diabetes Res Clin Pract* 81: 13-8
85. Kang L, Wang J, Zhang Y, Kou Z, Gao S (2009) iPS Cells Can Support Full-Term Development of Tetraploid Blastocyst-Complemented Embryos. *Cell Stem Cell*
86. Ketteler R, Glaser S, Sandra O, Martens UM, Klingmuller U (2002) Enhanced transgene expression in primitive hematopoietic progenitor cells and embryonic stem cells efficiently transduced by optimized retroviral hybrid vectors. *Gene Ther* 9: 477-87
87. Kim D, Kim CH, Moon JI, Chung YG, Chang MY, Han BS, Ko S, Yang E, Cha KY, Lanza R, Kim KS (2009) Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cells by Direct Delivery of Reprogramming Proteins. *Cell Stem Cell*
88. Kim JB, Sebastiano V, Wu G, Arauzo-Bravo MJ, Sasse P, Gentile L, Ko K, Ruau D, Ehrich M, van den Boom D, Meyer J, Hubner K, Bernemann C, Ortmeier C, Zenke M, Fleischmann BK, Zaehres H, Scholer HR (2009) Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell* 136: 411-9
89. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW (1994) Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266: 2011-5
90. Kim WY, Sharpless NE (2006) The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. *Cell* 127: 265-75
91. Kinkel AD, Fernyhough ME, Helterline DL, Vierck JL, Oberg KS, Vance TJ, Hausman GJ, Hill RA, Dodson MV (2004) Oil red-O stains non-adipogenic cells: a precautionary note. *Cytotechnology* 46: 49-56
92. Kirkwood TB (2005) Understanding the odd science of aging. *Cell* 120: 437-47
93. Kishi T, Takao T, Fujita K, Taniguchi H (2006) Clonal proliferation of multipotent stem/progenitor cells in the neonatal and adult salivary glands. *Biochem Biophys Res Commun* 340: 544-52
94. Kiyono T, Foster SA, Koop JJ, McDougall JK, Galloway DA, Klingelutz AJ (1998) Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* 396: 84-8
95. Klassen H, Schwartz MR, Bailey AH, Young MJ (2001) Surface markers expressed by multipotent human and mouse neural progenitor cells include tetraspanins and non-protein epitopes. *Neurosci Lett* 312: 180-2

96. Kogler G, Sensken S, Airey JA, Trapp T, Muschen M, Feldhahn N, Liedtke S, Sorg RV, Fischer J, Rosenbaum C, Greschat S, Knipper A, Bender J, Degistirici O, Gao J, Caplan AI, Colletti EJ, Almeida-Porada G, Muller HW, Zanjani E, Wernet P (2004) A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med* 200: 123-35
97. Kojima H, Nakamura T, Fujita Y, Kishi A, Fujimiya M, Yamada S, Kudo M, Nishio Y, Maegawa H, Haneda M, Yasuda H, Kojima I, Seno M, Wong NC, Kikkawa R, Kashiwagi A (2002) Combined expression of pancreatic duodenal homeobox 1 and islet factor 1 induces immature enterocytes to produce insulin. *Diabetes* 51: 1398-408
98. Kolquist KA, Ellisen LW, Counter CM, Meyerson M, Tan LK, Weinberg RA, Haber DA, Gerald WL (1998) Expression of TERT in early premalignant lesions and a subset of cells in normal tissues. *Nat Genet* 19: 182-6
99. Koopman R, Schaart G, Hesselink MK (2001) Optimisation of oil red O staining permits combination with immunofluorescence and automated quantification of lipids. *Histochem Cell Biol* 116: 63-8
100. Krishnamurthy J, Ramsey MR, Ligon KL, Torrice C, Koh A, Bonner-Weir S, Sharpless NE (2006) p16INK4a induces an age-dependent decline in islet regenerative potential. *Nature* 443: 453-7
101. Kruse C, Birth M, Rohwedel J, Assmuth K, Goepel A, Wedel T (2004) Pluripotency of adult stem cells derived from human and rat pancreas. *Applied Physics A* 26
102. Kruse C, Kajahn J, Petschnik AE, Maass A, Klink E, Rapoport DH, Wedel T (2006) Adult pancreatic stem/progenitor cells spontaneously differentiate in vitro into multiple cell lineages and form teratoma-like structures. *Ann Anat* 188: 503-17
103. Krylova TA, Zenin VV, Musorina NS, Baranov VS, Bichevaia NK, Korsak VS, Nikol'skii NN, Pinaev GP, Polianskaia GG (2003) [Isolation and characterisation of continuous human embryonic stem cell lines]. *Tsitologija* 45: 1172-8
104. Leblond CP (1964) Classification of Cell Populations on the Basis of Their Proliferative Behavior. *Natl Cancer Inst Monogr* 14: 119-50
105. Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH (2004) Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 103: 1669-75
106. Lee RH, Kim B, Choi I, Kim H, Choi HS, Suh K, Bae YC, Jung JS (2004) Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem* 14: 311-24
107. Leong KG, Wang BE, Johnson L, Gao WQ (2008) Generation of a prostate from a single adult stem cell. *Nature* 456: 804-8
108. Levy MZ, Allsopp RC, Futcher AB, Greider CW, Harley CB (1992) Telomere end-replication problem and cell aging. *J Mol Biol* 225: 951-60
109. Lillie RD, Ashburn LL (1943) Supersaturated solutions of fat stains in dilute isopropanol for demonstration of acute fatty degeneration not shown by Herxheimer's technique. *Arch. Pathol.* 36: 432-440
110. Lin G, Finger E, Gutierrez-Ramos JC (1995) Expression of CD34 in endothelial cells, hematopoietic progenitors and nervous cells in fetal and adult mouse tissues. *Eur J Immunol* 25: 1508-16
111. Mareschi K, Ferrero I, Rustichelli D, Aschero S, Gammaitoni L, Aglietta M, Madon E, Fagioli F (2006) Expansion of mesenchymal stem cells isolated from pediatric and adult donor bone marrow. *J Cell Biochem* 97: 744-54
112. Martin GR (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 7634-8
113. Meyer GP, Wollert KC, Lotz J, Steffens J, Lippolt P, Fichtner S, Hecker H, Schaefer A, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Drexler H (2006) Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months' follow-up data from the randomized, controlled BOOST (BOne marrOw transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) trial. *Circulation* 113: 1287-94
114. Meyerrose TE, De Ugarte DA, Hofling AA, Herrbrich PE, Cordonnier TD, Shultz LD, Eagon JC, Wirthlin L, Sands MS, Hedrick MA, Nolte JA (2007) In vivo distribution of human adipose-derived mesenchymal stem cells in novel xenotransplantation models. *Stem Cells* 25: 220-7
115. Muraglia A, Cancedda R, Quarto R (2000) Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci* 113 (Pt 7): 1161-6
116. Murphy DJ, Vance J (1999) Mechanisms of lipid-body formation. *Trends Biochem Sci* 24: 109-15
117. Nagano K, Taoka M, Yamauchi Y, Itagaki C, Shinkawa T, Nunomura K, Okamura N, Takahashi N, Izumi T, Isobe T (2005) Large-scale identification of proteins expressed in mouse embryonic stem cells. *Proteomics* 5: 1346-61

118. Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochiduki Y, Takizawa N, Yamanaka S (2008) Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 26: 101-6
119. Nickoloff BJ (1991) The human progenitor cell antigen (CD34) is localized on endothelial cells, dermal dendritic cells, and perifollicular cells in formalin-fixed normal skin, and on proliferating endothelial cells and stromal spindle-shaped cells in Kaposi's sarcoma. *Arch Dermatol* 127: 523-9
120. Nishimura EK, Granter SR, Fisher DE (2005) Mechanisms of hair graying: incomplete melanocyte stem cell maintenance in the niche. *Science* 307: 720-4
121. Offield MF, Jetton TL, Labosky PA, Ray M, Stein RW, Magnuson MA, Hogan BL, Wright CV (1996) PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development* 122: 983-95
122. Oka M, Tagoku K, Russell TL, Nakano Y, Hamazaki T, Meyer EM, Yokota T, Terada N (2002) CD9 is associated with leukemia inhibitory factor-mediated maintenance of embryonic stem cells. *Mol Biol Cell* 13: 1274-81
123. Okamoto K, Okazawa H, Okuda A, Sakai M, Muramatsu M, Hamada H (1990) A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells. *Cell* 60: 461-72
124. Oritani K, Wu X, Medina K, Hudson J, Miyake K, Gimble JM, Burstein SA, Kincade PW (1996) Antibody ligation of CD9 modifies production of myeloid cells in long-term cultures. *Blood* 87: 2252-61
125. Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS, Kennedy MB, Pockwinse S, Lian JB, Stein GS (1990) Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol* 143: 420-30
126. Pairault J, Green H (1979) A study of the adipose conversion of suspended 3T3 cells by using glycerophosphate dehydrogenase as differentiation marker. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 5138-42
127. Pang K, Mukonoweshuro C, Wong GG (1994) Beta cells arise from glucose transporter type 2 (Glut2)-expressing epithelial cells of the developing rat pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 9559-63
128. Parrinello S, Samper E, Krtolica A, Goldstein J, Melov S, Campisi J (2003) Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat Cell Biol* 5: 741-7
129. Pesce M, Anastassiadis K, Scholer HR (1999) Oct-4: lessons of totipotency from embryonic stem cells. *Cells Tissues Organs* 165: 144-52
130. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143-7
131. Prince M, Banerjee C, Javed A, Green J, Lian JB, Stein GS, Bodine PV, Komm BS (2001) Expression and regulation of Runx2/Cbfa1 and osteoblast phenotypic markers during the growth and differentiation of human osteoblasts. *J Cell Biochem* 80: 424-40
132. Prockop DJ (2004) Embryonic Stem Cells Versus Adult Stem Cells: Some Seemingly Simple Questions, in *Handbook of stem cells* (Lanza R, Ed.), Elsevier Inc.
133. Prusa AR, Marton E, Rosner M, Bernaschek G, Hengstschlager M (2003) Oct-4-expressing cells in human amniotic fluid: a new source for stem cell research? *Hum Reprod* 18: 1489-93
134. Putt FA (1972) *Manual of histopathological staining*, pp 194-196, New York
135. Rosen ED, Spiegelman BM (2000) Molecular regulation of adipogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16: 145-71
136. Rotter N, Oder J, Schlenke P, Lindner U, Bohrsen F, Kramer J, Rohwedel J, Huss R, Brandau S, Wollenberg B, Lang S (2008) Isolation and characterization of adult stem cells from human salivary glands. *Stem Cells Dev* 17: 509-18
137. Saito H, Hammond AT, Moses RE (1995) The effect of low oxygen tension on the in vitro-replicative life span of human diploid fibroblast cells and their transformed derivatives. *Exp Cell Res* 217: 272-9
138. Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, Freeman TB, Saporta S, Janssen W, Patel N, Cooper DR, Sanberg PR (2000) Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol* 164: 247-56
139. Satija NK, Gurudutta GU, Sharma S, Afrin F, Gupta P, Verma YK, Singh VK, Tripathi RP (2007) Mesenchymal stem cells: molecular targets for tissue engineering. *Stem Cells Dev* 16: 7-23
140. Sato A, Okumura K, Matsumoto S, Hattori K, Hattori S, Shinohara M, Endo F (2007) Isolation, tissue localization, and cellular characterization of progenitors derived from adult human salivary glands. *Cloning Stem Cells* 9: 191-205

141. Schmitz S (2007) *Der Experimentator: Zellkultur*, Elsevier, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
142. Schultz SS, Abraham S, Lucas PA (2006) Stem cells isolated from adult rat muscle differentiate across all three dermal lineages. *Wound Repair Regen* 14: 224-31
143. Schwitzgebel VM, Scheel DW, Conners JR, Kalamaras J, Lee JE, Anderson DJ, Sussel L, Johnson JD, German MS (2000) Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas. *Development* 127: 3533-42
144. Seaberg RM, Smukler SR, Kieffer TJ, Enikolopov G, Asghar Z, Wheeler MB, Korbitt G, van der Kooy D (2004) Clonal identification of multipotent precursors from adult mouse pancreas that generate neural and pancreatic lineages. *Nat Biotechnol* 22: 1115-24
145. Seeberger KL, Dufour JM, Shapiro AM, Lakey JR, Rajotte RV, Korbitt GS (2006) Expansion of mesenchymal stem cells from human pancreatic ductal epithelium. *Lab Invest* 86: 141-53
146. Sekiya I, Tsuji K, Koopman P, Watanabe H, Yamada Y, Shinomiya K, Nifuji A, Noda M (2000) SOX9 enhances aggrecan gene promoter/enhancer activity and is up-regulated by retinoic acid in a cartilage-derived cell line, TC6. *J Biol Chem* 275: 10738-44
147. Sekiya I, Koopman P, Tsuji K, Mertin S, Harley V, Yamada Y, Shinomiya K, Nifuji A, Noda M (2001) Dexamethasone enhances SOX9 expression in chondrocytes. *J Endocrinol* 169: 573-9
148. Shahdadfar A, Fronsdal K, Haug T, Reinholt FP, Brinckmann 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: 1357-66
149. Sharpless NE, DePinho RA (2007) How stem cells age and why this makes us grow old. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 703-13
150. Sherr CJ, DePinho RA (2000) Cellular senescence: mitotic clock or culture shock? *Cell* 102: 407-10
151. Shi S, Gronthos S, Chen S, Reddi A, Counter CM, Robey PG, Wang CY (2002) Bone formation by human postnatal bone marrow stromal stem cells is enhanced by telomerase expression. *Nat Biotechnol* 20: 587-91
152. Simonsen JL, Rosada C, Serakinci N, Justesen J, Stenderup K, Rattan SI, Jensen TG, Kassem M (2002) Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells. *Nat Biotechnol* 20: 592-6
153. Soria B, Bedoya FJ, Martin F (2005) Gastrointestinal stem cells. I. Pancreatic stem cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289: G177-80
154. 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: 462-71
155. Sottile V, Seuwen K (2001) A high-capacity screen for adipogenic differentiation. *Anal Biochem* 293: 124-8
156. Street CN, Lakey JR, Seeberger K, Helms L, Rajotte RV, Shapiro AM, Korbitt GS (2004) Heterogenous expression of nestin in human pancreatic tissue precludes its use as an islet precursor marker. *J Endocrinol* 180: 213-25
157. Suzuki A, Nakauchi H, Taniguchi H (2004) Prospective isolation of multipotent pancreatic progenitors using flow-cytometric cell sorting. *Diabetes* 53: 2143-52
158. Tai MH, Chang CC, Kiupel M, Webster JD, Olson LK, Trosko JE (2005) Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis. *Carcinogenesis* 26: 495-502
159. Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663-76
160. Teitelman G, Alpert S, Polak JM, Martinez A, Hanahan D (1993) Precursor cells of mouse endocrine pancreas coexpress insulin, glucagon and the neuronal proteins tyrosine hydroxylase and neuropeptide Y, but not pancreatic polypeptide. *Development* 118: 1031-9
161. ten Dijke P, Arthur HM (2007) Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 857-69
162. Terai M, Uyama T, Sugiki T, Li XK, Umezawa A, Kiyono T (2005) Immortalization of human fetal cells: the life span of umbilical cord blood-derived cells can be prolonged without manipulating p16INK4a/RB braking pathway. *Mol Biol Cell* 16: 1491-9
163. Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, Henegariu O, Krause DS (2000) Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 32: 11-6
164. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282: 1145-7

165. Ueno H, Yamada Y, Watanabe R, Mukai E, Hosokawa M, Takahashi A, Hamasaki A, Fujiwara H, Toyokuni S, Yamaguchi M, Takeda J, Seino Y (2005) Nestin-positive cells in adult pancreas express amylase and endocrine precursor Cells. *Pancreas* 31: 126-31
166. Umek RM, Friedman AD, McKnight SL (1991) CCAAT-enhancer binding protein: a component of a differentiation switch. *Science* 251: 288-92
167. Viereck V, Siggelkow H, Tauber S, Raddatz D, Schutze N, Hufner M (2002) Differential regulation of Cbfa1/Runx2 and osteocalcin gene expression by vitamin-D3, dexamethasone, and local growth factors in primary human osteoblasts. *J Cell Biochem* 86: 348-56
168. Wagner W, Ho AD (2007) Mesenchymal stem cell preparations--comparing apples and oranges. *Stem Cell Rev* 3: 239-48
169. Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, Goldberg VM (1994) Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 76: 579-92
170. Wakitani S, Saito T, Caplan AI (1995) Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* 18: 1417-26
171. Wang EA, Israel DI, Kelly S, Luxenberg DP (1993) Bone morphogenetic protein-2 causes commitment and differentiation in C3H10T1/2 and 3T3 cells. *Growth Factors* 9: 57-71
172. Weissman IL, Anderson DJ, Gage F (2001) Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 387-403
173. Wiese C, Rolletschek A, Kania G, Blyszczuk P, Tarasov KV, Tarasova Y, Wersto RP, Boheler KR, Wobus AM (2004) Nestin expression--a property of multi-lineage progenitor cells? *Cell Mol Life Sci* 61: 2510-22
174. Wise LS, Green H (1979) Participation of one isozyme of cytosolic glycerophosphate dehydrogenase in the adipose conversion of 3T3 cells. *J Biol Chem* 254: 273-5
175. Wolbank S, Stadler G, Peterbauer A, Gillich A, Karbiener M, Streubel B, Wieser M, Katinger H, van Griensven M, Redl H, Gabriel C, Grillari J, Grillari-Voglauer R (2009) Telomerase Immortalized Human Amnion- and Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells: Maintenance of Differentiation and Immunomodulatory Characteristics. *Tissue Eng Part A*
176. Wolpert L (1999) *Entwicklungsbiologie*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin
177. Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, Desai R, Mileikovsky M, Hamalainen R, Cowling R, Wang W, Liu P, Gertsenstein M, Kaji K, Sung HK, Nagy A (2009) piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 458: 766-70
178. Yamamoto A, Kumakura S, Uchida M, Barrett JC, Tsutsui T (2003) Immortalization of normal human embryonic fibroblasts by introduction of either the human papillomavirus type 16 E6 or E7 gene alone. *Int J Cancer* 106: 301-9
179. Yasumoto S, Kunimura C, Kikuchi K, Tahara H, Ohji H, Yamamoto H, Ide T, Utakoji T (1996) Telomerase activity in normal human epithelial cells. *Oncogene* 13: 433-9
180. Young HE, Steele TA, Bray RA, Hudson J, Floyd JA, Hawkins K, Thomas K, Austin T, Edwards C, Cuzzourt J, Duenzl M, Lucas PA, Black AC, Jr. (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: 51-62
181. Yu H, Fang D, Kumar SM, Li L, Nguyen TK, Acs G, Herlyn M, Xu X (2006) Isolation of a novel population of multipotent adult stem cells from human hair follicles. *Am J Pathol* 168: 1879-88
182. Yudoh K, Matsuno H, Nakazawa F, Katayama R, Kimura T (2001) Reconstituting telomerase activity using the telomerase catalytic subunit prevents the telomere shorting and replicative senescence in human osteoblasts. *J Bone Miner Res* 16: 1453-64
183. Zalzman M, Gupta S, Giri RK, Berkovich I, Sappal BS, Karnieli O, Zern MA, Fleischer N, Efrat S (2003) Reversal of hyperglycemia in mice by using human expandable insulin-producing cells differentiated from fetal liver progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 7253-8
184. Zhang L, Hong TP, Hu J, Liu YN, Wu YH, Li LS (2005) Nestin-positive progenitor cells isolated from human fetal pancreas have phenotypic markers identical to mesenchymal stem cells. *World J Gastroenterol* 11: 2906-11
185. Zhao X, Li W, Lv Z, Liu L, Tong M, Hai T, Hao J, Guo C, MA Q, Wang L, Zeng F, Zhou Q (2009) iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature in press*
186. Zhou H, Wu S, Joo JY, Zhu S, Han DW, Lin T, Trauger S, Bien G, Yao S, Zhu Y, Siuzdak G, Scholer HR, Duan L, Ding S (2009) Generation of Induced Pluripotent Stem Cells Using Recombinant Proteins. *Cell Stem Cell*
187. Zhou Q, Brown J, Kanarek A, Rajagopal J, Melton DA (2008) In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature* 455: 627-32

-
188. Zimmermann S, Glaser S, Ketteler R, Waller CF, Klingmuller U, Martens UM (2004) Effects of telomerase modulation in human hematopoietic progenitor cells. *Stem Cells* 22: 741-9
 189. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH (2002) Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13: 4279-95
 190. Zulewski H, Abraham EJ, Gerlach MJ, Daniel PB, Moritz W, Muller B, Vallejo M, Thomas MK, Habener JF (2001) Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. *Diabetes* 50: 521-33

Publikationen

Fachzeitschriften

Gorjup, E., Wien, S., Peter, L., von Briesen, H., Schmitt, D.: „Automated microscopic quantification of adipogenic differentiation of human gland stem cells“. *Ann Anat.* 2009;191(1):13-22.

Gorjup, E., Danner, S., Rotter, N., Habermann, J., Brassat, U., Brummendorf, T.H., Wien, S., Meyerhans, A., Wollenberg, B., Kruse, C., von Briesen, H.: „Glandular tissue from human pancreas and salivary gland yields similar stem cell populations“. *Eur J Cell Biol.* 2009 Jul;88(7):409-21.

Kajahn, J., **Gorjup, E.**, Tiede, S., von Briesen, H., Paus, R., Kruse, C., Danner, S.: „Skin-derived human adult stem cells surprisingly share many features with human pancreatic stem cells“. *Eur J Cell Biol.* 2008 Jan; 87(1):39-46.

Cho, S., **Gorjup, E.**, Thielecke, H.: „Chip-based time-continuous monitoring of toxic effects on stem cell differentiation“. *Ann Anat.* 2009; 191(1):145-52.

Serra, M., Brito, C., Leite, S.B., **Gorjup, E.**, von Briesen, H., Carrondo, M. J.T., Alves, P. M.: „Stirred Bioreactors for the Expansion of Undifferentiated Adult Pancreatic Stem Cells“. *Ann Anat.* 2009; 191(1):104-15.

Uchugonova, A., Isemann, A., **Gorjup, E.**, Tempea, G., Bückle, R., Watanabe, W., König, K.: „Optical knock out of stem cells with extremely ultrashort femtosecond laser pulses“. *J Biophotonics*, 2008 Dec; 1(6):463-9.

Lermen, D., **Gorjup, E.**, Dyce, p. W., von Briesen, H., Müller, P.: „Neuro-muscular differentiation of adult porcine skin derived stem cells“. Manuskript in Entstehung

Kohl, Y., **Gorjup, E.**, von Briesen, H., Thielecke, H.: „Influence of gold and silver nanoparticles on adipogenic stem cell differentiation“. Manuskript in Entstehung

Uchugonova, A., **Gorjup, E.**, König, K.: „Multiphoton fluorescence lifetime imaging of stem cell spheroids during differentiation“. Manuskript in Entstehung

Proceedings

Thielecke, H., Cho, S., **Gorjup, E.**: „Monitoring of Stem Cell Differentiation by Using a Planar Electrode Chip“. World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering 2006 in Seoul (Korea), 27.08 - 01.09.2006 IFMBE Proceeding, Vol. 14, p. 4242 (2006).

Uchugonova, A., Riemann, I., Stracke, F., **Gorjup, E.**, Leharzic, R., König, K.: „The Influence of NIR Femtosecond Laser Radiation on the Viability of 3D Stem Cell Clusters and Tumor Spheroids“. Multiphoton Microscopy in the Biomedical Science VII, Proceedings of SPIE Vol.6442 (Feb. 10, 2007).

Weiss, E. C., Anastasiadis, P., Hildebrandt, C., **Gorjup, E.**, Lemor, R. M.: „Characterization of Adipogenic, Chondrogenic and Osteogenic Differentiation with Time-resolved Acoustic Microscopy“. Ultrasonic Symposium, 2007. IEEE, 28-31 Oct. 2007; 809-812.

Uchugonova, A., **Gorjup, E.**, Riemann, I., Sauer, D., König, K.: „Two-photon imaging of stem cells“. Multiphoton Microscopy in the Biomedical Sciences VIII, Proceedings of SPIE Vol.6860 (Feb. 15, 2008).

Poster

Gorjup, E., Peter, L., Wien, S., Schmitt, D., von Briesen, H.: „Adipogenic Differentiation of Human Salivary Gland Stem Cells and the Optical Quantification“. *CellPROM Stem Cell Workshop 2007* in Lübeck, 10.-11.09.2007.

Cho, S., **Gorjup, E.**, Thielecke, H.: „Time-continuous Chip-based Monitoring of Toxic Effects on Stem Cell Differentiation“. *CellPROM Stem Cell Workshop 2007* in Lübeck, 10.-11.09.2007.

Gorjup, E., Danner, S., Wien, S., Brassat, U., Kruse, C., von Briesen, H.: „Differentiation and characterization of exocrine gland stem cells isolated from human pancreas and salivary glands“. *CellPROM Abschluss Treffen 2008* in Sulzbach, 26.-27.02.2008.

Kohl, Y., **Gorjup, E.**, von Briesen, H., Thielecke, H.: „Effects of gold nanoparticles on stem cell differentiation“. 5th international conference on gold science, technology and its applications, Heidelberg, 26.-29.07.2009

Vorträge

Gorjup, E.: „Differentiation of Adult Multipotent Stem Cells“. *CellPROM Biology Meeting* in Wien, 30.-31.10.2006

Gorjup, E.: „Glandular Stem Cells“. *CellPROM Stem Cell Workshop 2007* in Lübeck, 10.-11.09.2007

Patente

Fuhr, G.R., von Briesen, H., **Gorjup, E.**, Kruse, C.: „Process and culturing unit for culturing biological cells“. Patent 2007090629 (2007).

Dank

Herrn Prof. Dr. G. R. Fuhr danke ich für die Möglichkeit die Arbeit am Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik durchführen zu dürfen, seinem Interesse am Fortgang der Arbeit sowie den erfrischenden Diskussionen.

Für die Übernahme des Korreferats möchte ich mich bei Prof. Dr. A. Meyerhans bedanken.

Herrn PD Dr. H. v. Briesen danke ich für seine fortwährende Unterstützung in allen wissenschaftlichen und organisatorischen Belangen, die darüber hinaus durch seine ständige Ansprechbarkeit und Diskussionsbereitschaft gekennzeichnet war.

Bei Prof. Dr. C. Kruse und Dr. S. Danner bedanke ich mich für die Isolierung der Stammzellen aus Pankreas und Speicheldrüsen.

Herrn Prof. Dr. T. Brümmendorf und Frau Dr. U. Brassat danke ich für die Unterstützung bei der Telomerlängen- und Telomerasebestimmung sowie für das Überlassen der Plasmide K85 und M57.

Judith Bungert und Sascha Wien danke ich für die Unterstützung im Labor.

Bei Dipl.-Phys. D. Schmitt und L. Peters bedanke ich mich für die erfolgreiche Zusammenarbeit bei der Entwicklung der automatisierten Bildverarbeitung.

Dr. M. Reimann-Zawadzki und Dipl.-Phys. D. Schmitt danke ich für die ausgiebigen Diskussionen um Technik und Biologie einander näher zu bringen.

Bei PD Dr. Uwe Martens möchte ich mich für das Überlassen der hTERT-Plasmide bedanken.

Herrn Dr. M. Maue und Dr. M. Hassinger danke ich für das zur Verfügung stellen der Oberschenkelköpfe.

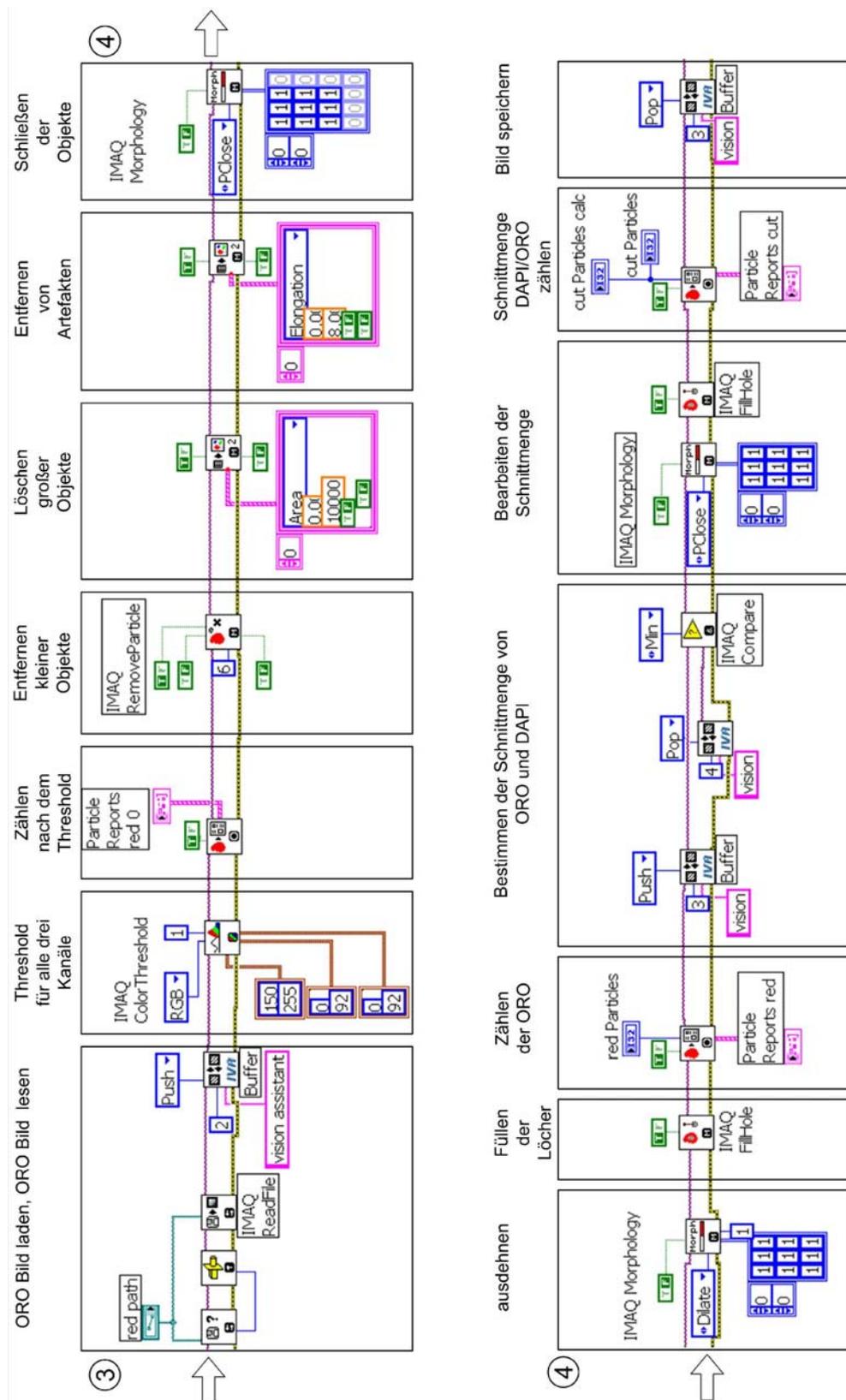


Abb. 40 Bearbeitungsschritte der Hellfeldaufnahmen (ORO-Bilder)

Histogramme der quantitativen Durchflusszytometrie:

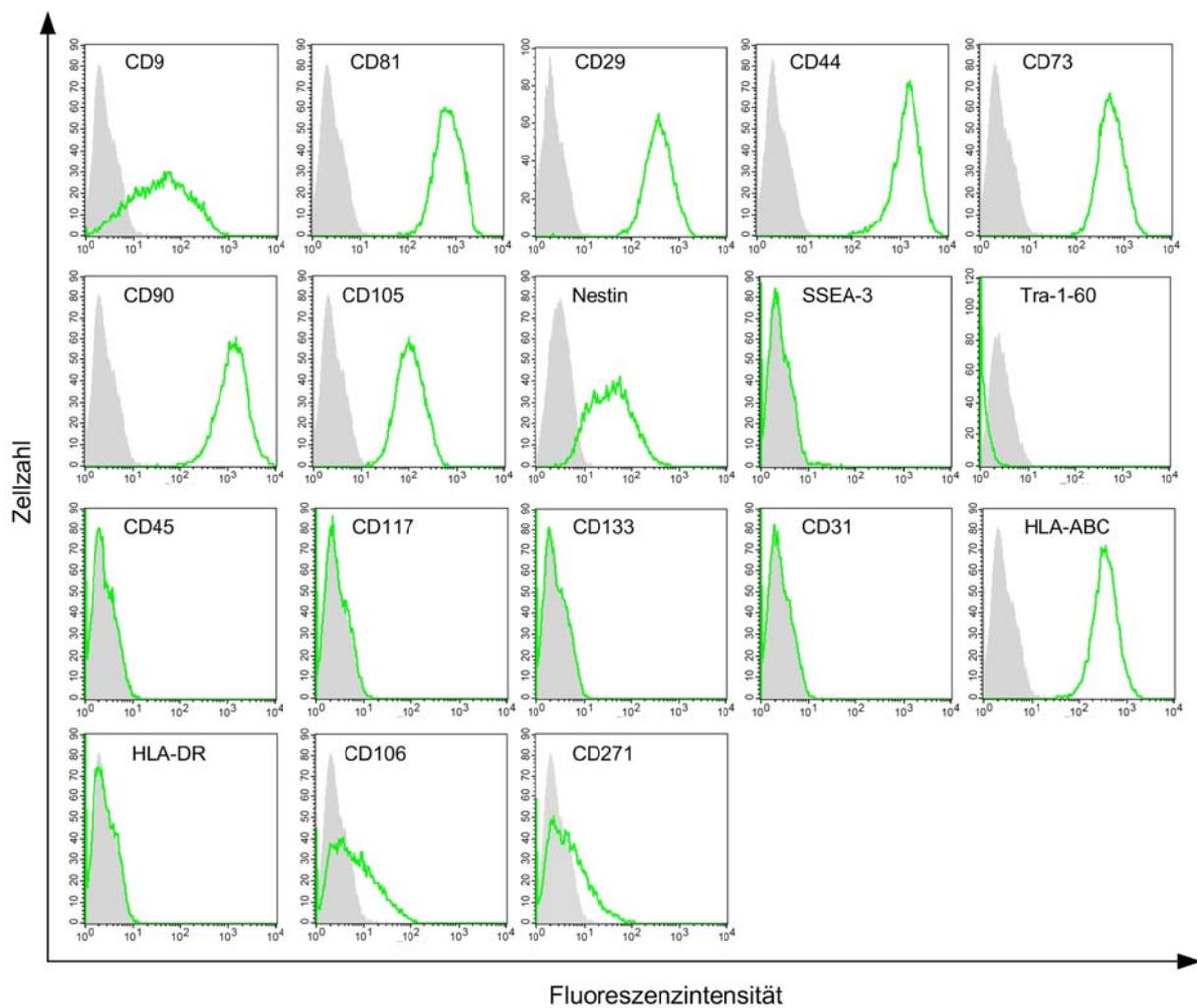


Abb. 41 Histogramme der Durchflusszytometrie der hMSC

Dargestellt sind die Auswertungen der durchflusszytometrischen Messungen nach immunzytochemischer Färbung der hMSC1 als Histogramm. Die Zellen wurden mit der Isotyp-Kontrolle behandelt (grau) oder mit dem Antikörper gegen das Ziel Protein (grün).

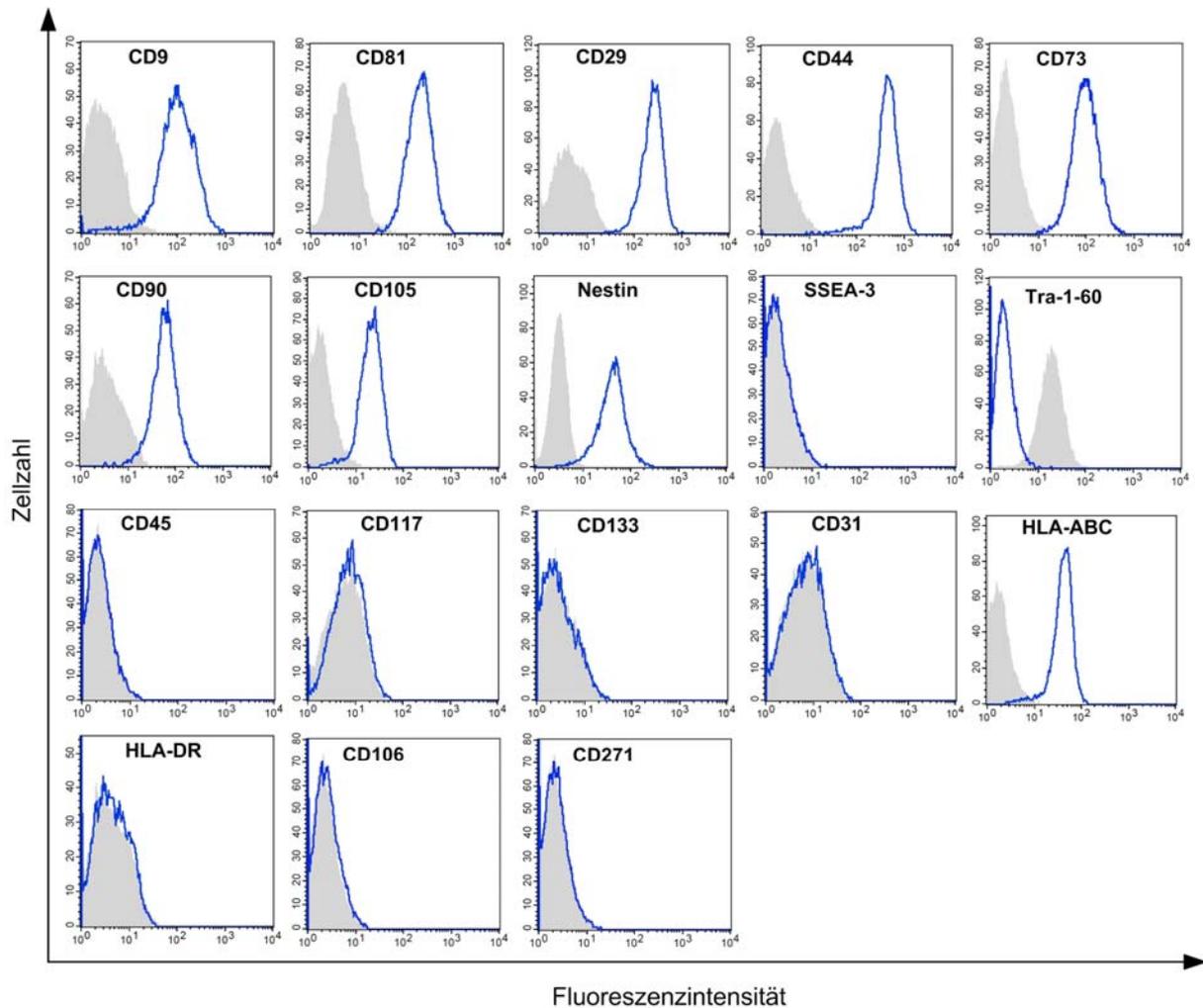


Abb. 42 Histogramme der Durchflusszytometrie der hPSC

Dargestellt sind die Auswertungen der durchflusszytometrischen Messungen nach immunzytochemischer Färbung der hPSC1 als Histogramm. Die Zellen wurden mit der Isotyp-Kontrolle behandelt (grau) oder mit dem Antikörper gegen das Ziel Protein (blau).

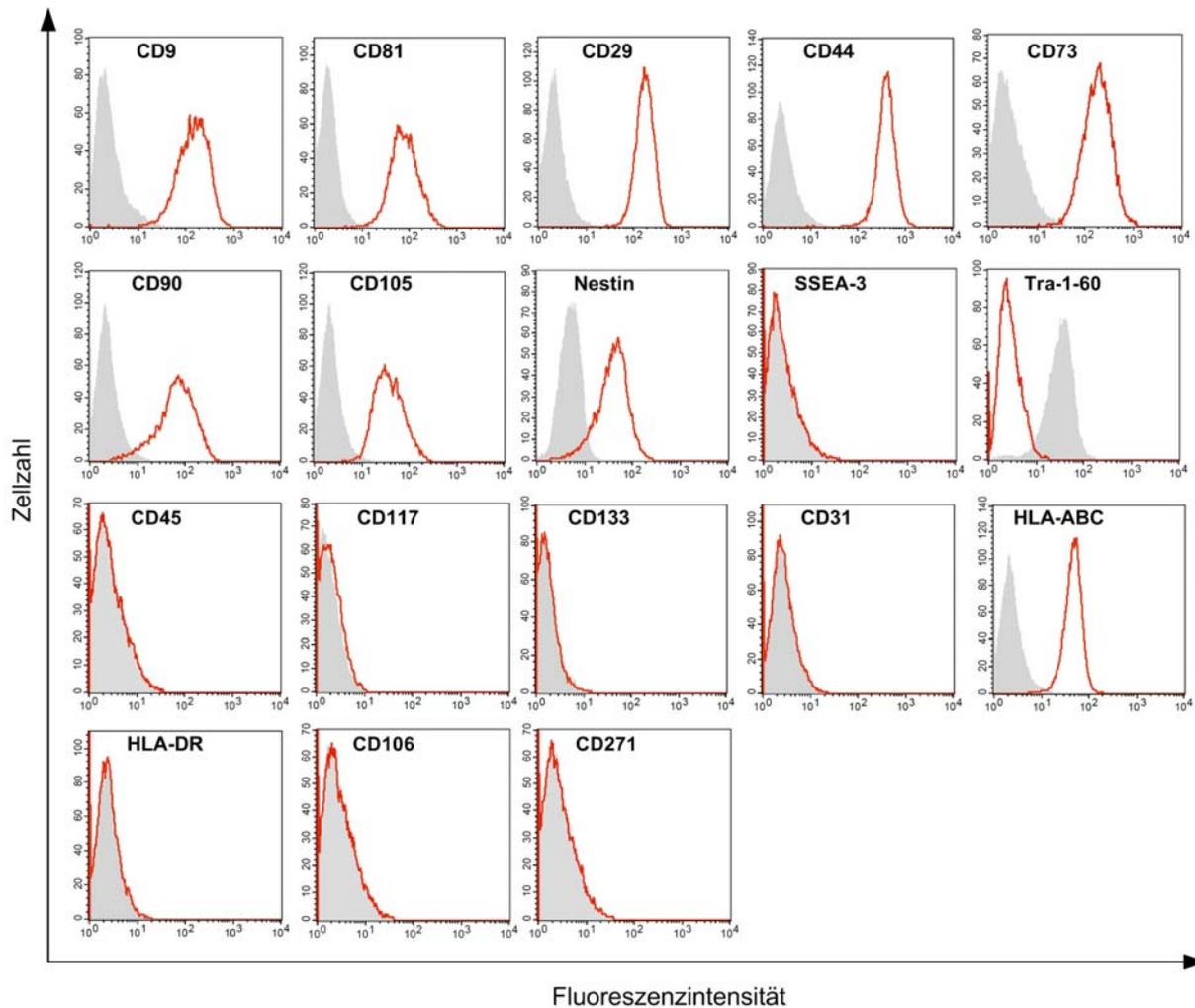


Abb. 43 Histogramme der Durchflusszytometrie der hSGC

Dargestellt sind die Auswertungen der durchflusszytometrischen Messungen nach immunzytochemischer Färbung der hSGC1 als Histogramm. Die Zellen wurden mit der Isotyp-Kontrolle behandelt (grau) oder mit dem Antikörper gegen das Ziel Protein (rot).

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Erwin Gorjup
Anschrift	Schumannstraße 8, 66111 Saarbrücken
Geburtsdatum	18. Dezember 1973
Geburtsort	Temeschburg
Staatsangehörigkeit	deutsch

Ausbildung

1995	Abitur am Technischen Gymnasium in Sindelfingen
1995-1996	Zivildienst mit Ausbildung zum Rettungshelfer beim Deutschen Roten Kreuz in Titisee-Neustadt
1997-2003	Studium der Biologie an der Technischen Universität Darmstadt mit den Hauptfächern: Entwicklungs- und Zellbiologie, Tierphysiologie, Biochemie
2003-2004	Diplomarbeit in der Abteilung Biohybride Systeme am Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik, St. Ingbert
2004-2009	Promotion in der Abteilung Zellbiologie und Angewandte Virologie von PD Dr. H. v. Briesen am Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik, St. Ingbert

Tätigkeiten

1999 – 2000	Betreuung der zoologischen Anfängerübungen am Institut für Zoologie, Technische Universität Darmstadt
2001	vierwöchiges molekular- und zellbiologisches Praktikum am Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik, St. Ingbert
2001 - 2002	Hilfswissenschaftler in der Arbeitsgruppe für Entwicklungsbiologie und Neurogenetik mit Betreuung des tierphysiologischen und entwicklungsbiologischen Praktikums am Institut für Zoologie, Technische Universität Darmstadt
2002	dreiwöchiges molekularbiologisches Praktikum in der Hämatologie im Labor für Experimentelle Onkologie von Prof. Dr. C. Bokemeyer, Universitätsklinikum Tübingen
2003-2004	Hilfswissenschaftler in der Abteilung Biohybride Systeme am Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik, St. Ingbert
2004	achtwöchiger Forschungsaufenthalt in der Biomedical Tissue Research Group von Dr. P. Genever, Universität York
2006	dreiwöchiger Forschungsaufenthalt in der Hämatologie, Labor für Zelltherapie von Dr. F. Prosper, Universitätsklinikum Navarra, Pamplona