

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

Zentrum für Innere Medizin III
Funktionsbereich Nephrologie
Direktor: Prof. Dr. Helmut Geiger

**Isolierung und Charakterisierung muriner mesenchymaler
Stammzellen aus Fettgewebe**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Stephanie Ingrid Peter

aus Offenburg

Frankfurt am Main, Dezember 2011

Dekan: Prof. Dr. Josef M. Pfeilschifter

Referent: Prof. Dr. Helmut Geiger

Korreferent: Prof. Dr. Roman Blaheta

Tag der mündlichen Prüfung: 07.12.2011

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 Embryonale und adulte Stammzellen | 1 |
| 1.2 Mesenchymale Stammzellen | 4 |
| 1.3 Adulte mesenchymale Stammzellen aus Fettgewebe | 6 |
| 1.4 Zelltherapie der Niere | 11 |
| 1.5 Ziele der Arbeit | 13 |
| 2. Material | 14 |
| 2.1 Geräte | 14 |
| 2.2 Verbrauchsmaterialien | 14 |
| 2.3 Chemikalien | 15 |
| 2.4 Medien und Mediensupplemente | 15 |
| 2.5 Antikörper | 16 |
| 2.6 Material für Molekularbiologie | 16 |
| 2.7 Primer | 17 |
| 3. Methoden | 18 |
| 3.1 Ausgangsmaterial | 18 |
| 3.1.1 Herkunft | 18 |
| 3.1.2 Entnahme | 18 |
| 3.2 Isolierung der Zellen | 19 |
| 3.3 Zellkulturtechniken | 20 |
| 3.3.1 Materialien | 20 |
| 3.3.2 Kulturmedium und häufig verwendete Puffer | 21 |
| 3.3.3 Kultivierung muriner mesenchymaler Stammzellen | 21 |
| 3.3.4 Subkultivierung adhärenter Zellen | 21 |
| 3.3.5 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen | 22 |
| 3.3.6 Zellzählung mit Trypanblau | 23 |
| 3.3.7 Proliferationsversuch | 23 |
| 3.3.8 Steriltests | 24 |
| 3.4 Charakterisierung des Zellmaterials | 24 |
| 3.4.1 Durchflusscytometrie | 24 |

| | | |
|---------|--|----|
| 3.5 | <i>In-vitro</i> -Assay: Stimulieren der Zellen mit supplementierten Medien | 25 |
| 3.5.1 | Versuchsaufbau | 25 |
| 3.5.2 | Medienzusammensetzung | 26 |
| 3.5.2.1 | adipogenes Medium | 26 |
| 3.5.2.2 | osteogenes Medium | 27 |
| 3.5.2.3 | chondrogenes Medium | 27 |
| 3.5.3 | Nachweis spezifischer Produkte durch Färben | 27 |
| 3.5.3.1 | Oil-O-Red | 27 |
| 3.5.3.2 | Van-Kossa | 28 |
| 3.5.3.3 | Alcian-Blue-Färbung | 28 |
| 3.5.4 | Molekulare Methoden | 29 |
| 3.5.4.1 | Isolierung von RNA aus Monolayerkulturen | 29 |
| 3.5.4.2 | Transkription in cDNA mittels RT | 30 |
| 3.5.4.3 | PCR | 31 |
| 3.5.4.4 | Agarosegelelektrophorese | 32 |
| 4. | Ergebnisse | 33 |
| 4.1 | Morphologie | 33 |
| 4.2 | Einfluss von verschiedenen Medien auf die Proliferation | 35 |
| 4.3 | Durchflusscytometrie | 36 |
| 4.3.1 | Messung verschiedener Oberflächenantigene | 36 |
| 4.3.2 | Messung von GFP-transfizierten Zellen | 39 |
| 4.4 | Nachweis der Differenzierung | 40 |
| 4.4.1 | Adipogene Differenzierung | 40 |
| 4.4.2 | Osteogene Differenzierung | 41 |
| 4.4.3 | Chondrogene Differenzierung | 43 |
| 4.5 | Unbegrenzte Replikationsfähigkeit | 44 |
| 5. | Diskussion | 45 |
| 5.1 | Zellisolierung und Morphologie | 45 |
| 5.2 | FACs-Analyse | 46 |
| 5.3 | Differenzierung | 49 |
| 5.4 | Proliferationskapazität | 51 |
| 6. | Zusammenfassung | 52 |

| | |
|--------------------------|----|
| 6a. Abstract | 54 |
| 7. Literaturverzeichnis | 56 |
| 8. Abbildungsverzeichnis | 69 |
| Lebenslauf | |
| Schriftliche Erklärung | |
| Danksagung | |

1. Einleitung

Die Geschichte der Stammzell-Therapie beginnt bereits Anfang des letzten Jahrhunderts. Erste Ansätze, bei denen man Patienten mit Anämie oder Leukämie Knochenmark *per os* verabreichte, blieben allerdings erfolglos. Erst in den 1950er Jahren waren erste Erfolge zu verzeichnen: Versuche an letal bestrahlten Mäusen zeigten, dass diese ein neues Immunsystem entwickelten, wenn ihnen Knochenmark einer anderen Maus intravenös verabreicht wurde (Nowell et al. 1956 (1)). Ende der 60er Jahre lagen erste Berichte über erfolgreiche Knochenmarktransplantationen beim Menschen vor, als erste erfolgreiche Therapie des Menschen mit adulten Stammzellen (2).

1.1 Embryonale und adulte Stammzellen

Stammzellen sind, nach Definition des Amerikanischen Gesundheitsministeriums, Zellen

- die die Fähigkeit zur nahezu unbegrenzten Selbstreplikation haben,
- die unspezialisiert sind, das heißt keine spezifische Zellfunktion haben und
- aus denen spezialisierte Zellen hervorgehen können. (3)

Stammzellen müssen nicht viele *verschiedene* spezialisierte Zellen hervorbringen können. Ist eine Stammzelle nur in der Lage, eine bestimmte Zellart zu bilden, so ist diese Stammzelle unipotent.

Gewöhnlich werden je nach Herkunft zwischen zwei Arten unterschieden:

Embryonale Stammzellen werden aus der Blastozyste gewonnen, genauer aus dem Embryoblasten (oder Inner Cell Mass, ICM), 4-5 Tage nach der Befruchtung der Eizelle (4), noch vor der Differenzierung in die 3 Keimblätter. In diesem Stadium sind die Zellen der ICM pluripotent, sie können zu jedem beliebigen Organ oder Gewebe differenzieren. Würde man eine solche Zelle in einen empfangsbereiten Uterus einpflanzen, könnte sich kein Lebewesen entwickeln. Zellen des Embryoblasten sind nicht in der Lage, sich an die Schleimhaut anzuhafte und Plazenta und supportives Gewebe zu bilden (5).

Im Gegensatz dazu sind die Zygote und die Zellen der Morula totipotente Stammzellen: aus jeder einzelnen kann sich bei entsprechenden

Umgebungsbedingungen, wie zum Beispiel einem empfangsbereiten Uterus, ein neues Lebewesen entwickeln.

Adulte Stammzellen werden aus dem sie umgebenden, differenzierten Gewebe isoliert. Sie existieren dort in Nischen, in denen eine spezialisierte Mikroumgebung herrscht: ausdifferenzierte Nachbarzellen, die Extrazellulärmatrix, aber auch humorale Faktoren tragen dazu bei, die Stammzelle in ihrem „naiven“ Status zu erhalten (6).

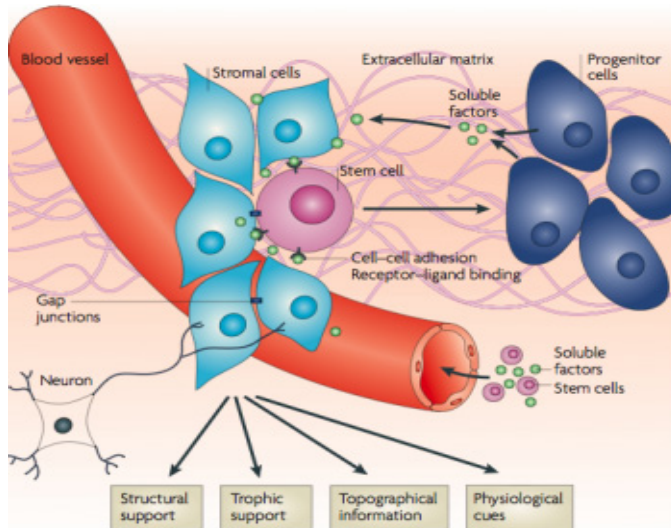


Abb. 1: Die Stammzellnische

Adulte Stammzellen kommen in Gewebe-Abkömmlingen aller drei Keimblätter vor: beispielsweise als Satellitenzellen im Muskel (7,8), der aus dem Mesoderm stammt; in der Leber (9,10,11) und im Darm (12) als Abkömmlinge des Entoderms und auch im Gehirn (13), das sich im Embryonalstadium aus dem Ektoderm entwickelt hat.

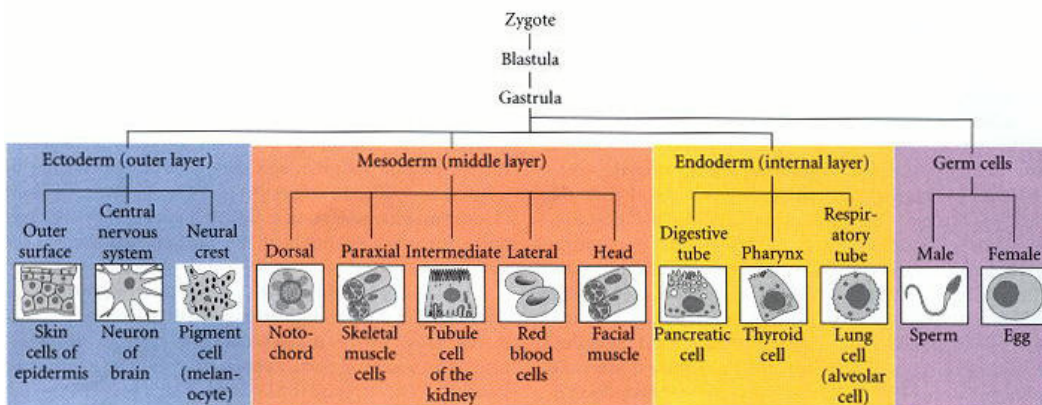
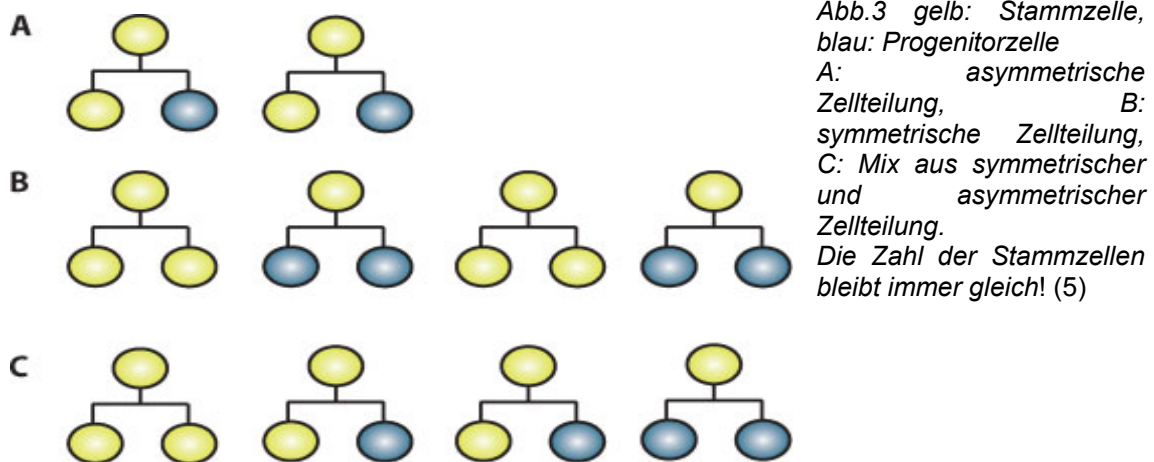


Abb. 2: Die drei Keimblätter und Derivate (Beispiele)

Aufgabe der adulten Stammzellen ist es, aufgrund von Krankheit oder Alter zugrunde gegangene Zellen zu ersetzen.

Sie sind meist multipotent, können zu einigen wenigen, oft verwandten Geweben differenzieren, die aus dem gleichen Keimblatt entstanden sind. So können aus Stammzellen, die im dorsolateralen subventrikulären Bereich des Gehirns gefunden wurden, Neurone und Astroglia entstehen, jedoch keine Mikroglia, welche Immunfunktionen besitzen und nicht ektodermalen Ursprungs sind (14). Allerdings wurden in jüngerer Zeit Studien veröffentlicht, die über Plastizität bzw. Transdifferenzierung von adulten Stammzellen berichten (15-17), so dass die obige Aussage nicht dogmatisch verstanden werden sollte.

Die direkten Nachkommen der ursprünglichen Stammzelle sind nicht unmittelbar ausdifferenzierte Zellen mit ihren spezifischen Funktionen. Es entstehen weitere Stammzellen und Progenitorzellen. Durch symmetrische oder asymmetrische Zellteilung gehen aus der Stammzelle entweder zwei Stammzellen, eine Stammzelle und eine Progenitorzelle oder zwei Progenitorzellen hervor. Progenitorzellen unterscheiden sich von Stammzellen durch ihre höhere Teilungsrate und ihre fehlende Fähigkeit zur Selbsterneuerung (5).



Die Schlussfolgerung liegt nahe, dass embryonale Stammzellen aufgrund ihres breiteren Differenzierungsspektrums ein größeres therapeutisches Potential besitzen als adulte Stammzellen. Warum also mit adulten Stammzellen forschen?

Erstens gibt es gegen die Gewinnung von embryonalen Stammzellen zu Forschungszwecken verschiedene ethische Argumente.

Zweitens haben diese Argumente in Deutschland zu einer sehr restriktiven Gesetzgebung geführt, so dass humane embryonale Stammzellen nur schwer zu gewinnen und nur in begrenzter Zahl verfügbar sind. Die verfügbaren humanen embryonalen Stammzelllinien sind schon sehr alt; es kann nicht davon ausgegangen werden, dass sie noch die identischen Eigenschaften besitzen wie die ursprünglichen Zellen.

Drittens besteht die Gefahr der Teratomentstehung, die gerade bei embryonalen Stammzellen sehr hoch ist.

Viertens können adulte Stammzellen in der Therapie als autologe Zellen verwendet werden, was bei embryonalen Stammzellen zurzeit nicht möglich ist und zumindest in naher Zukunft auch nicht möglich sein wird.

1.2 Mesenchymale Stammzellen

Entdeckt wurden mesenchymale Stammzellen als „colony-forming unit-fibroblasts“ aus Knochenmark durch Friedenstein et al. 1970 (18). Die erste detaillierte Beschreibung ihrer Fähigkeit, sich in verschiedene Gewebe zu differenzieren folgte durch Caplan et al. (19). 1991 tauchte der Begriff „mesenchymal stem cells“ (MSC) zum ersten Mal auf, damals noch für embryonale und adulte Stammzellen aus Gewebeabkömmlingen des Mesoderms (20).

In den letzten Jahren ist es gelungen, mesenchymale Stammzellen aus anderen Geweben als Knochenmark zu isolieren, zu charakterisieren und in ersten Therapieansätzen zu verwenden(21-25).

Als MSCs bezeichnete man heute per Definition Stammzellen,

- die an Plastikoberflächen adhärieren
- zu Adipozyten, Osteozyten und Chondrozyten (Gewebeabkömmlingen des Mesoderms) differenzieren können
- bestimmte Oberflächenantigene aufweisen(26).

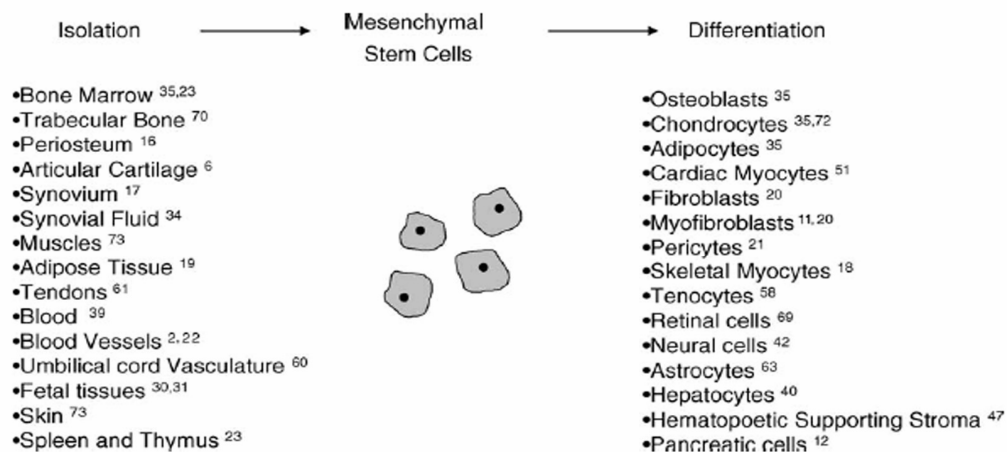


Figure 1 Sources and cell types derived from MSCs.

Die Bezeichnung „mesenchymal“ bezieht auf die embryonale Herkunft der MSCs aus dem embryonalen Bindegewebe, dem Mesenchym. Sie hat nichts mit dem mittleren Keimblatt, dem Mesoderm, zu tun.

Es sind mehrere Methoden zur Isolierung von MSCs aus dem ursprünglichen Gewebeverband beschrieben (27). Die verbreitetste Methode, mesenchymale Stammzellen zu isolieren, besteht darin, ihre Fähigkeit zu nutzen, an Plastikoberflächen, wie dem Boden von Zellkulturgefäßen, zu adhären. Bisher ist keine andere gemeinsame Eigenschaft der MSCs bekannt (zum Beispiel die Expression eines spezifischen Antigens), aufgrund derer sie sich von anderen Zellen unterscheiden ließen und die sich zur Nutzung bei der Isolation eignen würde (28).

Die Isolierung von MSCs durch Selektion nach Plastikadhärenz ist einfach und ohne spezielle Geräte durchführbar. Aufgrund der wenig spezifischen Schritte erhält man eine anfangs sehr heterogene Zellpopulation. Es muss immer der Nachweis erfolgen, dass die isolierten Zellen Stammeigenschaften besitzen, um sicher sein zu können, dass es sich tatsächlich um Stammzellen handelt.

In unserem Labor konnte (nach Abschluss dieser Arbeit) ein einfacher zusätzlicher Schritt etabliert werden, mit dem man gleich zu Anfang eine wesentlich homogenere Zellpopulation erhält. Er besteht darin, dass nach der Isolierung nach dem üblichen Protokoll die Zellen nach 60 Minuten nochmals gewaschen werden (29).

Das Problem mangelnder Homogenität stellt sich vor allem bei Knochenmark als Quelle der Stammzellen, da hier zwei verschiedene Stammzellpopulationen existieren, mesenchymale und hämatopoietische. Werden beide isoliert und existieren in Kultur nebeneinander, so wird eine Untersuchung der MSC-Population unmöglich beziehungsweise führt zu falschen Ergebnissen. Allerdings lassen sich diese Zellen durch ihre sehr unterschiedliche Oberflächenantigen-Expression unterscheiden (30). Damit lässt sich eine Verunreinigung mit den unerwünschten Zellen mindestens erkennen und, etwas aufwändiger, auch beseitigen.

Doch auch zwischen hämatopoietischen Stammzellen und MSCs existiert keine so scharfe Grenze mehr wie ursprünglich angenommen: es wurde nachgewiesen, dass auch hämatopoietische Stammzellen zu Fettzellen differenzieren können (31).

Im Hinblick auf einen möglichen therapeutischen Einsatz von MSC sind folgende Eigenschaften (nicht nur von mesenchymalen) Stammzellen von Bedeutung:

Die erste ist ihr großes Entgiftungs-Potential. Das verdanken sie erstens einer Reihe von Transportern der ABC-Familie, die potentiell schädliche Stoffe schnell aus der Zelle ausschleusen (32). Sie besitzen zweitens Enzyme der Aldehyd-Dehydrogenase-Familie, die intrazellulär fremde Substanzen durch Oxidation von Aldehydgruppen unschädlich machen (33). In der Therapie bedeutete das unter Umständen eine schlechte medikamentöse Beeinflussbarkeit.

Die zweite bemerkenswerte Eigenschaft ist die Hypoxie-Resistenz der MSCs. In ihrer Nische (besonders im Knochenmark) herrschen schon im gesunden Gewebe hypoxische Bedingungen, die ihnen keinesfalls schaden. Sie scheinen im Gegenteil günstiger zu sein als eine Sauerstoff-reiche Umgebung (34,35). Das wäre insoweit von Vorteil, als dass ihre „Einsatzorte“ oft schlecht durchblutete, funktionell defekte Narben sein könnten.

Drittens interagieren MSCs mit dem Immunsystem. In den letzten Jahren zeigte sich, dass mesenchymale Stammzellen a) selbst nur geringe immunogene Wirkung haben und im ursprünglichen Zustand keine HLA-II-Marker aufweisen

und b) in gewissem Umfang immunsupprimierend wirken indem sie die T-Zell-Proliferation hemmen (36-38).

1.3 Adulte mesenchymale Stammzellen aus Fettgewebe

In den 1980er Jahren wurden von Deslex et al. und Hauner et al. die ersten Studien zur Isolierung und Differenzierung von humanen Fett- Progenitorzellen aus Fettgewebe veröffentlicht (39,40). 2001 beschrieben Zuk et al. diese Zellen als multipotente Stammzellen aus Fettgewebe (41).

Mesenchymale Stammzellen aus Fettgewebe haben gegenüber denen aus dem Knochenmark den großen Vorteil, dass die Entnahme beim Menschen weniger invasiv ist, bei der Maus sind die Leistenfettpolster sehr leicht zugänglich. Die Ausgangsmenge an Gewebematerial und die isolierte Zahl von Stammzellen pro Milliliter ist bei Fettgewebe im Vergleich zu Knochenmark wesentlich höher.

Aufgrund des in großen Mengen als Abfallprodukt bei kosmetischen Operationen anfallenden humanen Fettgewebes ist die Datenlage zu humanen „adipose-derived stem cells“, ASCs, besser als für murine ASCs.

ASCs werden nach dem gleichen Prinzip wie andere MSCs isoliert. Sie haben eine Fibroblasten- ähnliche Morphologie, lang gezogen und spindelförmig. Werden sie zu Beginn der Kultivierung nicht zu dicht ausgesät, kann man beobachten, wie sich um jede Zelle ein Zellhaufen, eine Kolonie bildet („colony-forming unit-fibroblasts“, Friedenstein et al. (18)).

ASCs proliferieren schneller, je jünger der Spender war, aber die Proliferationsfähigkeit und eine gewisse Bereitschaft zu Differenzierung bleiben erhalten, auch bei höherem Spenderalter (42).

Es bleibt das Problem, dass es bisher nicht gelungen ist, einen charakteristischen und eindeutigen „ASC-Marker“ zu beschreiben, um sie immunphänotypisch klar von ausdifferenzierten Fibroblasten bzw. Progenitorzellen abzugrenzen (43).

Es wurden unterschiedliche Expressionsprofile von Oberflächenantigenen beschrieben. Jedoch waren Parameter, die das Expressionsprofil beeinflussen, bei verschiedenen Forschergruppen nicht einheitlich. Einige dieser Parameter

sind Fettgewebstyp (braun oder weiß), Herkunftsort des Fetts (subkutan oder viszeral), Entnahmeart, Kulturbedingungen, Passage und Dichte der Zellen bei Messung.

Das Differenzierungsspektrum von ASCs ist breit: angefangen bei Fettzellen, Knochen- und Knorpelzellen, wurden in den letzten Jahren auch Differenzierungen in Pancreas (vom endokrinen Typ)- und Hepatozyten-ähnliche Zellen beschrieben.

Für unseren Fachbereich bedeutend ist vor allem der Nachweis, dass aus ASCs auch epitheliale Zellen hervorgehen können (44-46).

Induziert wird die Differenzierung von ASCs durch Kultivierung in supplementiertem Basismedium. Das Basismedium besteht meistens aus DMEM-Medium mit variablem Anteil an fötalem Kälberserum.

| Differenzierungstyp | Differenzierungsfaktoren |
|---------------------|---|
| Adipogen | Insulin, Isobutyl-Methylxanthine (IBMX), Dexamethason, Indomethacin |
| Chondrogen | Transforming-Growth-factor- β , Ascorbat, Dexamethason |
| Osteogen | Ascorbat, Glycerophosphat, Dexamthason, 1,25-Vitamin D3 |
| Myogen | Spezifisches Environment mit Kontakt zu Myozyten/ Hydrocortison |
| Cardiomyogen | Halbfestes Methylcellulose-Medium, Interleukin 3, Interleukin 6, Stem-Cell-Factor |
| Neurogen | Valproat, Insulin, Hydroxyanisol, Hydrocortison, Endothelial-Growth-Factor, Fibroblast-Growth-Factor |
| Pankreatisch | Activin-A, Exendin-A, Pentagastrin, Hepatocyte-Growth-Factor, Nicotinamid, hohe Glucose-Konzentration |
| Hepatisch | Hepatocyte-Growth-Factor, Oncostatin M, Dimethyl-Sulfoxid |

Tab.1: Mediensupplemente zur Differenzierungsinduktion. Die Angaben variieren teilweise beträchtlich zwischen den Autoren. Diese Tabelle zeigt Auswahl und soll eine grobe Idee davon vermitteln, welche Supplemente im Allgemeinen verwendet werden. (47-54)

Es gibt erste Publikationen, die Transkriptionsfaktoren und molekulare Mechanismen beschreiben, die bei der Ausdifferenzierung von MSCs in Adipozyten (55,56), Myozyten (57,58), Osteozyten (59,60) oder Chondrozyten (59) eine Rolle spielen. Diese Vorgänge sind jedoch noch weit davon entfernt, vollständig verstanden zu sein, deshalb soll hier nicht näher darauf eingegangen werden.

Die Differenzierung von Stammzellen kann mittels verschiedener Verfahren nachgewiesen werden. Gängige Methoden sind der histologische Nachweis von Stoffwechselprodukten der differenzierten Zellen durch Anfärbung oder der Nachweis spezifischer Gen-Expression. Zum Beispiel kann bei zu Adipozyten differenzierten Zellen die RNA für Fett-spezifische Genprodukte wie den Peroxisome-proliferator-activated-Receptor γ (PPAR γ) und die Lipoprotein-Lipase nachgewiesen werden.

Weiterhin wurden in verschiedenen Studien die tatsächlichen Fähigkeiten der differenzierten Zellen untersucht: so reagieren die von ASCs stammenden Adipozyten auf Katecholamin-Stimulation mit Fettabbau und können Adiponectin und Leptin sezernieren (54).

Osteozyten reagieren auf mechanische Belastung mit NO-Produktion und COX2-Expression (61), Cardiomyozyten zeigen Schrittmacherfunktion (52), pankreatische Zellen sezernieren Insulin, Glukagon und Somatostatin (53) und hepatische Zellen können Low-density-Lipoproteine aufnehmen und Harnstoff produzieren (54). Diese beeindruckenden Ergebnisse wurden größtenteils mit humanen ASCs erzielt. Es gibt nur spärlich Daten zur Differenzierung von murinen ASCs in nicht-mesodermale Gewebe, es kann jedoch angenommen werden, dass diese ein ähnliches Potential besitzen wie humane ASC.

Verschiedene Experimente, die ASCs mit anderen mesenchymalen Stammzellen vergleichen, zeigen, dass das Differenzierungspotential von ASC gleich groß wie das von mesenchymalen Stammzellen aus Knochenmark ist (6,62). Es bestehen jedoch Unterschiede in der Fähigkeit der Zellen zu den einzelnen Geweben zu differenzieren. So ist das Potential von MSCs aus Knochenmark zur osteogenen Differenzierung höher als das von ASCs (63,64).

Diese grundlegenden Untersuchungsergebnisse sind wichtig, um später einmal die optimalen Zellen für eine Therapie auswählen zu können.

Der nächste Schritt in Richtung einer therapeutischen Anwendung ist die Untersuchung des Verhaltens von ASCs im Tiermodell. Die meisten aktuellen *in vivo* Ansätze beziehen sich auf eine Differenzierungslinie von ASCs und ihre potentielle Anwendung:

Hong et al. konnten zeigen, dass mit adipogenem Medium prä-induzierte ASCs, die auf einem Gelatine-Schwamm kultiviert und subkutan auf dem Rücken von immundefiziente Mäusen eingepflanzt wurden, sich nach 4 Wochen zu Adipozyten entwickelt hatten (65). Ähnliche Versuche von Choi et al. und Mizuno et al. waren ebenfalls erfolgreich (66,67). Dies zeigt neue Möglichkeiten bei der Behandlung von Weichteildefekten auf.

Nambu et al. behandelten Wunden auf dem Rücken von diabetischen Mäusen mit einer Auflage aus Kollagen mit Silikonmembran und ASCs. Die Heilungsrate der Wunden war schlechter, wenn die Tieren nur eine solche Auflage erhielten als bei den Wundaufgaben mit ASCs (68)

Dragoo et al. veröffentlichten eine Studie zur *in vivo* Regeneration von Knorpeldefekten beim Kaninchen. Sie verglichen die Heilungsrate zwischen nicht- behandelten Defekten und solchen, in die prä-induzierte ASCs in einem Fibrinkleber-Gerüst auf den Defekt aufgebracht worden waren. Die Heilungsrate war bei den behandelten Tieren signifikant höher (69). Einen sehr ähnlichen Versuch machten Masuoka et al.. Sie untersuchten zusätzlich Kaninchen, denen nur eine Kollagen- Auflage ohne ASCs in den Defekt eingebracht wurde und konnten ein besseres Ergebnis für die Auflage mit ASCs nachweisen (70).

Versuche zur osteogenen Differenzierung und Knochenproduktion *in vivo* sind typischerweise so aufgebaut, dass prä-induzierte (aber auch nicht prä-induzierte ASCs) auf eine Matrix aufgebracht und Mäusen subkutan eingepflanzt werden. Nach einem variablen Zeitintervall wird die veränderte Matrix wieder entnommen, die Zellen darin charakterisiert und eventuelle Knochenbildung nachgewiesen (71-74). Auch Kalottendefekte beim Kaninchen wurden erfolgreich mit einer ASCs enthaltenden Schwammeinlage behandelt (75).

Aber nicht nur Bindegewebsdefekte mit dem Ziel der Auffüllung durch ASCs, auch ein möglicher Einsatz von ASCs im ischämisch geschädigten Herzmuskel ist Ziel der derzeitigen Forschung. Dazu wurden von Strem et al. nach Schädigung des Herzens markierte ASCs in eine Herzkammer appliziert und nach verschiedenen Zeiträumen deren Einwanderung in den Herzmuskel sowie eine Expression herzspezifischer Proteine nachgewiesen (76). Yamada et al. isolierten ASCs aus *braunem* Fettgewebe, transplantierten sie in die Myocard-Infarkt-Grenzzone von Ratten. Evaluiert wurden die Funktion des linken Ventrikels und die Größe der Infarktzone. Verglichen mit Tieren, die nach einem Myocardinfarkt ASCs aus *weißem* Fettgewebe oder nur Kochsalzlösung erhalten hatten, zeigten die ersteren eine verbesserte kardiale Funktion und eine verminderte Narbenbildung (77).

Ein weiterer Versuch zur Reparatur von Weichteildefekten, jedoch nicht mit dem Ziel der adipogenen, osteogenen oder chondrogenen Differenzierung der ASCs, ist die Injektion von autologen ASCs in einen ischämischen Hautlappen zur Weichteildefektdeckung (78). Es wurde auch die intravenöse Injektion von ASCs in die betroffene Extremität im Ischämie-Modell im Hinterlauf der Ratte beschrieben, mit dem Ziel einer verbesserten Neo-Vaskularisierung (79,80). Allerdings wurden hier humane ASCs in ein Tiermodell appliziert. Die Schlüsse die daraus gezogen werden, sollten somit kritisch betrachtet werden.

Diese letzten Versuche zeigen eindeutig das Potential von ASCs, zu epithelialen Zellen zu differenzieren. Sie geben Anlass zu Optimismus hinsichtlich des künftigen Einsatzes von ASCs in nierengeschädigten Mausmodellen zur Wiederherstellung der Tubulusfunktion (45,46)

In vielen dieser Versuche war es notwendig, die eingebrachten Zellen von körpereigenen zu unterscheiden. Hierbei erwies sich die Verwendung von grün-fluoreszierendem-Protein (GFP) -markierten Zellen als geeignete Methode.

Dieses Protein wurde erstmals 1962 von Osamu Shimomura aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliert (81), der dafür zusammen mit zwei anderen Chemikern 2008 den Nobelpreis für Chemie erhielt (82). GFP ist ein Protein, das bei Anregung Licht mit der Wellenlänge von 509 nm abstrahlt und somit im Fluoreszenzmikroskop gut detektierbar ist.

Die DNA-Sequenz für GFP wird durch Vektoren in Zellen eingebracht und dort in das Genom eingebaut. Wird die DNA in embryonale Zellen eingebracht oder ist in einer Keimzelle enthalten, entsteht daraus ein Organismus, in welchem alle Zellen das GFP exprimieren. Man spricht man von GFP-transgenen Tieren. MSCs, die aus diesen Tieren isoliert werden, exprimieren ebenfalls GFP und können dadurch in einem fremden, nicht-GFP-transgenen Organismus leicht detektiert werden.

1.4 Zelltherapie der Niere

Für eine zunehmende Zahl von Patienten mit Nierenversagen gibt es nur unzureichende Behandlungsmöglichkeiten. Die Dialyse kann metabolische und endokrine Funktionen der Niere nicht ersetzen. Transplantierbare Organe sind nicht in ausreichender Anzahl vorhanden. Hier können Stammzellen faszinierende Möglichkeiten eröffnen.

Eine Vielzahl von Publikationen zur Rolle von MSCs aus dem Knochenmark bei der Nierenregeneration gibt es bereits; zu einer einheitlichen, anerkannten Hypothese zum Wirkmechanismus haben sie nicht geführt.

So konnte von Huls et al. nachgewiesen werden, dass „bone-marrow-derived stem cells“ (BMSCs) nach Nierenschädigung in die Niere einwandern und zur Reparatur des tubulären Systems beitragen (83). Eine andere Publikation konnte zeigen, dass eine Verletzung der Niere zu vermehrter Freisetzung von BMSCs in das periphere Blut führt (84).

Duffield et al. und Lin et al. kamen jedoch zu dem Ergebnis, dass keine Einwanderung und Differenzierung von BMSCs erfolgt (85,86). Die gesteigerten Reparaturvorgänge und die verbesserte Nierenfunktion nach BMSC-Applikation erklären sie mit Unterstützung der Regeneration der residenten Tubulusepithelzellen durch BMSCs mit humoralen Faktoren.

Eine andere Studie zeigte deutliche Unterschiede zwischen mesenchymalen und hämatopoietischen Stammzellen bei der Nierenregeneration: der Funktionsverlust nach Ischämie/ Reperfusionsschädigung war deutlich geringer nach Applikation von mesenchymalen Stammzellen (87).

Li et al. konnten nachweisen, dass humane MSCs in geschädigten Nieren von Mäusen zu Tubulusepithelzellen differenzieren (88).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Nutzen von MSCs in der Therapie der geschädigten Niere erwiesen ist. Die Mechanismen von Einwanderung und Differenzierung von Stammzellen in geschädigtem Nierengewebe sowie ihr Einfluss auf die Eigenregeneration der Niere müssen jedoch noch aufgeklärt werden.

1.5 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung einer Isolationsmethode, mit der reproduzierbar mesenchymale Stammzellen aus den Leistenfettpolstern der Maus gewonnen werden können.

Die Zellen sollten nach der Isolation charakterisiert werden. Außerdem wurde mit supplementierten Medien die Differenzierung der Zellen induziert. Gleichzeitig wurden unter denselben Bedingungen Zellen aus derselben Population kultiviert, die als Kontrolle dienten. Durch histologische Färbung sollten gewebsspezifische Stoffwechselprodukte nachgewiesen werden. Bei zu Adipozyten differenzierten ASCs sollten intrazelluläre Lipidvakuolen nachgewiesen werden, bei zu Osteozyten differenzierten Stammzellen extrazelluläre Calciumkomplex-Ablagerungen. Außerdem sollten mittels RNA-Isolierung und PCR (nach reverser Transkribierung der RNA) gewebespezifische Genprodukte nachgewiesen werden. Es sollte bewiesen werden, dass sich diese Methoden auch bei Fettzellen aus GFP- transgenen Mäusen anwenden lassen. Die Stabilität der GFP-Expression sollte untersucht werden, um bei einer späteren Anwendung im *in vivo* Versuch falsch negative Ergebnisse aufgrund einer einfachen Abschaltung des GFP-Gens zu vermeiden.

2. Material

2.1 Geräte

| | |
|---|--|
| Brutschrank | Heraeus, Hanau |
| Durchflußcytometer | Becton Dickinson, Heidelberg |
| Elektrophoresegerät Consort EV 243 | Sigma-Aldrich, München |
| Fluoreszenzmessgerät FLUOstar | BMG, Offenburg |
| Mikroskop Axiovert 10 | Zeiss, Jena |
| pH-Messgerät | VWR International |
| Sterilbank | Heraeus, Hanau |
| Thermocycler Primus Robocycler Gradient 96 | MWG-Biotech, Ebersberg Stratagene, |
| Waagen | Schelhasse, Frankfurt Mettler, Zürich |
| Zentrifugen Mikro 22R; Megafuge 1.0 | Hettich Zentrifugen, Tuttlingen Heraeus, Hanau |

Weitere laborübliche Geräte wie Kühlschränke, Wasserbäder, Heizplatten.

2.2 Verbrauchsmaterialien

| | |
|----------------------|------------------------------------|
| Pipetten | Corning, New York |
| Plastiksiebe (100µm) | BD Falcon, Erembodegem, Belgien |
| Reaktionsgefäße | Eppendorf, Hamburg |

| | |
|------------------------------|------------------------|
| Sterilfilter | Millipore, Eschborn |
| Zellkulturflaschen, -platten | Greiner, Frickenhausen |
| Zentrifugenröhrchen | Greiner, Frickenhausen |

2.3 Chemikalien

| | |
|-------------------------|------------------|
| Agarose | Invitrogen |
| Alcianblue 8GX Solution | Sigma, München |
| Collagenase | Roche, Mannheim |
| DAPI | Sigma, München |
| DMSO | Alexis |
| Formaldehyd | |
| Oil-Red-O | |
| Silbernitrat | Merck, Darmstadt |
| Trypsin/EDTA | Sigma, München |

2.4 Medien und Mediensupplemente

| | |
|----------------------------|-------------------------------|
| Ascorbinsäure | Sigma, München |
| Dexamethason | Ratiopharm, Ulm |
| DMEM | Sigma, München |
| FCS | Paa, Cölbe |
| Glucose | |
| Glycerolphosphat | |
| Indomethacin | |
| Insulin | Invitrogen |
| 3-Isobutyl-1-Methylxanthin | Sigma, München |
| Mesencult | StemCell Technologies, Canada |

| | |
|----------|------------------------------|
| TGF-beta | Peprotech, London/Umkirch??? |
|----------|------------------------------|

2.5 Antikörper

| | |
|-------|-------------------------|
| CD29 | ImmunoTools, Friesoythe |
| CD34 | ImmunoTools, Friesoythe |
| CD44 | ImmunoTools, Friesoythe |
| CD45 | ImmunoTools, Friesoythe |
| CD90 | ImmunoTools, Friesoythe |
| Sca-1 | eBioscience, |

2.6 Material für Molekularbiologie

| | |
|---------------------------|-----------------------|
| Chloroform-Isoamylalkohol | |
| DEPC | |
| dNTP Mix | Promega, Madison, USA |
| Ethidiumbromid | Sigma, München |
| PCR 10x Puffer | |
| Phenol | |
| Random Hexamers | |
| Reverse Transkriptase | Fermentas |
| RNAse Inhibitor RiboLock | Fermentas |
| Taq-Polymerase | Promega, Madison, USA |

2.7 Primer

| | | | |
|-----------------------------|----------------|--|--------|
| β -Actin | NM_007393.3 | forward gctgcgttttacacccttc reverse ctgggccattcagaaatta | 520 bp |
| Wnt-4 | NM_009523.1 | forward ttctttgcagctccttcggt reverse cttctccatgtcgtcccagt | 300 bp |
| PPAR γ | NM_001127330.1 | forward ctggcctccctgatgaataa reverseacgtgctctgtgacgatctg | 362 bp |
| Lipoprotein-Lipase (LPL) | NM_008509.2 | forward taactaccccctagacaacgtcca reverse atgaatggagcgcctcgtg | 383 bp |
| Osteopontin | NM_009262.2 | forward tctgatgagaccgtcactgc reverse tcctggctctctttggaatg | 347 bp |
| Osteocalcin | NM_031368.4 | forward aacatagtgctcgtcttcttctg reverse tgccagagtttgctttagg | 425 bp |

3. Methoden

3.1 Ausgangsmaterial

3.1.1 Herkunft

Alle Zellen wurden aus gesunden Mäusen im Alter von 3-6 Monaten isoliert. Zwischen weiblichen und männlichen Mäusen wurde nicht unterschieden.

3.1.2 Entnahme

Stammzellen wurden aus dem Leistenfett von Mäusen (Stamm) isoliert. Die Mäuse wurden einzeln in einer kleinen Box in tiefer Narkose (Xylazin 10mg/kg KG und Ketanest 100mg/kg KG) durch cervikale Dislokation und Entbluten getötet. Danach wurde die Haut nach einem Bauchschnitt zur Seite geklappt und das Leistenfett freipräpariert und entnommen. Danach wurden die inguinalen Fettpolster bis zur Verarbeitung, die immer am selben Tag erfolgte, in PBS bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

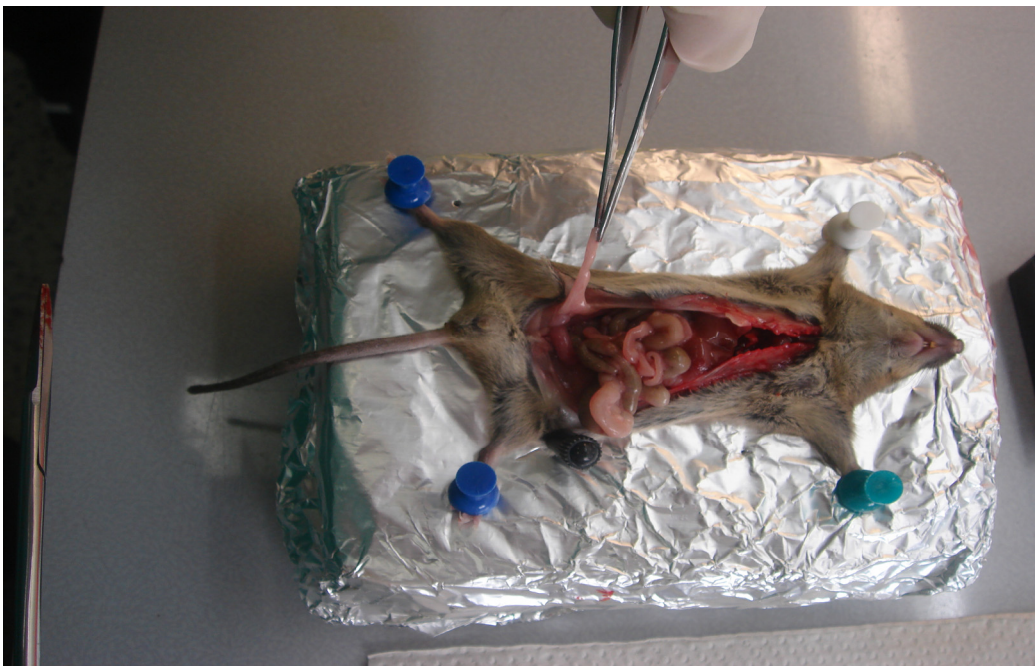


Abb. 5: Präparation von murinem Leistenfett

3.2 Isolierung der Zellen

Die weitere Verarbeitung erfolgte unter sterilen Bedingungen.

Um die mesenchymalen Stammzellen aus dem Fett zu isolieren wurden die Fettpolster aus dem Puffer genommen und mit zwei Skalpelln in einer Petrischale kleingeschnitten. Eventuell noch dranhängende Reste anderen Gewebes wurden bei diesem Schritt entfernt. Der erhaltene Gewebepulver wurde mit einem Löffel in ein 15ml-Röhrchen überführt. Noch in der Petrischale hängende Reste wurden mit 3 ml 0,9% NaCl abgespült und ebenfalls in das Röhrchen gegeben. Nun wurden 25 mg Collagenase in 2 ml 0,9% NaCl gelöst und durch einen 0,22µm Filter mit niedriger Proteinbindungskapazität steril filtriert und dazugegeben. Das Röhrchen wurde verschlossen und 1 Stunde in einem 37° C-Wasserbad inkubiert. Es wurde immer wieder geschüttelt, weil sich das Fett nach oben absetzte. Danach wurde die Mischung durch ein Nylonnetz mit 100µm-Maschen filtriert, um noch vorhandene größere Stücke zu entfernen. Nun wurde die gleiche Menge Medium zugegeben und alles bei 300g für 5 Minuten zentrifugiert. Es entstand ein Pellet, der Überstand wurde abgesaugt und verworfen. Das Pellet wurde in Medium resuspendiert und nochmals 5 Minuten bei 300g zentrifugiert. Wieder wurde der Überstand abgesaugt und verworfen. Dieses Pellet wurde in 12 ml Kulutrmedium mit 0,4% PenStrep resuspendiert und auf 2 Platten à 25 cm² aufgeteilt. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

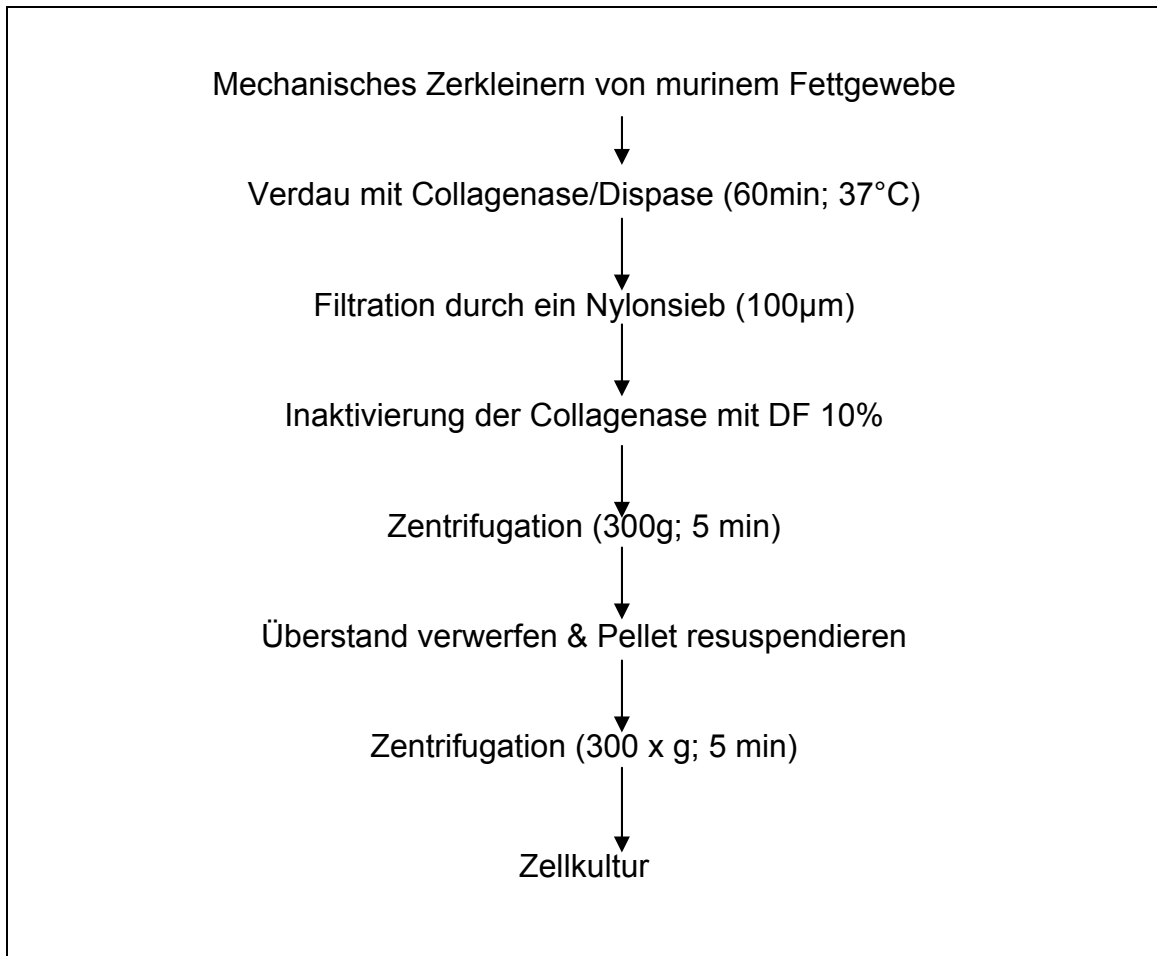


Abb. 6: Schematische Darstellung der Stammzellisolation aus Fettgewebe

3.3 Zellkulturtechniken

3.3.1 Materialien

Alle in der Zellkultur verwendeten Materialien wurden entweder durch feuchte Hitze sterilisiert (autoklaviert), gassterilisiert, mit 70% (v/v) Ethanol behandelt oder steril bezogen. Vor der Arbeit an der Sterilbank wurden Hände bzw. Handschuhe mit 70% (v/v) Ethanol oberflächlich desinfiziert. Alle mit Zellmaterial in Kontakt getretenen Materialien wurden entweder durch Alkohol oder durch autoklavieren sterilisiert oder entsorgt. Unsterile Lösungen wurden mit 0,22µm Filtereinheiten mit niedriger Proteinbindungskapazität sterilfiltriert.

3.3.2 Kulturmedium und häufig verwendete Puffer

DF 10%: 450ml Dulbecco's modified Eagle's Medium, 50ml FCS, 2ml PenStrep

Zur Inaktivierung wurde das fötale Kälberserum vor der Verwendung 40 min in ein 56°C heißes Wasserbad gestellt.

PBS: 8g NaCl; 1,16g Na₂HPO₄; 0,2g KH₂PO₄; 0,2g KCl
1l Wasser hinzufügen und auf pH 7 einstellen

3.3.3 Kultivierung muriner mesenchymaler Stammzellen

Die Kultivierung der murinen mesenchymalen Stammzellen erfolgte in Kulturflaschen im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und wassergesättigter Luftatmosphäre. Dem Kulturmedium war zu jeder Zeit eine Mischung aus Penicillin und Streptomycin im Verhältnis 1:250 zugesetzt. Das Medium wurde alle 4-5 Tage gewechselt.

In den Passagen P0-P4 wurden die Zellen bei Sub-Konfluenz (ca. 90%) 1:2 passagiert. Ab Passage 4 konnten die Zellen immer 1:5 passagiert werden.

3.3.4 Subkultivierung adhärenter Zellen

Lösungen: Trypsin/EDTA: 0,05% (w/v) Trypsin, 0,02% (w/v) EDTA
PBS

Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, der Boden des Kulturgefäßes mit Trypsin/EDTA-Lösung bedeckt und 10 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Das Ablösen der Zellen wurde durch Aufschlagen des Kulturgefäßes auf der Arbeitsplatte beschleunigt.

Die abgelösten Zellen wurden in Kulturmedium aufgenommen, das auch gleichzeitig die Trypsin/EDTA-Lösung inaktivierte und 5 Minuten bei 300g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in frischem Kulturmedium aufgenommen, in verschiedenen Passagen gezählt und in neue Kulturgefäße überführt.

3.3.5 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Lösungen: Einfriermedium: DMEM, 10% (v/v) FCS, 7% (v/v) DMSO
Kulturmedium

Zur dauerhaften Lagerung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Hierzu wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung vom Boden der Flasche abgelöst, in Kulturmedium aufgenommen und dann zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml vorgekühltem Einfriermedium aufgenommen. In ein 1,5 ml Kryoröhrchen wurde eine 75 cm²-Flasche aufgenommen (ca $1,2 \times 10^6$ Zellen). Die Kryoröhrchen wurden erst 2 Tage bei -80°C eingefroren und dann in den Stickstofftank überführt.

Beim Auftauen wurde Zellsuspension in einem 37°C Wasserbad erhitzt. Sofort nach komplettem Auftauen wurden die Zellen in vorgewärmtem Kulturmedium aufgenommen und in ein 15ml-Röhrchen überführt. Es folgte die Zentrifugation bei 300g für 5 Minuten, das Zellpellet wurde in frischem Kulturmedium aufgenommen und in Kulturgefäße ausgesät.

3.3.6 Zellzählung mit Tryptanblau

Zur Zellzahlbestimmung wurde beim Passagieren der Zellen vor dem Aussäen in die neuen Kulturgefäße eine kleine Probe von 20 µl entnommen. Diese wurde mit 20µl Tryptanblau vermischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Dann wurde die Mischung in eine Zählkammer nach Neubauer pipettiert und unter dem Mikroskop 4 Großquadrate ausgezählt. Die Berechnung der Zellzahl erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Zellen/ml} = \text{Zellzahl} * 2 * 10^4$$

Die Berechnung erfolgte für jedes der Großquadrate, anschließend wurde daraus der Mittelwert gebildet.

3.3.7 Proliferation

Medien: - DMEM
- DMEM + 10%FCS
- Mesencult

Die Zellen wurden in drei 96-well-Platten ausgesät, auf jeder Platte je 3x5 wells mit 5000, 10000 und 20000 Zellen.

Die Zellen wurden einen Tag in ihrem gewohnten Kulturmedium belassen, um sie erst einmal adhären zu lassen. Danach wurden pro Platte je 5 Vertiefungen mit verschiedenen Zellzahlen mit DMEM, DF 10% und Mesencult für 24h, 48h oder 72h kultiviert.

Die Fluoreszenz wurde nach der Kultivierung im Fluoreszenzmessgerät gemessen und ausgewertet. Dazu wurden die Zellen mit der DAPI-Lösung gefärbt (siehe 3.3.8). Die DAPI-Lösung färbt DNA an.

3.3.8 Steriltests

Lösungen: DAPI-Lösung: 1 µg/ml DAPI in PBS

Fixierlösung: Aceton/Methanol 1:1 (v/v)

Waren die Zellkulturen mit Bakterien oder Pilzen kontaminiert, wurde dies makroskopisch und mikroskopisch erfasst.

Zur Erfassung der Kontamination mit Mycoplasmen wurden die Zellen auf Kammer-Objektträgern kultiviert. Bei Konfluenz wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 10 Minuten mit Fixierlösung fixiert. Danach wurde der Objektträger mit den Zellen 5 Minuten in DAPI-Lösung inkubiert, eingedeckelt und im Fluoreszenzmikroskop bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm und einer Excitationswellenlänge von 488 nm betrachtet. Kontaminierte Kulturen waren an runden, kleinen, hell leuchtenden Punkten an der Zellmembran und im Cytosol erkennbar.

3.4 Charakterisierung des Zellmaterials

3.4.1 Durchflusscytometrie

Lösungen: PBS

Fixierlösung: 1% PFA (mit PBS verdünnt, auf pH 7,4 eingestellt)

Die Zellen wurden sorgfältig zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA-Lösung bedeckt. Die Kulturgefäße wurden für 10 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Nachdem sich die Zellen vom Kulturgefäß gelöst hatten, wurden sie in PBS aufgenommen und bei 300 x g 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in frischem PBS aufgenommen. Die Zellen wurden auf die FACS-Röhrchen verteilt und nochmals bei 300 x g 5 Minuten

zentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig mit einer Pipette abgenommen. Zu dem Pellet wurden die bereits mit einem fluoreszierenden Farbstoff versehenen Antikörper pipettiert und alles gründlich durchgeschüttelt. Der Mix wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nun wurden die Zellen mit je 2 ml PBS pro Röhrchen gewaschen, um nicht-gebundenen Antikörper zu entfernen und nochmals 5 Minuten bei 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit je 200 µl 1% PFA fixiert. Wenn die sofortige Messung nicht möglich war, wurden die Zellen im Kühlschrank gelagert.

Das FACScan-Cytometer wurde zunächst mit Zellen, welche ohne Antikörper inkubiert worden waren, kalibriert. Pro Ansatz wurden 10000 Zellen ausgewertet. Zur Auswertung der Messdaten wurde das Softwareprogramm WinMDI Flow Cytometry Application Version 2.8 verwendet. Debride Zellen wurden aufgrund ihrer geringeren Größe erkannt und durch Setzen von Fenstern ausgeschlossen. In einem Histogramm wurde die Zahl der Zellen, die das Antigen aufwiesen, und wie stark sie dieses exprimierten, dargestellt. (X-Achse: „Leuchtintensität der einzelnen Zelle“; Y-Achse: „Zahl der Zellen“)

3.5 Stimulieren der Zellen mit supplementierten Medien

3.5.1. Versuchsaufbau

Der Versuch wurde in verschiedenen Passagen für je 3 und 4 Wochen angesetzt. Die Zellen wurden 1:5 in Kulturflaschen à 75 cm² und 6-well-Platten (à 10 cm²) passagiert und dort noch für 2 weitere Tage mit normalem DF 10% Kulturmedium kultiviert. Danach wurden je 2 Flaschen und 3 Schalen pro Platte mit normalem, unverändertem Kulturmedium belassen; in 2 Flaschen und eine Schale pro Platte wurde adipogenes Medium gegeben; in 2 Flaschen und eine Schale pro Platte wurde osteogenes Medium gegeben; in eine Schale pro Platte wurde chondrogenes Medium gegeben. Nach 3 Wochen wurden die Zellen fotografiert.

Aus je einer Flasche mit Kontrollmedium, adipogenem Medium und osteogenem Medium wurden die Zellen entnommen und die RNA extrahiert um eventuell vorhandene spezifische RNA mit einer PCR nachzuweisen.

Die 6-well-Platte wurde genommen, um eventuell gebildete spezifische Stoffwechselprodukte durch Färben nachzuweisen: so wurde

- eine Kontrollschale und die Schale mit dem adipogenen Medium mit der Oil-O-Red- Färbung, welche Fett rot färbt, angefärbt,
- eine Kontrollschale und die Schale mit dem osteogenen Medium mit der Färbung nach Van-Kossa, welche Calciumsalze nachweist, angefärbt
- eine Kontrollschale und die Schale mit dem chondrogenen Medium wurden mit Alcian-blue- Lösung angefärbt.

Genauso wurde mit den verbliebenen Zellen nach 4 Wochen verfahren.

3.5.2 Medienzusammensetzung

Alle Medien wurden in ausreichender Menge am ersten Versuchstag angesetzt und im Kühlschrank gelagert.

3.5.2.1 Adipogenes Medium

Basiskulturmedium: DMEM + 10% FCS

0,5 mM 3-Isobuthyl-1-Methylxanthin

1µM Dexamethason

200µM Indomethacin

1,74 µM Insulin

3500mg/l Glucose

3.5.2.2 Osteogenes Medium

Basiskulturmedium: DMEM + 15% FCS

0,1 μ M Dexamethason

50 μ M Ascorbinsäure

10mM Glycerolphosphat

3.5.2.3 Chondrogenes Medium

Basiskulturmedium: DMEM + 1% FCS

0,2131 mM Ascorbat

6,25 μ g/ml Insulin

10 ng/ml TGF β

3.5.3 Nachweis spezifischer Stoffwechselprodukte durch Anfärben

3.5.3.1 Oil-Red-O-Färbung

Lösungen: Fixierlösung: 1% PFA

Färbelösung: Oil-Red-O

Die Zellen wurden hierfür sorgfältig mit PBS gewaschen und anschließend bei Raumtemperatur 1 Stunde mit 1% PFA fixiert. Nach Absaugen der Fixierlösung wurden die Zellen für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur mit Oil-Red-O inkubiert. Nun wurde zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen und das Ergebnis unter dem Mikroskop beurteilt.

3.5.3.2 Van-Kossa-Färbung

Fixiermittel: 70% Ethanol (v/v)

Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und dann mit eiskaltem Ethanol auf Eis für 20 Minuten fixiert. Es folgte zweimaliges Waschen mit destilliertem Wasser. Nun wurden die Zellen mit 5% Silbernitratlösung für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Wieder wurde dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen und die Zellen weitere 5 Minuten mit 0,3 M Natriumthiosulfat-pentahydrat inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen und angefärbte Extrazellulärschubstanz unter dem Mikroskop beurteilt.

3.5.3.3 Alcian-blue-Färbung

Lösungen: Fixierlösung: 3% Essigsäure

Färbelösung: Alcianblau 8GX solution

Die Zellen wurden für 3 Minuten mit 3% Essigsäure fixiert und anschließend für 30 min bei Raumtemperatur in der Färbelösung inkubiert. Es wurde noch einmal mit 3% Essigsäure gespült und 5 Minuten mit destilliertem Wasser stehen gelassen, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Danach wurden die Zellen unter dem Mikroskop beurteilt.

3.5.4 Molekulare Methoden

Vorarbeiten: Die Primer wurden vor der Anwendung bei verschiedenen Temperaturen mit einer Positiv-Kontrolle getestet.

3.5.4.1 Isolierung von RNA aus Monolayerkulturen

Lösungen: Denaturierungslösung: 4M Guanidinthiocyanat (GITC), 25mM

Natriumcitrat, 0,5% (v/v) N-Laurysarcosyl, 0,1M β -Mercaptoethanol

Ansatz: 100 g GITC wurde in 113,5 ml Aqua dest. Bei 37°C gelöst, 10,5 ml 0,5M Natriumcitrat pH7 zugegeben und die Lösung autoklaviert. 10,6 ml 10% (w/v) Sarcosyllösung wurde

zugesezt.

Kurz vor Gebrauch wurden zu 10 ml Lösung 72 μ l β - Mercaptoethanol dazugegeben.

2M Natriumacetat

Ansatz: 4,1 g Natriumacetat in 15-20 ml Eisessig lösen, mit Aqua dest.

auf 25 ml auffüllen und pH 4 einstellen.

Die Isolierung der RNA beruht auf der Methode von Chomczynski und Sacchi (89). Zellen in 75 cm² Kulturflaschen wurden mit kaltem PBS gewaschen und ab diesem Schritt die ganze Zeit auf Eis-Akkus gelagert. Nun wurde in jede Flasche 0,5ml Denaturierungslösung gegeben, die Zellen mit einem Zellschaber vom Boden abgekratzt, mit einer Pipette in ein vorgekühltes 2ml Eppendorfgefäß überführt und für 1 h bei 4°C gelagert. Es wurden jedem Gefäß 50 μ l 2M Natriumacetat, 500 μ l Phenol und 130 μ l Chloroform-Isoamylalkohol zugesezt und je 15 sec gut durchmischt. Wieder folgte eine Inkubationszeit von 15 min bei 4°C, dann wurden die Gefäße bei 4°C 20 min bei 16000 x g zentrifugiert.

Die obere, klare Phase wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und in ein frisches vorgekühltes Eppendorfgefäß überführt. Dann wurde ca. die gleiche Menge an Isopropanol zugefügt, 15 sec gut geschüttelt und wieder alles für 1 Stunde bei -20°C inkubiert. Zur zweiten Präzipitation wurde die Lösung bei 4°C 20 min bei $16000 \times g$ zentrifugiert und der Überstand vorsichtig entnommen.

Das im Eppendorfgefäß haften gebliebene Pellet wurde mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, danach mit 95% (v/v) Ethanol und für ca. 15 min auf Eis luftgetrocknet.

Nun wurde es je nach Größe in $20\mu\text{l}$ – $100\mu\text{l}$ DEPC-Wasser wieder aufgenommen.

Von jeder Probe wurde $2\mu\text{l}$ zur photometrischen Bestimmung der RNA-Konzentration verwendet. Die Proben wurden bei -80°C gelagert.

3.5.4.2 Transkription in cDNA mittels RT

Alle PCR-Ansätze, die mit der cDNA aus einer Probe laufen sollten, wurden gemeinsam transkribiert

.

Lösungen: Mastermix: Pro PCR-Ansatz wurden $0,66\text{ ml}$ 5mM MgCl_2 -Lösung,
 $0,66\mu\text{l}$ PCR 10xPuffer,
 $0,66\text{ml}$ dNTP und
 $0,33\mu\text{l}$ β -Mercaptoethanol
gemischt. Kurz vor Gebrauch wurde noch
 $0,083\mu\text{l}$ Reverse Transkriptase
hinzugefügt.

Probenvorbereitung: Pro PCR-Ansatz werden $0,333\mu\text{g}$ RNA benötigt, außerdem

$0,333\mu\text{l}$ Random Hexamers.

Die Proben wurden nun 1 Minute bei 70°C inkubiert und dann 5 Minuten auf 6°C abgekühlt. Nun wurde Aqua dest. zur Probe hinzugefügt: Je nachdem, wie viel µl der RNA-Probe benötigt worden waren, mehr oder weniger. Bei der idealen RNA-Konzentration von 1000 µg/ml wurde pro PCR-Ansatz 3,58 µl Aqua dest. hinzugefügt. War die Konzentration höher, wurde mehr Wasser benötigt, um zusätzlich das Volumendefizit auszugleichen; war die Konzentration niedriger als 1000µg/ml, wurde weniger Wasser dazugegeben. Es wurde 2,75µl Mastermix pro PCR-Ansatz dazu pipettiert und bei 37°C für 30 min inkubiert. Danach wurde für 5 Minuten auf 6°C abgekühlt, und nochmals für 2 Minuten auf 75°C erhitzt, um das Enzym zu zerstören. Die entstandene cDNA wurde bei -80°C oder gleich für die PCR weiterverarbeitet.

3.5.4.3 PCR

Primervorbereitung: Sense und Antisense wurden getrennt geliefert. Die zwei Röhrchen wurden kurz zentrifugiert, die von der Firma angegebene Menge Wasser dazugegeben und anschließend gemischt. Der Primermix wurde bei -20°C gelagert. Während der ganzen PCR wurde auf Eis gearbeitet.

Lösungen: Mastermix: Pro PCR-Ansatz wurden 0,6 1mM MgCl₂-Lösung,
2,4µl PCR 10x Puffer und 18,85µl DEPC-Wasser
gemischt.

0,15µl Taq-Polymerase wurden kurz vor Gebrauch
hinzugefügt.

In ein PCR-Tube wurden 2µl Primermix, 6µl Probe aus der RT-Reaktion und 22 µl Mastermix gegeben und das ganze im Thermocycler für 30 Zyklen inkubiert.

Pro Zyklus wurde wie folgt inkubiert:

X°C für 1 Minute

95°C für 1 Minute

72°C für 1 Minute

Die Temperatur X war für jeden Primer unterschiedlich und wurde vorher mit einer Positiv- Kontrolle ausgetestet.

3.5.4.4 Agarosegelelektrophorese

Lösungen: Probenpuffer: 25% Sucrose, 1% SDS, 1% Bromphenolblau in Aqua dest.

lösen.

TAC-Puffer: 0,48g Tris

1,66 g NH_4Cl ad 200ml Aqua dest.

Man löst für ein 1,5% Agarosegel 2,25g Agarose in 150ml TAC-Puffer und erhitzt das in der Mikrowelle, bis sich die Agarose aufgelöst hat. In das etwas abgekühlte Gel wurde 150 μl 0,05% Ethidiumbromid gegeben, gut durchmischt in die Gelvorrichtung gegossen. Ein Kamm wurde eingesetzt, um Löcher für die Proben offen zu halten und das Gel 30 Minuten aushärten gelassen. In der Zeit wurden die Proben vorbereitet: Zu jeder Probe der PCR wurden 3,33 μl Probenpuffer hinzugefügt und die Lösung für 5-10 Minuten auf 75°C erhitzt, danach für 10 Minuten auf Eis gestellt.

Nachdem das Gel ausgehärtet war, wurde der Kamm entfernt und die Gelkammer mit TAC-Puffer aufgefüllt, bis das Gel gut bedeckt war. Die Proben wurden in die Geltaschen pipettiert; am Ende jeder Reihe wurde zusätzlich eine Standard- DNA- Mischung mitlaufen gelassen. Je nach Größe lief das Gel für 30-90 Minuten bei 70 Volt und 120 Ampere.

4. Ergebnisse

Murine mesenchymale Stammzellen wurden aus dem Leistenfett gewonnen. Die Mäuse wurden in tiefer Narkose durch zervicale Dislokation und Entbluten getötet. Danach wurde die Haut nach einem Bauchschnitt zur Seite geklappt, das Leistenfett freipräpariert und entnommen. Es wurden Wildtypmäuse (Stamm: 129/SvEv-TgH) oder transgene Tiere (grün-fluoreszierendes Protein, GFP C57/BL6) verwendet.

Pro Isolation wurde das Leistenfett von 2 Mäusen verwendet, pro Maus wurde durchschnittlich 2 Gramm Fettgewebe gewonnen. Aus diesen 4 g Fett wurden im Mittel ca. 30.000 kernhaltige Zellen gewonnen, das entspricht einer Zellzahl von $7,5 \times 10^3$ Zellen pro Gramm Gewebe. Allerdings haftete ein Teil dieser Zellen nicht an der Plastikoberfläche des Kulturgefäßes, so dass die Ausbeute an ASCs pro Gramm Gewebe geringer war als die oben genannte Zahl.

4.1 Morphologie

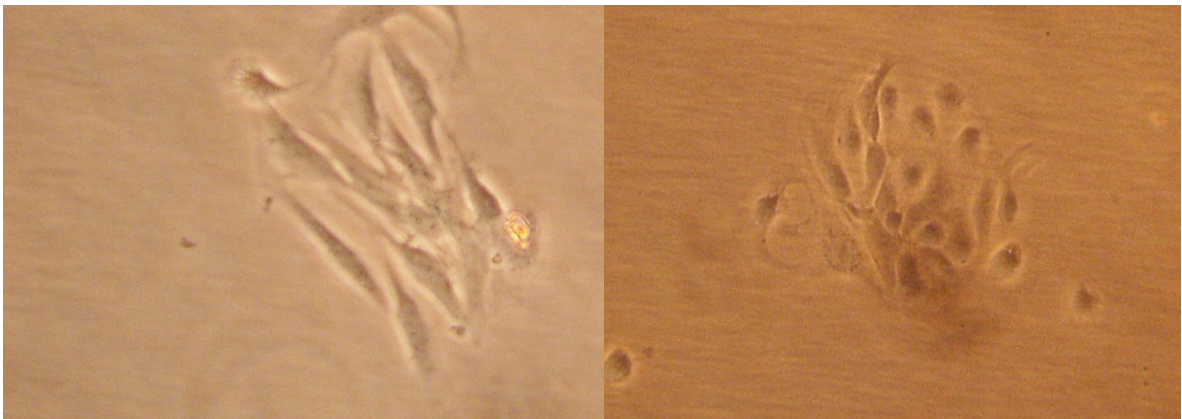


Abb. 7: lichtmikroskopische Bilder von mASC, 1. Tag nach der Isolierung

In Abbildung 1 und 2 erkennt man die Kolonien, die von den adhärenierten ASCs schon am 1. Tag nach der Isolierung gebildet wurden. Nach wenigen Tagen waren diese Zellanhäufungen schon deutlich gewachsen. Nach ca. 10 Tagen waren die Zellen subkonfluent und wurden passagiert. Bei Subkonfluenz

befanden sich in einer Flasche von 25 cm² ca. 400.000 Zellen, das entspricht einer Dichte von $1,6 \times 10^4$ Zellen pro Quadratzentimeter.

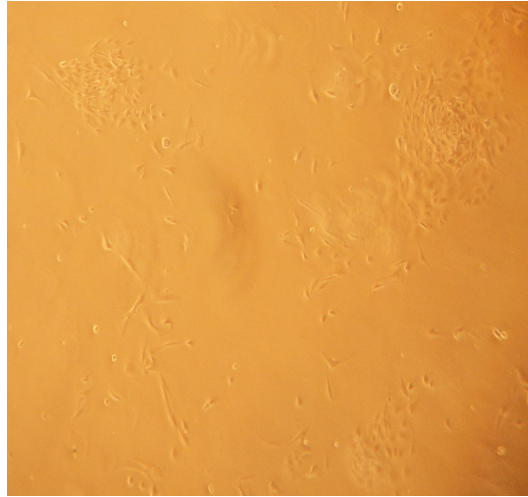


Abb. 8: mASCs, 4 Tage nach der Isolation

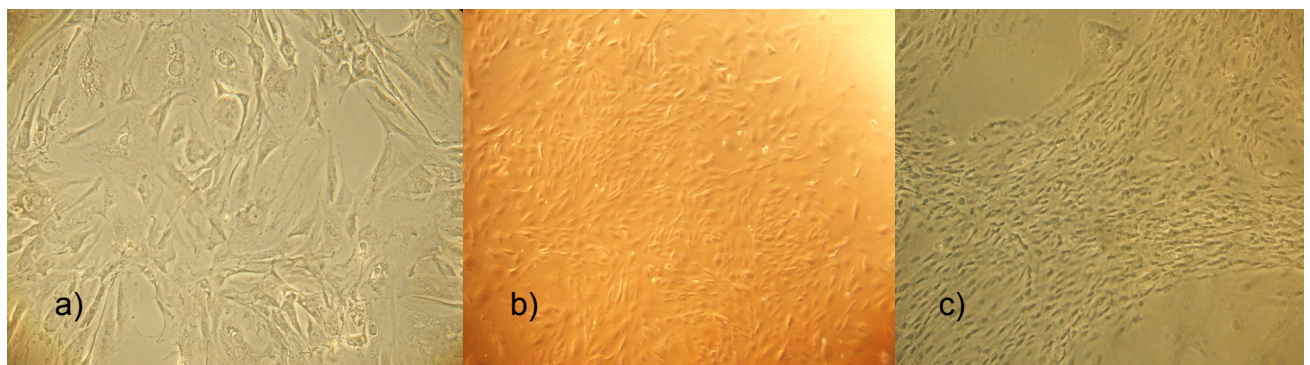


Abb. 9: mASC in verschiedenen Passagen: a) P2, b) P3, c) P9

In frühen Passagen erschienen die Zellen recht heterogen, die meisten wiesen eine typische fibroblasten-ähnliche Form auf, mit lang gezogenem, spindelförmigem Zellkörper. Andere erschienen platt und weit ausgezogen. In späteren Passagen beobachtete man nur noch die spindelförmigen Zellen, die sich bei höherer Zelldichte fischzugförmig anordneten.

In frühen Passagen proliferierten die Zellen langsamer, sie wurden nach 10-15 Tagen in einem Splitverhältnis von 1:3 oder 1:4 umgesetzt. Ca. ab Passage 15 konnten sie im Splitverhältnis 1:50 umgesetzt werden.

Zellen in sehr hohen Passagen, ca. ab Passage 40, wurden im Verhältnis 1:500 umgesetzt und waren trotzdem nach 14 Tagen wieder konfluent.

4.2 Einfluß verschiedener Medien auf die Proliferation

Die Zellen wurden in Passage 6 in verschiedenen Medien kultiviert um deren Einfluß auf das Proliferationsverhalten vergleichend zu beobachten. Als Basismedium ohne Zusätze wurde Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) verwendet.

Die weiteren Medien waren DMEM mit Zusatz von Fötalem Kälberserum (DF) oder Mesencult, ein fertiges Kulturmedium für mesenchymale Stammzellen mit definierten Inhaltsstoffen.

Die Zellen wurden in unterschiedlicher Dichte ausgesät. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurden die Zellkerne mit einem Fluoreszenzfarbstoff (DAPI) gefärbt. Anschließend wurde die Fluoreszenzintensität im Fluoreszenzmessgerät gemessen.

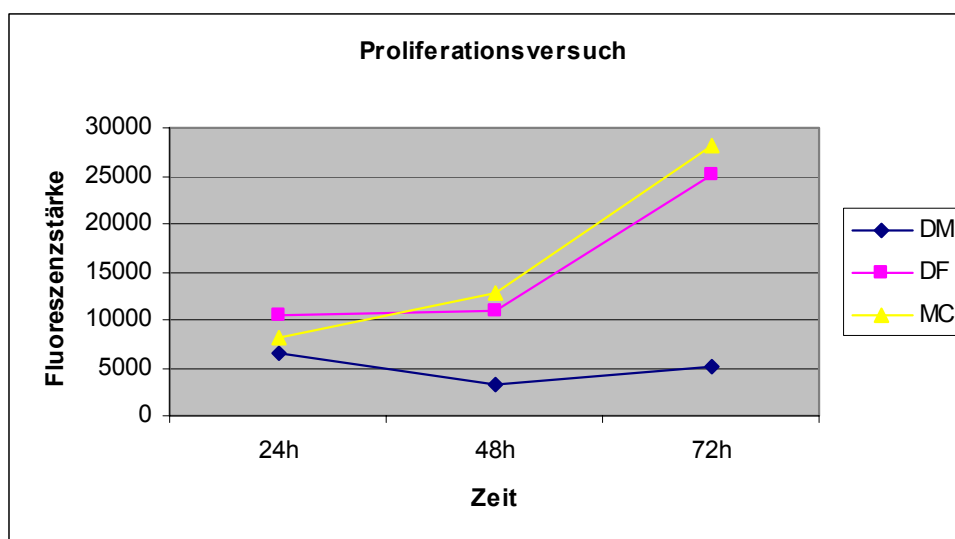


Abb.10: Verschiedene Medien haben unterschiedlichen Einfluß auf die Proliferation von mASCs

Das Diagramm zeigt, dass der Einfluss von Mesencult und DF gleichwertig ist. Unter beiden Medien lässt sich ein deutliches Wachstum der Zellen nachweisen.

Werden die Zellen hingegen in DM kultiviert, sterben anfangs sogar Zellen ab, und danach proliferieren sie nur langsam.

4.3 Durchflußcytometrie

Bei der Darstellung der Ergebnisse der durchflußcytometrischen Analysen werden verschieden Arten von Diagrammen verwendet:

In Abb. 11 wurde die Größe der Zellen (FSC) gegen ihre Granularität (SSC) aufgetragen. So konnte auf den Zustand der Zellen geschlossen werden: sehr hohe Granularität einer Zelle kann darauf hinweisen, dass die Zelle in Apoptose gegangen ist. Zellfragmente konnten durch Setzen einer Mindestgröße („gating“) bei der Auswertung ausgeschlossen werden. Nur die ausgewählten Zellen, die zur Auswertung verwendet wurden, erscheinen in den Histogrammen wie Abb.12.

In Abb. 12 wurde die Fluoreszenzstärke (FL-1 oder FL2) gegen die Zahl der Zellen aufgetragen, die diese Fluoreszenzstärke aufweisen. Daraus kann geschlossen werden, wie viele der Zellen das gefärbte Oberflächenantigen wie stark exprimieren.

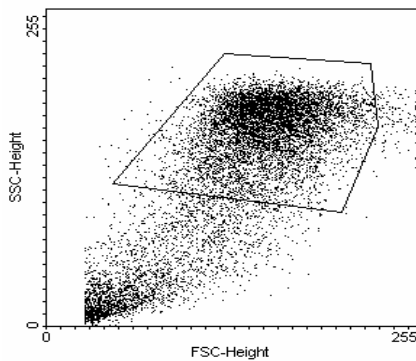


Abb. 11

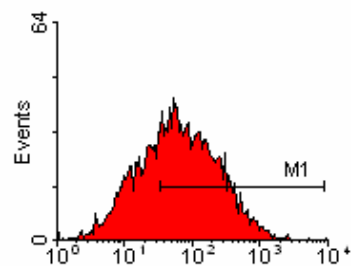


Abb. 12

4.3.1 Messung verschiedener Oberflächenantigene

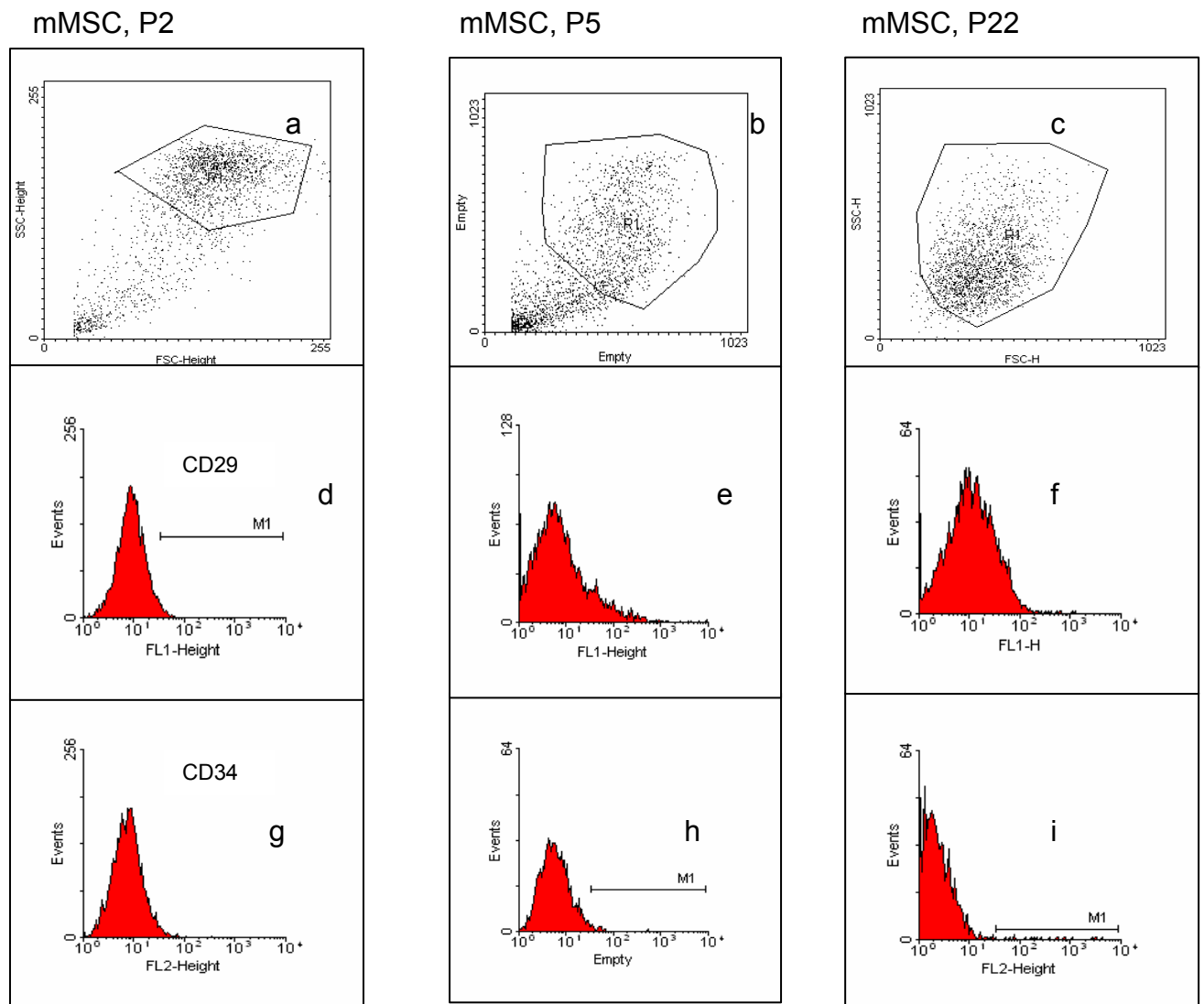
Die Zellen zeigen über alle Passagen hinweg eine Expression von CD29 (Abb13 d-f).

CD34 (Abb13 g-i) wird anfangs von einigen Zellen schwach exprimiert, in späteren Passagen nimmt diese Expression jedoch deutlich ab.

CD44 (Abb13 j-l) wird gleich bleibend auf niedrigem Niveau exprimiert. CD45 (Abb13 m-o) kann als typischer Marker für Leukozyten erwartungsgemäß in allen Passagen nicht nachgewiesen werden.

CD90 (Thy 1.2 Abb13 p-r), ein Stammzellmarker, wird schon in frühen Passagen stark exprimiert, in späteren Passagen nimmt dies noch deutlich zu.

Sca-1 (Abb13 s-u) kann erst in späteren Passagen eindeutig nachgewiesen werden.



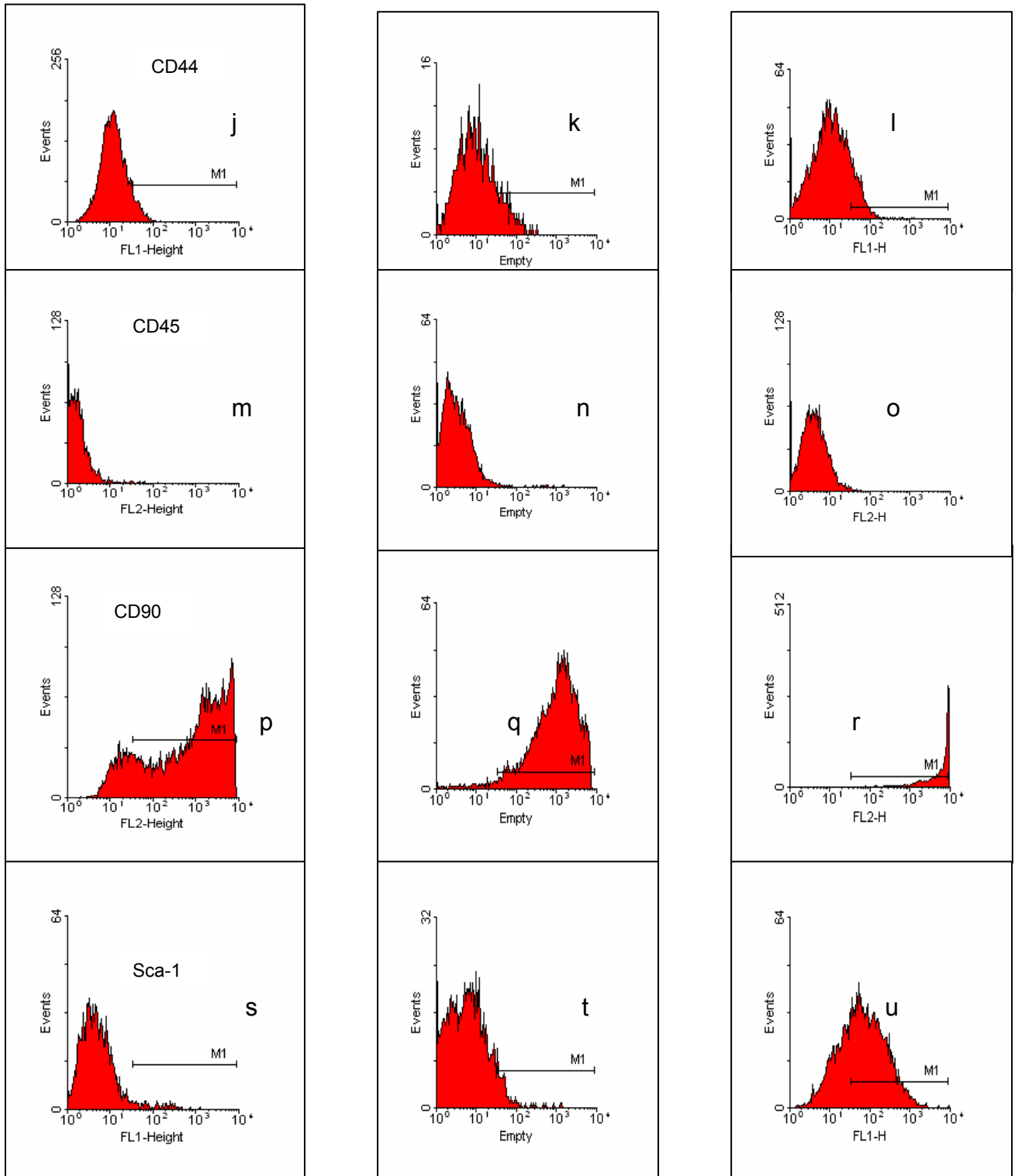


Abb.13 Expression verschiedener Oberflächenantigene in verschiedenen Passagen. Linke Spalte: P2, mittlere Spalte: P5, rechte Spalte: P22.

a-c: Charakteristische DotPlots der verwendeten Zellen; d-f: CD29; g-i: CD34; j-l: CD44; m-o: CD45; p-r: CD90 (Thy-1.2); s-u: Sca-1

Zur eindeutigeren Darstellung der Ergebnisse sind die Medianwerte der oben gezeigten repräsentativen Histogramme in Tabelle 1 als Zahlenwerte aufgeführt. Der Medianwert gibt an, welche Fluoreszenzstärke die Zellen am häufigsten aufweisen.

| | P2 | P5 | P22 |
|----------------|--------|--------|--------|
| CD29 | 7,56 | 7,59 | 10,82 |
| CD34 | 6,83 | 4,38 | 1,66 |
| CD44 | 11,01 | 7,22 | 10,82 |
| CD45 | 1,55 | 3,2 | 3,1 |
| CD90 (Thy-1.2) | 456,41 | 980,67 | 4382,2 |
| Sca-1 | 4,81 | 4,08 | 64,58 |

Tab.2 : Medianwerte der Diagramme aus Abb.7

4.3.2 Messung von GFP -transfizierten Zellen

Die Expression von GFP in kultivierten Zellen aus GFP-transgenen Mäusen konnte sowohl im Durchflußcytometer als auch in der Fluoreszenzmikroskopie eindeutig nachgewiesen werden. Zelluläres GFP wird vom Laserstrahl angeregt und emittiert einen Lichtimpuls, der beispielsweise in der Durchflußcytometrie im FL-1-Kanal gemessen werden kann.

GFP- transgene Zellen wurden in verschiedenen Passagen gemessen. Bis Passage 22 konnte sicher nachgewiesen werden, dass die kultivierten Zellen das Protein exprimieren.

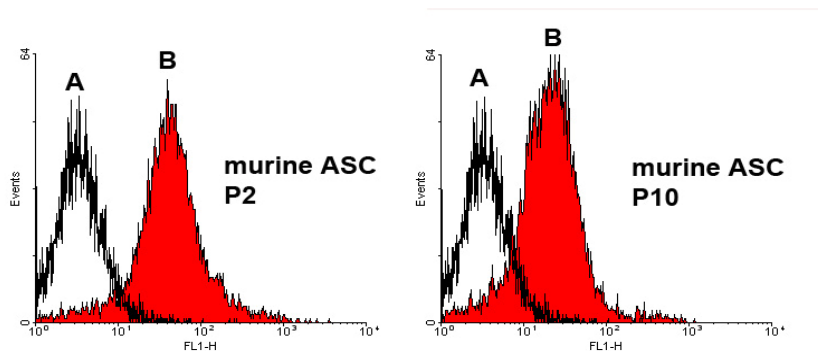


Abb. 14: Durchflußzytometrischer GFP-Nachweis in Passage 2 und 10. A: Wildtyp-Mäuse, B: GFP-transgene Mäuse

4.4 Nachweis der Differenzierung

4.4.1 Adipogene Differenzierung

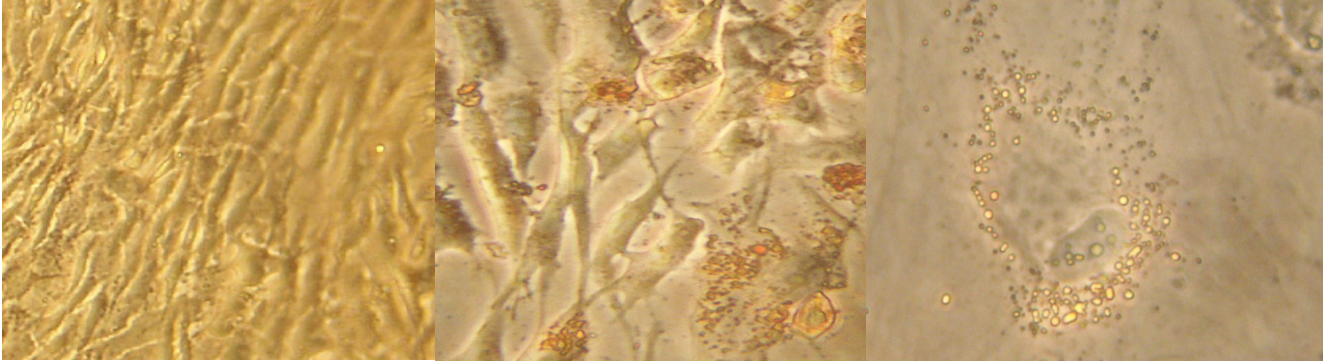


Abb.15:rechts: Kontrolle, mitte und links: intrazelluläre Lipidvakuolen in Zellen, die 4 Wochen mit adipogenem Medium stimuliert wurden, alle Zellen nach Färbung mit Oil-O-Red

Zur Induzierung der adipogenen Differenzierung wurden die Zellen 3 oder 4 Wochen in adipogenem Medium kultiviert. Gleichzeitig wurden Zellen aus derselben Isolation und der gleichen Passage unter denselben äußeren Bedingungen in einem Kontrollmedium ohne differenzierungsinduzierende Supplemente (DF 10%) kultiviert. Diese Zellen dienten bei der Auswertung als Kontrolle. Nach 2 bis 3 Wochen in adipogenem Medium veränderten die Zellen ihre Form von der lang gestreckten, fibroblastoiden zu einer runderen Form. Die Wachstumsgeschwindigkeit nahm deutlich ab, sie konfluieren später als die Zellen im Kontrollmedium.

Der Nachweis der adipogenen Differenzierung wurde durch zwei Nachweismethoden erbracht:

Erstens wurden von den differenzierten Zellen nach 4 Wochen gebildete intrazelluläre Lipidvakuolen mit der Oil-O-Red-Färbung nachgewiesen. Bei Zellen, die über den gleichen Zeitraum in Kontrollmedium kultiviert wurden, konnten keine Lipidvakuolen nachgewiesen werden. (Abb. 15).

Zweitens wurden mittels PCR-Analyse Fettgewebs-spezifische Genprodukte wie LPL und PPAR γ nachgewiesen. Diese Marker werden von unstimulierten Zellen nicht exprimiert. Außerdem zeigte sich bei den zu Adipozyten differenzierten Stammzellen ein deutlicher Rückgang in der Expression des Stammzell-typischen Markers Wnt-4.

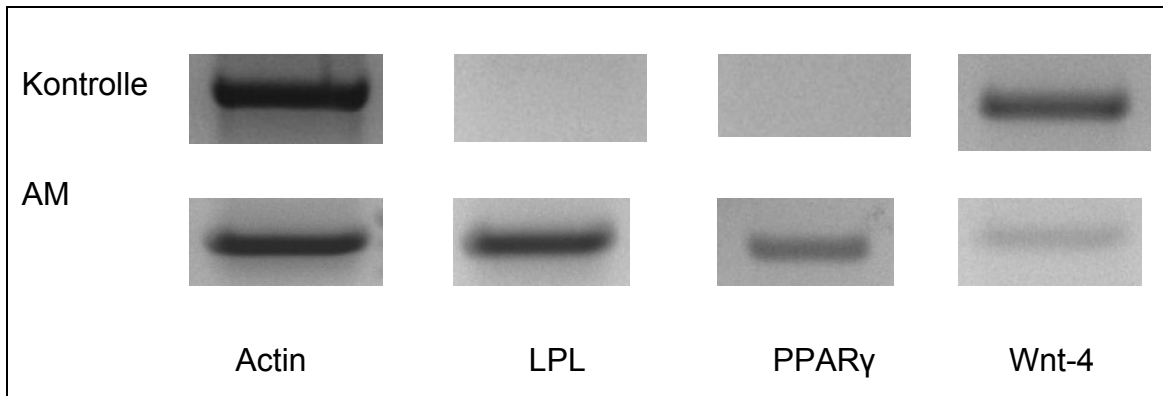


Abb. 16 PCR-Banden von revers transkribierter RNA aus Zellen nach 4 Wochen Kultivierung in oben: Kontroll-Medium, unten:mASC kultiziert in adipogenem Medium

Es zeigte sich, dass zur Differenzierung der mASCs zu Adipozyten „junge“ ASCs deutlich besser geeignet waren. Hier war die Bildung von intrazellulären Lipidvakuolen deutlicher. Es konnte kein Nachweis einer adipogenen Differenzierung mit Zellen höher als Passage 10 erbracht werden; bis Passage 7 war die adipogene Differenzierungsfähigkeit sehr gut.

4.4.2 Osteogene Differenzierung

In osteogenem Medium kultivierte murine ASCs zeigten nach 2 Wochen eine deutlich veränderte Morphologie. Die Zellen waren nicht mehr schmal und langgezogen sondern rundlich oder polygonal. Auch nach Erreichen von Konfluenz zeigte sich keine Kontaktinhibierung, es bildeten sich an mehreren Stellen kleine Zellhaufen anstelle eines Zell-Monolayers. An diesen Stellen wurde später die höchste Dichte von Calciumphosphat nachgewiesen.

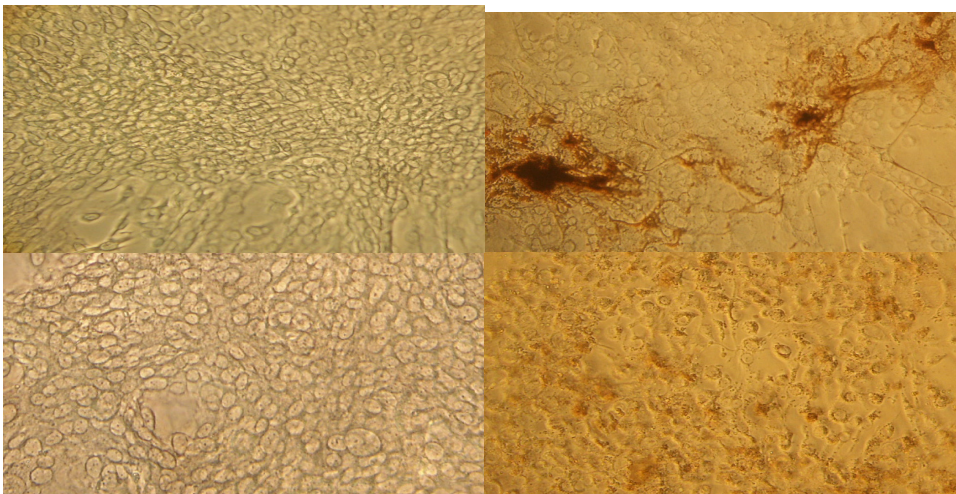


Abb. 17: links: mASCs nach Kultivierung in Kontrollmedium, rechts nach Kultivierung in osteogenem Medium für 4 Wochen

Die mikroskopischen Bilder in Abbildung 17 zeigen beispielhaft die Bildung von mineralisierter Knochenmatrix nach Differenzierungsinduktion mit osteogenem Medium.

Abb. 18 zeigt makroskopische Bilder von mASC nach Kultivierung in osteogenem Medium für 3 bzw. 4 Wochen (obere bzw. untere Reihe). Die mineralisierte Matrix wurde durch Versilberung nach der Methode nach von-Kossa sichtbar gemacht. Man sieht deutlich, dass bei den Zellen in Kontrollmedium keine Bildung von Calciumsalzen nachweisbar war.

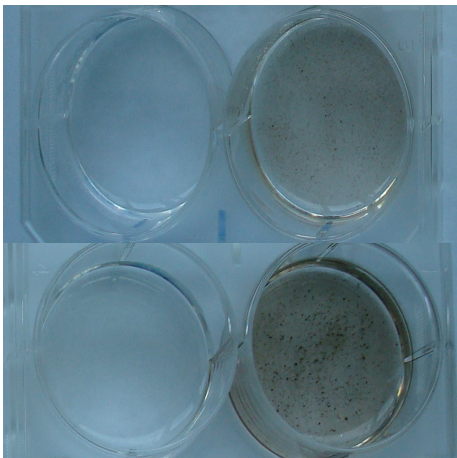


Abb. 18 links: mASCs in Kontrollmedium, rechts in osteogenem Medium, oben nach 3 Wochen, unten nach 4 Wochen, gefärbt nach von-Kossa

Der molekularbiologische Nachweis der osteogenen Differenzierung gelang nur teilweise: Knochen-typische Genprodukte wie Osteopontin und Osteocalcin konnten trotz mehrmaliger Versuche mit Zellen in verschiedenen Passagen und durch Verwenden von Primern mit unterschiedlicher Sequenz bei unterschiedlichen Temperaturen nicht nachgewiesen werden. Das Verschwinden des Stammzellmarkers Wnt-4 konnte nachgewiesen werden.

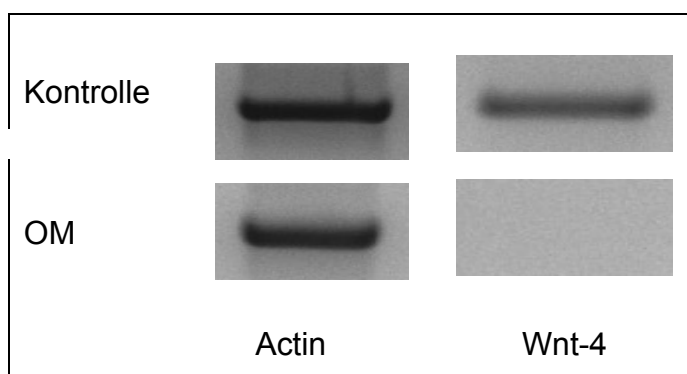


Abb. 19: PCR-Banden von revers transkribierter RNA aus Zellen nach 4 Wochen Kultivierung in oben: Kontrollmedium, unten: mASCs kultiviert in osteogenem Medium (OM)

Es zeigte sich ein deutlicher Unterschied im osteogenen Potential zwischen Zellen aus niedrigen und höheren Passagen: „ältere“ Zellen änderten ihre Morphologie deutlich schneller. Auch die Bildung von mineralisierter Matrix war deutlich höher. Das Gegenteil zeigte sich bei der Differenzierung der mASCs zu Adipozyten (siehe oben).

4.4.2 Chondrogene Differenzierung

In chondrogenem Medium kultivierte Zellen zeigten keine auffallende Änderung ihrer Morphologie gegenüber den Kontrollzellen. Die Färbung mit Alcian-blue Lösung zeigte jedoch eine eindeutige Expression von Glycosaminoglykanen, welche bei den Kontrollzellen nicht nachgewiesen werden konnte.

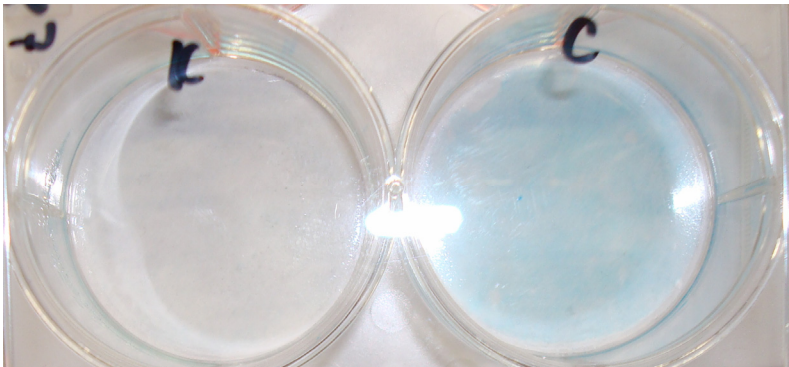


Abb.20 links Schale mit Kontrollzellen, rechts Schale mit Chondrozyten nach Alcian-blue-Färbung

4.5 Unbegrenzte Replikationsfähigkeit

Bei Zellpopulationene aus 5 verschiedenen Zellaufreinigungen konnte durch langes Kultivieren der Zellen nachgewiesen werden, dass sie die Kriterien für eine unsterbliche, also immortale Zelllinie erfüllen: es ließen sich mit Passagenzahl und Splitverhältnis mehr als 100 Populationsverdopplungen errechnen. Eine Zellpopulation wurde über 2 Jahre kultiviert und mehr als 60 mal passagiert.

Die Zellen ließen sich problemlos in flüssigem Stickstoff kryokonservieren und nach einigen Wochen wieder auftauen und in normalem Kulturmedium kultivieren. In höheren Passagen proliferierten die Zellen schneller. Sie wurden bis zu einem Verhältnis von 1:500 gesplittet. Es ließ sich keine Proliferationshemmung nach Konfluenz beobachten. Auch die Morphologie der Zellen veränderte sich. Sie wurden kleiner und nahmen eine runde Form an.

Die Differenzierungsfähigkeit nach Passage 7 war nur für die osteogene Linie noch gegeben, um eine adipogene Differenzierung zu erreichen, mussten mASCs in frühen Passagen verwendet werden.

5. Diskussion

5.1 Zellisolierung und Morphologie

Die Erarbeitung eines Protokolls zur Isolierung von mesenchymalen Stammzellen aus dem Leistenfett von Mäusen gelang problemlos: verschiedene Varianten wurden schon in der Literatur beschrieben (42,48,49,91). Im Unterschied zu den meisten Autoren wurde von uns kein Puffer zur Lyse von Erythrozyten verwendet: die Zellen sollten mit so wenigen Fremdstoffen wie möglich in Kontakt kommen. Aus der Arbeit mit mesenchymalen Stammzellen aus menschlichem Fettgewebe in unserem Labor war bekannt, dass ein solcher Schritt nicht unbedingt notwendig war. Der erste Mediumwechsel erfolgte immer am Tag nach der Isolierung um alle nicht-adhären abgestorbenen Zellen zu entfernen.

Das spindelförmige, fibroblasten-ähnliche Erscheinungsbild der Zellen ist allgemein charakteristisch für mesenchymale Stammzellen, nicht nur für mesenchymale Stammzellen aus Fettgewebe (25,91,99). Die am Anfang sichtbare „Verunreinigung“ mit anderen Zellen (z.B. Endothelzellen, Perizyten, glatte Muskelzellen) stimmt mit den Ergebnissen der Analyse der Oberflächenmarker überein: sie lässt darauf schließen, dass in frühen Passagen tatsächlich nicht nur ASCs in der Kultur vorhanden sind. Nach wenigen Passagen werden die morphologisch anders aussehenden Zellen nicht mehr beobachtet. Auch konnten hämatopoietische Oberflächenantigene nicht weiter nachgewiesen werden.

Ein Vergleich des Proliferationsverhaltens bei Kultivierung der Zellen in DF 10% und Mesencult Medium zeigte keinen Unterschied. Für künftige (Differenzierungs-) Versuche könnte es von Bedeutung sein, ein Medium mit definierter Zusammensetzung zu verwenden, in dem die Zellen nachgewiesenermaßen gut kultivierbar sind.

5.2 FACS-Analyse

Es wurden nur wenige Studien veröffentlicht, in denen die Oberflächenmarkerexpression von Stammzellen aus murinem Fettgewebe untersucht wird (86,91). Die meisten der hier angeführten Studien beziehen sich auf Stammzellen aus humanem Fettgewebe (49,71,90,92,93,94), einige wenige auf mesenchymale Stammzellen aus Knochenmark (25,95,96,97).

Als Marker zur Charakterisierung von mesenchymalen Stammzellen werden folgende Antigene verwendet:

CD 29 bezeichnet die $\beta 1$ -Untereinheit eines Integrins. Integrine bestehen aus einer α - und einer β - Untereinheit (wovon die $\beta 1$ -Untereinheit die verbreitetste ist) und vermitteln verschiedene Zell-Matrix-Interaktionen. In dieser Arbeit konnte eine Expression dieses Markers nachgewiesen werden. In der Literatur gibt es diesbezüglich keine Unstimmigkeiten: alle Quellen berichten über eine Expression von CD 29 auf mesenchymalen Stammzellen (6,49,71,90,91,92,93).

CD 34 ist ein 110 kDa schweres Oberflächenantigen, ein Ligand von L-Selektin, das auf hämatopoietischen Vorläuferzellen und Endothelzellen exprimiert wird. Es spielt wahrscheinlich bei der Migration von Blutzellen eine Rolle. Obwohl dieses Antigen auf mesenchymalen Stammzellen eigentlich nicht vorkommen sollte, waren zumindest in frühen Passagen einige Zellen positiv.

Es existieren Berichte über den Nachweis (92,94), ebenso wie über das Fehlen von CD 34 auf mesenchymalen Stammzellen (6,49,95,96), außerdem über eine sich mit der Zeit verändernde Expression dieses Markers auf der untersuchten Zellpopulation (25,90,93). Die Vermutung liegt nahe, dass vor allem bei mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark CD 34 nachgewiesen werden kann, durch eine höhere Verunreinigung mit hämatopoietischen Stammzellen. Dies bestätigt die Datenlage jedoch nicht.

Weiterhin wird von den meisten Autoren nicht erwähnt, in welcher Passage die Zellen charakterisiert wurden, was die Beurteilung eines Markers, dessen Expression sich mit der Zeit verändert, erschwert.

Nun erhält man, wie eingangs erwähnt, durch die hier angewandte Methode der Isolation keine homogene Zellpopulation. So ist es denkbar, dass einige Endothelzellen aufgrund ihrer ebenfalls vorhandenen Plastikadhärenz nicht gleich beim ersten Mediumwechsel weg gewaschen werden.

Eine weitere Hypothese ist, dass Zellkontakte mit mesenchymalen Stammzellen dazu führen, dass Endothelzellen bei Mediumwechsel nicht weg gewaschen werden, und somit auch in der zweiten und dritten Passage noch nachgewiesen werden können. Diese Annahme wird gestützt durch die Erkenntnis, dass sich die „Nische“ mesenchymaler Stammzellen perivaskulär befindet (25,97).

Ein weiterer Erklärungsversuch geht von einem gemeinsamen Vorläufer von Endothelzellen und reifen Adipozyten aus (93,98).

All dies sind Hypothesen, die die anfängliche Anwesenheit von CD34-positiven Zellen in der von uns isolierten mesenchymalen Zellpopulation erklären können.

CD 44 ist ein Rezeptor für Hyaluronsäure, interagiert jedoch auch mit anderen Liganden wie Kollagen oder Osteopontin. Auch zu diesem Protein gibt es widersprüchliche Berichte, die überwiegende Mehrheit der Autoren aber kann CD 44 auf „ihren“ MSCs nachweisen (6,25,49,90,91,92,93,95). In dieser Arbeit konnte nur eine sehr niedrige Expression nachgewiesen werden.

CD 45 ist eine Protein-Tyrosin-Phosphatase, die von hämatopoietischen Zellen und Lymphozyten exprimiert wird. Sie spielt eine wichtige Rolle im Zellzyklus. CD 45 ist einer der klassischen Marker, um MSCs von hämatopoietischen Stammzellen und ihren Abkömmlingen zu unterscheiden, beziehungsweise um eine Kontamination auszuschließen, weil er auf MSCs nicht vorkommt (6,25,49,90,91,92,96). Auch auf den von uns isolierten Zellen konnte kein CD45 nachgewiesen werden. Dies unterstreicht, dass mit der hier angewandten Methode zur Isolation von MSCs aus Fettgewebe und ihrer Kultivierung eine Kontamination mit hämatopoietischen Stammzellen ausgeschlossen werden kann.

Eine Publikation beschreibt eine niedrige Expression von CD 45, allerdings bezieht sich diese auf MSCs, die aus Knochenmark isoliert wurden. Deshalb sollte, gerade wenn ein hämatopoietischer Marker untersucht wird, kein

Vergleich mit mesenchymalen Stammzellen aus Fettgewebe vorgenommen werden (95).

Der Marker **CD 90**, *thymus cell antigen, Thy*, ist ein etablierter Marker für Stammzellen. Er wird außerdem auf T-Zellen, Thymozyten und Neuronen exprimiert. Seine Funktion ist nicht bekannt. In Mäusen wird er in zwei Isoformen exprimiert, Thy-1.1 und vor allem Thy-1.2, die sich in nur einer Aminosäure unterscheiden. Dieser kleine Unterschied in der Aminosäuresequenz reicht jedoch aus, um bei der Färbung mit dem falschen Antikörper ein falsch-negatives Ergebnis zu induzieren.

Auch die hier untersuchten Zellen exprimieren CD 90 in hohem Maße, besonders in späteren Passagen. Da die Expression so hoch war, wurde die benutzte Antikörper-Konzentration austitriert, um eine eventuelle unspezifische Färbung der Zellen aufgrund einer zu hohen Konzentrationen auszuschließen. Die Ergebnisse blieben bei allen Konzentrationen gleich (außer bei einer sehr niedrigen Konzentration). Damit stimmen sie mit den Veröffentlichungen anderer Autoren überein, die diesen Marker auf MSCs untersuchten oder beurteilten (25,26,49,90,93,95).

Das Stem-cell-antigen-1, **Sca-1**, ist ein Glykoprotein, das auf unreifen Zellen exprimiert wird, aber auch auf T-Zellen, im Hoden, epithelialen Zellen der Niere und Osteoblasten (98).

Die hier untersuchten Zellen zeigten erst in späteren Passagen, ca. ab Passage 10, eine deutliche Expression von Sca-1. Damit zeigen sie das gleiche Verhalten wie die murinen ASCs die Zheng et al. (91) untersuchten.

Die überwiegende Mehrheit der Autoren berichtet über eine Sca-1 Expression auf den von ihnen untersuchten Zellen (95,96,100), einige berichten jedoch auch über Sca-1-negative Populationen (6). Lin et al. beschreiben sogar eine Sca-1-depletierte Population ihrer ASCs, die adipogene und osteogene Eigenschaften zeigt (101). Allerdings wird eine recht ungewöhnliche Methode zur Isolierung der Zellen aus dem Fettgewebe benutzt: Die Autoren legen in kleine Stücke geschnittenes Fettgewebe in Zellkulturgefäße ohne das Fett vorher zu verdauen oder Zellen abzuzentrifugieren. Deshalb ist ein Vergleich der Ergebnisse mit Vorbehalt zu betrachten.

Eine deutliche Expression des grün fluoreszierenden Proteins GFP konnte bis in Passage 22 nachgewiesen werden. Dies ist vor allem bei zukünftigen Versuchen von Bedeutung: in unserem Labor sind Versuche geplant, im Tiermodell die Effekte einer Applikation von mASCs nach Tubulusschädigung in der Niere zu untersuchen. Dazu braucht es eine zuverlässige Methode, um die applizierten Zellen im Versuchstier zu detektieren. Dazu eignet sich das GFP hervorragend, da erstens mASCs aus GFP-transgenen Mäusen vor einer Transplantation nicht markiert werden müssen, zweitens kann es mit geringem Aufwand sichtbar gemacht werden und wird drittens – wie hier gezeigt – konstant exprimiert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Oberflächenmarkerprofil der hier untersuchten Zellpopulation aus murinem Fettgewebe darauf schließen lässt, dass es sich tatsächlich um mesenchymale Stammzellen handelt. Auch wenn murine ASC nur selten auf ihre Oberflächenantigene hin untersucht wurden, kann man aufgrund der hier vorliegenden Ergebnisse und weiterer Ähnlichkeiten davon ausgehen, dass das Expressionsprofil der murinen ASCs dem der besser untersuchten humanen ASCs weitgehend entspricht.

5.3 Differenzierung

Der Nachweis einer Differenzierung zu Adipozyten, Osteozyten und Chondrozyten mittels Stimulierung mit adipogenem, osteogenem oder chondrogenem Medium ist ein wichtiges Kriterium zur Charakterisierung von ASCs.

Dabei tauchten unterschiedliche Probleme auf: Ein wichtiger Punkt war die Zusammensetzung des adipogenen Mediums. In sämtlichen mir zu diesem Zeitpunkt bekannten Versuchen wurde – verglichen mit dem adipogenen Medium, das in unserem Labor zur Differenzierung von humanen ASCs benutzt wurde – eine fast sechs mal so hohe Insulinkonzentration verwendet (48,91,102). Die mASCs gingen in diesem Medium sehr schnell zugrunde. Erst die Verwendung einer geringeren Insulinkonzentration brachte den erwünschten Erfolg. Eine neuere Veröffentlichung beschreibt ebenfalls die

Verwendung einer geringeren Insulinkonzentration (42). Weiterhin kultivierten wir die mASCs anfangs nicht sehr lange, ausgehend von der Idee, dass „junge“, von der Kultur unverfälschte mASCs besser differenzierten als „ältere“. Bei der Differenzierung zu Osteozyten *in vitro* ist aber gerade das Gegenteil der Fall (42, 103).

Nachdem diese Sachverhalte geklärt waren, konnte eine eindeutige Differenzierung der isolierten Zellen zu Adipozyten, Osteozyten und Chondrozyten nachgewiesen werden.

Die Differenzierung zu Adipozyten wurde histochemisch durch Färbung der intrazellulären Lipidvakuolen und mittels Nachweis Fettzellen-spezifischer Genprodukte nachgewiesen. Lipoproteinlipase LPL ist ein membranständiges Protein, das auf Fettzellen, auf Muskel- und Herzzellen exprimiert wird. Es hat zwei Funktionen: erstens fungiert es als Ligand für die Rezeptor-vermittelte Aufnahme von Lipoproteinen, zweitens besitzt es Enzymfunktion zur Hydrolyse von Triglyceriden (104). Peroxysom proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) ist ein Rezeptor im Zellkern, der bei der Differenzierung zu Adipozyten eine Rolle spielt (105). Außerdem konnte eine verminderte Expression von Wingless-type MMTV integration site family 4 (Wnt-4) nachgewiesen werden. Dieses Protein spielt eine Rolle in der Onkogenese und verschiedenen Entwicklungsprozessen, darunter der Zell-Differenzierung während der Embryogenese (106).

Der Nachweis der Differenzierung zu Osteozyten gelang histochemisch einwandfrei, jedoch konnten mit den hier verwendeten Primern, in den nach der beschriebenen Methode isolierten Zellen, mit den von mir angewendeten Methoden keine Knochen-spezifischen Genprodukte nachgewiesen werden. Allerdings wird schon der Differenzierungsnachweis mit einer einzigen Methode als sicher erachtet. Der Nachweis des Verlusts des Stammzellmarkers Wnt-4 weist auf eine Differenzierung der Zellen hin. Die Bildung von Knochensubstanz bei in osteogenem Medium kultivierten Zellen (und einer negativen Kontrolle) beweist, dass diese Differenzierung in Richtung Osteozyten erfolgt ist.

Der Nachweis der Differenzierung zu Chondrozyten erfolgte nur histochemisch. Es wurde die Produktion von Glycosaminoglykanen, einem typischen Knorpelprodukt, nachgewiesen.

5.4 Proliferationskapazität

Ein weiterer Punkt ist die lange Lebensdauer und die enorme Proliferationskapazität der meisten isolierten Zellstämme. Im Hinblick auf eine mögliche Kanzerogenität von Stammzellen wäre es durchaus interessant zu wissen, ob und wann die Zellen tumortypische Abnormalitäten aufweisen.

Es existieren mehrere sich widersprechende Veröffentlichungen: Rubio et al. (107) haben als einzige neben humanen auch murine Stammzellen untersucht. Die Gruppe untersuchte die Morphologie, den Karyotyp, die Telomerase-Aktivität, die VEGF-Synthese und die Angiogenese von mesenchymalen Stammzellen nach Einpflanzen in nicht-immunkompetente Mäuse. Etwa die Hälfte der untersuchten Zellpopulationen zeigte bei den untersuchten Parametern Anomalien. Außerdem konnte eine erhöhte Tumorfrequenz nachwiesen werden.

Bernardo et al. (108) hingegen konnten bei den von ihnen untersuchten mesenchymalen Stammzellen aus Knochenmark bei der Telomerase-Aktivität, Telomerlänge, p53-Sequenz, und dem Karyotyp keine Anomalien beobachten. Die von uns beschriebenen Parameter, also die Veränderungen der Morphologie der ASCs zu einer kleinen, kompakten und runderen Form sowie die lange Überlebensdauer und die extrem hohe Proliferationskapazität scheinen eher die Ergebnisse von Rubio et al. (107) zu bestätigen, allerdings müssten, um genauere Aussagen machen zu können, weitere Untersuchungen gemacht werden.

6. Zusammenfassung

Mesenchymale Stammzellen aus Fettgewebe bieten faszinierende Möglichkeiten hinsichtlich einer zukünftigen therapeutischen Anwendung. Um diese Möglichkeiten genauer zu erkunden, sind noch umfassende Experimente durchzuführen. Die wichtigste Voraussetzung für diese Experimente ist die Etablierung einer verlässlichen Methode zur Isolierung von mesenchymalen Stammzellen aus murinem Fettgewebe (mASCs). Die isolierten Zellen müssen charakterisiert werden und es muss der Nachweis geführt werden, dass die isolierten Zellen *in vitro* in bestimmte Linien differenzieren können. Die Ziele dieser Arbeit waren somit die Etablierung dieser Methode und die Charakterisierung der Zellen. Außerdem wurde die Stabilität der GFP-Expression bei mASCs aus transgenen Mäusen untersucht.

Die Erarbeitung eines Standardprotokolls zur Isolierung und Kultur war erfolgreich. Die kultivierten Zellen zeigten die typische Morphologie von mesenchymalen Stammzellen. Die isolierten Zellen wurden durch ein Oberflächenmarkerprofil charakterisiert. Es wurden die in der Literatur beschriebenen charakteristischen CD-Marker untersucht. Durchflusscytometrisch wurde bei den primär isolierten mASC folgende Oberflächenantigene nachgewiesen: CD29+, CD34+, CD44+, CD45-, CD90+, Sca1+. Im Laufe der Kultivierung reduzierte sich die CD34-Expression stark. Dieses Ereignis ist in der Literatur gut beschrieben. Auch die GFP-Expression wurde im FACS untersucht und zeigte sich stabil bis in hohe Passagen.

Der Nachweis, dass die isolierten Stammzellen ihr beschriebenes *in vitro*-Differenzierungspotential besitzen, wurde durch eine Differenzierung in Adipozyten, Osteozyten und Chondrozyten belegt. Die mASCs wurden für 3 bzw. 4 Wochen in beschriebenen Medien mit adipogenen, osteogenen oder chondrogenen Supplementen kultiviert. Danach wurden die Zellen gefärbt, um histologisch intrazelluläre Lipidvakuolen bei den Adipozyten, extrazelluläre Knochensubstanz bei den Osteozyten und Glycosaminoglycane bei den Chondrozyten nachzuweisen. Durch revers transkribierte RNA und PCR der so erhaltenen cDNA wurde das Fehlen eines typischen „Stammzell-Genprodukts“, Wnt-4, bei den Adipozyten bzw. Osteozyten nachgewiesen, sowie die Expression

von fettspezifischen Genprodukten bei den Adipozyten. Der molekularbiologische Nachweis von knochenspezifischen Genprodukten gelang nicht, die Differenzierung in Osteozyten wurde jedoch durch die histochemische Färbung klar bewiesen.

Ein weiteres Ergebnis ist die beobachtete spontane Immortalisierung bei einigen der isolierten Zellpopulationen. Ein mögliches tumorigenes Potential ist im Hinblick auf die zukünftige therapeutische Anwendung von mASCs von großer Bedeutung und bedarf weitere Untersuchungen *in vitro* und *in vivo*.

Ausblick:

Die etablierten mASCs sollen in einem Tierversuch zur Nierenregeneration nach Cisplatin-induzierter akuter Tubulusschädigung zur Anwendung kommen. Es wäre der erste Versuch, in dem murine mesenchymale Stammzellen aus Fettgewebe zur Unterstützung der Nierenregeneration bei Mäusen untersucht werden. Eine Unterstützung der Reparaturvorgänge durch Applikation der optimalen Menge von mASCs zum richtigen Zeitpunkt sowie die Einwanderung von mASCs in die Niere sollen nachgewiesen werden.

Nach der induzierten Schädigung werden den Tieren mASCs appliziert, während die Kontrolltiere nur Pufferlösung ohne Stammzellen erhalten. Die Regeneration wird mithilfe der Serumkreatinin-Konzentration im Blut sowie mit histologischen Methoden an Nierenschnitten beurteilt werden.

Auch das *in vitro*-Modell soll weitergeführt werden, um weitere Erkenntnisse zu den Mechanismen der Stammzellendifferenzierung zu erhalten. Vor allem soll eine mögliche Differenzierung von mASCs zu Nierenepithelzellen erforscht werden. Dazu werden die Effekte von renotrophen Faktoren, Wachstumsfaktoren und konditionierten Medien untersucht. Ein Artikel zur Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen in Richtung der epithelialen Linie wurde von unserer Arbeitsgruppe bereits publiziert (45).

6a. Abstract

Mesenchymal stem cells from fat provide various possibilities concerning therapeutic application. To specify these possibilities, numerous experiments are still needed. Regarding these experiments, preparatory work is to be done: a reliable method for isolation of mesenchymal stem cells from murine fat has to be established. The isolated cells must be characterized and differentiation of the cells has to be proved. These were the aims of the dissertation. Beside, we analyzed the stability of GFP-Expression of mASCs obtained from transgenic mice.

The development of a protocol of isolation and cultivation was effective. The cells showed the typical morphology of mesenchymal stem cells.

The cells were characterized by a pattern of surface antigens. We analyzed typical CD- antigens well known in literature by flow cytometry. The following antigens were detected on mASCs: CD29+, CD34+, CD44+, CD45-, CD90+, Sca-1+. As the cells got older, a substantial decrease of the CD34-expression was observed. This incident is well described by other authors. The GFP-Expression appeared stable up to high passages.

The differentiation potential of the isolated cells was shown by the differentiation in adipocytes, osteocytes and chondrocytes. mASCs were cultivated for 3 and 4 weeks in medium with adipogenic, osteogenic and chondrogenic supplements. The cells were stained to show intracellular fat vacuoles in adipocytes, extracellular bone mass around osteocytes and sulphated proteoglycans around chondrocytes. Furthermore, RNA was isolated from the differentiated cells. By reverse transcription and PCR, we could show the loss of a typical stem cell product, Wnt-4 in adipocytes and osteocytes. We confirmed the expression of fat-specific gene products in adipocytes. Confirmation of the expression of bone-specific gene products failed. But the differentiation of osteocytes was verified by histochemical staining.

Another result was the spontaneous immortalization of some of the isolated cell populations. The risk of tumor formation is -regarding therapeutic application of mASCs- of big interest and needs further investigation.

Future prospects:

The role of the mASCs during organ regeneration must be investigated in an in vivo system. After impairment of the tubular system of the kidney of mice by Cisplatin, we want to prove that the application of mASCs supports improvement of kidney function as well as the immigration of mASCs in the kidney. This would be the first experiment to investigate the role of murine mesenchymal stem cells in renal regeneration of mice.

The mASCs will be applied intravenously, whereas control animals will get saline solution without stem cells. The regeneration will be checked by the creatinine concentration in blood as well as by histological preparation of the kidney.

Furthermore, we will continue to cultivate stem cells to explore the mechanisms of stem cell differentiation. We particularly want to determine a possible differentiation to kidney epithelial cells. For this purpose we will analyse the effects of renotroph factors, growth factors and conditioned media.

A paper concerning differentiation of mesenchymal stem cells to an epithelial cell line was already published (45).

7. Literaturverzeichnis

- 1) Nowell PC, Cole LJ, Habermeyer JG, Roan PL: „Growth and continued function of rat marrow cells in x-radiated mice“ Cancer Res 1956, 16(3): 258-261
- 2) Bortin MM: “A compendium of reported human bone marrow transplants” Transplantation 1970, 9(6): 571-87
- 3) <http://stemcells.nih.gov/info/basics/basics2.asp>
- 4) Brook FA, Gardner, RL: „The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse“ Proc Nat Acad Sci USA, May 1997; 94 (11): 5709-12
- 5) Alison MR, Islam S: “Attributes of adult stem cells” J Pathol Jan. 2009: 217 (2): 144-60
- 6) Kolf C, Cho E, Tuan RS: “Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation” Arthritis Res. Ther. 2007; 9(1): 204.
- 7) Blanco-Bose WE, Yao CC, Kramer RH, Blau HM: “Purification of Mouse primary myoblasts based on alpha-7-integrin expression” Exp Cell Res 2001; 265:212-220
- 8) Alessandri G, Pagano S, Bez A et al.: “Isolation and culture of human muscle-derived stem cells able to differentiate into myogenic and neurogenic cell lineages” Lancet 2004; 364: 1872-1883
- 9) Nakauchi H et al.: “Isolation and clonal characterization of hematopoietic and liver stem cells” Cornea 2004; 23:52-57
- 10) Faris RA, Konkin T: “Liver stem cells: a potential source of hepatocytes for the treatment of human liver disease” Artif Organs 2001; 25: 513-521

- 11) Vessey CJ, de la Hall PM: "Hepatic stem cells: a review" *Pathology* 2001; 33: 130-141
- 12) Dekaney CM, Rodriguez JM: "Isolation and Characterization of a putative intestinal stem cell fraction from mouse jejunum" *Gastroenterology* 2005; 129: 1567-1580
- 13) Gage FH: "Mammalian neural stem cells", *Science* 2000; 287: 1433-1438
- 14) Corti S, Locatelli F, Papadimitriou D, Donadoni C, Salani S, Del Bo R et al.: "Identification of a primitive brain-derived neural stem cell population based on aldehyde dehydrogenase activity" *Stem Cell* 2006; 24: 975-985
- 15) Lemoli RM, Bertolini F, Cancedda R, De Luca M, Del Santo A, Ferrari G, Ferrari S, Martino G, Mavillio F, Tura S: "Stem cell plasticity: time for a reappraisal?" *Haematologica* 2005; 90(3): 360-381
- 16) 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: "Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells *in vitro*" *Exp Neurol* 2000; 164: 247-256
- 17) Wagers AJ, Weissman IL: "Plasticity of adult stem cells" *Cell* 116: 639-648
- 18) Friedensten AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS: "The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells" *Cell Tissue Kinet* 1970; 3: 393-403
- 19) Kuwaja MJ, Lennon DP, Caplan AL: "Growth and differentiation of stage 24 limb mesenchyme cells in a serum-free chemically defined medium" *Exp Cell Res* 1989; 183(1): 45-61
- 20) Caplan AL: "Mesenchymal stem cells" *J Orthop Res* 1991; 9(5): 641-650

- 21) De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP: "Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane" *Arthritis Rheum.* 2001; 44(8): 1928-1942
- 22) Seo BM, Miura M, Gronthos S et al.: "Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament" *Lancet* 2004; 364: 149-155
- 23) Shi S, Gronthos S: "Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp" *J Bone Miner. Res.* 2003; 18, 696-704
- 24) Biback K, Klüter H: "Mesenchymal stromal cells from umbilical cord blood" *Curr Stem Cell Res Ther* 2007; 2(4): 310-323
- 25) da Silva-Mereilles L, Chagastelles PC, Nardi NB: "Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues" *J Cell Sci* 2006; 119: 2204-2213
- 26) Dominici M, Le Blanc K, Mueller I et al.: "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement" *Cytotherapie* 2006; 8: 315-317
- 27) Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortessidis A, Simmons PJ: "Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow" *J Cell Sci* 2003; 116(Pt9): 1827-1835
- 28) Kassem M, Kristansen M, Abdallah BM: "Mesenchymal Stem Cells: Cell Biology and Potential Use in Therapy" *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2004; 95(5): 209-214
- 29) Griesche N, Luttmann W, Luttmann A, Stammermann T, Geiger H, Baer PC: "A Simple Modification of the Separation Method Reduces Heterogeneity of Adipose-Derived Stem Cells" *Cell Tiss Org* 2010

30) Jones E, McGonagle D: "Human bone marrow mesenchymal stem cells in vivo" *Rheumatology* 2008; 47(2): 126-131

31) Sera Y, LaRue AC, Moussa O: "Hematopoietic stem cells origin of adipocytes" *Exp Hematol* 2009; 37(9): 1108-1120

32) Bunting KD: "ABC Transporters as phenotypic markers and functional regulators of stem cells" *Stem Cell* 2002; 20: 11-20

33) Christ O, Lucke K, Imre S, Leung K, Hamilton M, Eaves A et al.: "Improved purification of hematopoietic stem cells based on their elevated level of aldehyde dehydrogenase activity" *Haematologica* 2007; 92: 1162-1172

34) Romanko MJ, Rothstein RP, Levison SW: "Neural stem cells in the subventricular zone are resilient to hypoxia/ischemia whereas progenitors are vulnerable" *J Cereb Blood Flow Metab* 2004; 24 (7): 814-825

35) Grayson WL, Zhao F, Izadpanah R, Bunnell B, Ma T: "Effects of hypoxia on human mesenchymal stem cell expansion and plasticity in 3D constructs" *J Cell Physiol* 2006; 207: 331-339

36) Le Blanc K, Tamic C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringdén O: "HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells" *Exp Hematol* 2003; 31(10): 890-896

37) Le Blanc K: "Mesenchymal stromal cells: Tissue repair and immune modulation" *Cytotherapy* 2006; 8(6): 559-561

38) Ramasamy R, Tong CK, Seow HF, Vidyadaran S, Dazzi F: "The immunosuppressive effects of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells target T cell proliferation but not its effector function" *Cell Immunol* 2008; 251(2): 131-136

- 39) Deslex S, Negrel F, Vannier C et al.: "Differentiation of human adipocyte precursors in a chemically defined serum-free medium" *Int J Obes* 1986; 10: 19-27
- 40) Hauner H, Entenmann G, Wabitsch M et al.: „Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium" *J Clin Invest* 1989; 84: 1663-1670
- 41) Zuk PA; Zhu M, Mizuno H et al.: "Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies." *Tissue Eng* 2001; 7(2): 211-228
- 42) Shi YY, Nacamuli RP, Salim A, Longaker MT: "The osteogenic Potential of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells is Maintained with Aging" *Plast Reconstr Surg* 2005; 116: 1686-1696
- 43) Schäffler A, Büchler C: "Concise review: Adipose tissue-derived stromal cells – Basic Clinical Implications for Novel Cell-Based Therapies" *Stem Cells* 2007; 25 818-827
- 44) Cao Y, Sun Z, Liao L et al.: " Human adipose tissue derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo" *Biochem Biophys Res Comm* 2005; 332: 370-379
- 45) Brzoska M, Gauer S, Geiger H, Baer PC: "Epithelial differentiation of human adipose tissue-derived stem cells" *Biochem Biophys Res Comm* 2005; 330: 142-150
- 46) Baer PC, Bereiter-Hahn J, Missler C, Brzoska M, Schubert R, Gauer S, Geiger H: "Conditioned medium from renal tubular epithelial cells initiates differentiation of human mesenchymal stem cells" *Cell Prolif* 2009; 42, 29-37
- 47) Hattori H, Sato M, Masuoka K et al.: "Osteogenic potential of human adipose-tissue derived stromal cells as an alternative stem cell source" *Cells Tissues Organs* 2004; 178: 2-12

48) Lin Y, Chen X, Yan Z, Liu L, Tang W, Zheng X, Li Z, Qiao J, Li S, Tian W: "Multilineage differentiation of adipose-derived stromal cells from GFP transgenic mice" *Mol Cell Biochem* 2006; 285 (1-2): 69-78

49) Zuk PA, Zhu M, Ashjian P et al.: "Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells" *Mol Biol Cell* 2002; 13: 4279-4295

50) Halvorsen YDC, Franklin DM, Bond AL et al.: „ Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose-derived stromal cells" *Tissue Eng* 2001; 7: 729-741

51) Planat-Bénard V, Menard C, André M, Puceat M, Perez A, Garcia-Verdugo JM, Pénicaud L, Casteilla L: "Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stromal cells" *Circ Res* 2004; 94(2): 223-229

52) Kang SK, Lee DH, Bae YC et al.: „Improvement of neurological deficits by intracerebral transplantation of human adipose tissue-derived stromal cells after cerebral ischemia in rats" *Exp Neurol* 2003;183:355–366

53) Timper K, Seboek D, Eberhardt M et al.: „Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells." *Biochem Biophys Res Commun* 2006;341: 1135–1140.

54) Seo MJ, Suh SY, Bae YC et al. : "Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo." *Biochem Biophys Res Commun* 2005;328:258 –264.

55) Rosen ED.: "The molecular control of adipogenesis, with special reference to lymphatic pathology" *Ann N Y Acad Sci* 2002; 979:143–158; discussion 188–96.

56) Lane MD, Tang QQ.: "From multipotent stem cell to adipocyte. Birth Defects"

Res A Clin Mol Teratol 2005; 73:476–477.

57) Brand-Saberi B.: “Genetic and epigenetic control of skeletal muscle development” Ann Anat 2005;187:199 –207.

58) Tajbakhsh S.: “Skeletal muscle stem and progenitor cells: Reconciling genetics and lineage” Exp Cell Res 2005;306:364 –372.

59) Otto WR, Rao J.: “Tomorrow’s skeleton staff: Mesenchymal stem cells and the repair of bone and cartilage” Cell Prolif 2004; 37:97–110.

60) Lian JB, Javed A, Zaidi SK et al.: “Regulatory controls for osteoblast growth and differentiation: Role of Runx/Cbfa/AML factors. Crit Rev Eukaryot Gene Expr 2004;14:1– 41

61) Tjabringa GS, Vezeridis PS, Zandieh-Doulabi B et al.: “Polyamines modulate nitric oxide production and COX-2 gene expression in response to mechanical loading in human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells” stem cells 2006;24:2262–2269.

62) Dicker A, Le Blanc K, Astrom G et al.: “Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue” Exp Cell Res 2005; 308:283–290

63) Kern S, Eichler H, Stoeve J et al.: „Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord or adipose tissue“ Stem cells 2006, 24: 1294-1301

64) Hui JH, Li L, Teo YH et al.: “Comparative study of the ability of mesenchymal stem cells derived from bone marrow, periosteum, and adipose tissue in treatment of partial growth arrest in rabbit” Tissue Eng 2005;11:904 – 912

- 65) Hong L, Peptan IA, Colpan A, Daw JL: "Adipose tissue engineering by human adipose-derived stromal cells" *Cells Tissues Organs* 2006; 183(3): 133-140
- 66) Choi YS, Cha SM, Lee YY, Kwon SW, Park CJ, Kim M: "Adipogenic differentiation of adipose tissue derived adult stem cells in nude mouse" *Biochem Biophys Res Comm* 2006; 345: 631-637
- 67) Mizuno H, Itoi Y, Kawahara S, Ogawa R, Akaishi S, Hyakusoku H: " *In vivo* adipose tissue regeneration by adipose-derived stromal cells isolated from GFP transgenic mice" *Cells Tissues Organs* 2008; 187: 177-185
- 68) Nambu M, Kishimoto S, Nakamura S et al.: "Accelerate wound healing in healing-impaired *db/db* mice by autologous adipose-tissue derived stromal cells combined with atelocollagen matrix" *Ann Plast Surg* 2009; 62: 317-321
- 69) Dragoo JL, Carlson G, McCormick F, Khan-Farooqi H, Zhu M, Zuk PA, Benhaim P: "Healing full-thickness cartilage defects using adipose-derived stem cells" *Tissue Eng* 2007; 13(7): 1615-1621
- 70) Masuoka K, Asazuma T, Hattori H et al.: „Tissue engineering of articular cartilage with autologous cultured adipose-derived stromal cells using atelocollagen honeycomb scaffold with a membrane sealing in rabbits" *J Biomed Mater Res B* 2006; 79: 25-34
- 71) Tapp H, Hanley EN, Patt JC, Gruber HE: "Adipose-Derived Stem Cells: Characterization and Current Application in Orthopaedic Tissue Repair" *Exp Biol Med* 2009; 234(1): 1-9
- 72) Hicok KC, Du Laney TV, Zhou YS, Halvorsen YDC, Hitt DC, Cooper LF, Gimble JM.: "Human adipose-derived adult stem cells produce osteoid *in vivo*" *Tissue Eng* 2004; 10:371–380

73) Hattori H, Sato M, Masuoka K, Ishihara M, Kikuchi T, Matsui T, Takase B, Ishizuka T, Kikuchi M, Fujikawa K, Ishihara M: "Osteogenic potential of human adipose tissue-derived stromal cells as an alternative stem cell source" *Cells Tissues Organs* 2004; 178:2–12

74) Hattori H, Masuoka K, Sato M, Ishihara M, Asazuma T, Takase B, Kikuchi M, Nemoto K, Ishihara M: "Bone formation using human adipose tissue-derived stromal cells and a biodegradable scaffold" *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2006; 76:230–239

75) Dudas JR, Marra KG, Cooper GM, Penascino VM, Mooney MP, Jiang S, Rubin JP, Losee JE: "The osteogenic potential of adipose-derived stem cells for the repair of rabbit calvarial defects" *Ann Plast Surg* 2006; 56: 543–548

76) Strem BM, Zhu M, Alfonso Z, Daniels EJ, Schreiber R, Beygui R, MacLellan WR, Hedrick MH, Fraser JK: "Expression of cardiomyocytic markers on adipose tissue-derived cells in a murine model of acute myocardial injury" *Cytotherapy* 2005; 7: 282–291

77) Yamada Y, Wang XD, Yokoyama S, Fukuda N, Takakura N: "Cardiac progenitor cells in brown adipose tissue repaired damaged myocardium" *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 342: 662– 670.

78) Lu F, Mizuno H, Uysal AC, Cai X, Ogawa R, Hyakusoku H: "Improved viability of random pattern skin flaps through the use of adipose-derived stem cells" *Plast Reconstr Surg* 2008; 121: 50-58

79) Moon MH, Kim SY, Kim YJ et al.: "Human adipose-tissue derived mesenchymal stem cells improve postnatal neovascularization in a mouse model of hindlimb ischemia" *Cell Physiol Biochem* 2006; 17: 279-290

80) Cao Y, Sun Z, Liao L, Meng Y, Han Q, Zhao RC: "Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve

postnatal neovascularization in vivo” *Biochem Biophys Res Comm* 2005; 323(2): 370-379

81) Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y: “Extraction, purification and properties of Aequorin, a bioluminescent protein from luminous hydromedusan, *Aequorea*” *J Cell Comp Physiol* 1962 Jun; 59: 223-39

82) http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008/press.html

83) Huls M, Russel FGM, Masereeuw R: “ Insights to the role of bone marrow-derived stem cells in renal repair” *Kidn Blood Press Res* 2008; 31:104-110

84) Kale S, Karihaloo A, Clark PR et al.: “Bone marrow stem cells contribute to renal repair of the ischemically injured renal tubule “ *J Clin Invest* 2003; 112: 42-49

85) Duffield JS, Bonventre JD: “Kidney tubular epithelium is restored without replacement with bone marrow-derived cells during repair after ischemic injury” *Kidney Int* 2005; 68: 1956-1961

86) Lin F, Moran A, Igarashi P: “Intrarenal cells, not bone marrow-derived cells, are the major source for regeneration in in postischemic kidney” *J Clin Invest* 2005; 115: 1756-1764

87) Morigi M, Imberti B, Zoja C et al.: Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure” *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 1794-1804

88) Li K, Han Q, Yan X, Liao L, Zhao RC: “ Not a process od simple vicariousness, the differentiation of human adipose-derives mesenchymal stem cells to renal tubular epithelial cells plays an important role in acute kidney injury repairing.” *Stem Cells Dev* 2010; 19(8): 1267-75

- 89) Chomczynski P, Sacchi N: "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." *Anal Biochem* 1987; 162 (1): 156-159
- 90) Locke M, Windsor J, Dunbar PR: "Human adipose-derived stem cells: isolation, characterization and applications in surgery" *ANZ J Surg* 2009; 79: 235-244
- 91) Zheng B, Cao B, Li G, Huard J: "Mouse Adipose-Derived Stem Cells Undergo Multilineage Differentiation *in Vitro* but Primarily Osteogenic and Chondrogenic Differentiation *in Vivo*" *Tissue Eng* 2006 Jul; 12 (7): 1891-1901
- 92) Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM: "Surface Protein Characterization of Human Adipose Tissue-Derived Stromal Cells" *J Cell Physiol* 2001; 189: 54-61
- 93) Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Floyd ZE, Kloster A, Di Halvorson Y, Storms RW, Goh B, Kilroy G, Wu X, Gimble JM: "Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers." *Stem Cells* 2006; 24 (2): 376-385
- 94) Festy F, Hoareau L, Bes-Houtmann S et al.: " Surface protein expression between human adipose tissue-derived stromal cells and mature adipocytes" *Histochem Cell Biol* 2005; 124: 113-121
- 95) Eslaminejad MB, Nadri S, Hosseini RH: "Expression of Thy 1.2 surface antigen increases significantly during the murine mesenchymal stem cell cultivation period" *Develop Growth Differ* 2007; 49, 351-364
- 96) Ripoll CB, Bunnell BA: "Comparative characterization of mesenchymal stem cells from eGFP transgenic and non-transgenic mice" *BMC Cell Biol* 2009; 13: 10(3)

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

98) Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, Andre M, Nibbelink M, Tamarat R, Clergue M, Manneville C, Saillan-Barreau C, Duriez M, Tedgui A, Levy B, Penicaud L, Casteilla L: "Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives." *Circulation* 2004; 109:656–663

99) Musina RA, Bekchanova ES, Sukhikh GT: "Comparison of Mesenchymal Stem Cells Obtained from Different Human Tissues" *Bull Exp Biol Med* 2005; 139(4): 504-9

100) Hachisuka H, Mochizuki Y, Yasunaga Y, Natsu K, Sharman P, Shinomiya R, Ochi M: "Flow cytometric discrimination of mesenchymal progenitor cells from bone marrow-adherent cell populations using CD34/44/45(-) and Sca-1(+) markers" *J Orthop Sci* 2007; 12:161-169

101) Lin YF, Jing W, Wu L, Li XY, Wu Y, Liu L, Tang W, Long J, Tian WD, Mo XM: "Identification of osteo-adipo progenitor cells in fat tissue" *Cell Prolif* 2008; 41, 803-812

102) Ogawa R, Mizuno H, Watanabe A, Migita M, Hyakusoku H, Shimada T: "Adiogenic differentiation by adipose-derived stem cells harvested from GFP-transgenic mice including relationship of sex differences" *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 319 (2), 511-517

103) Wagner W, Horn P, Castoldi M, Diehlmann A, Bork S, Saffrich R, Benes V, Blake J, Pfister S, Eckstein V, Ho AD: "Replicative Senescence of Mesenchymal Stem Cells: A Continuous and Organized Process" *PLoS One* 2008; 3(5): e2213

104) http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4023?ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene_ResultsPanel.Gene_RVDocSum

105) http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5468?ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene_ResultsPanel.Gene_RVDocSum

106) http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/54361?ordinalpos=2&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene_ResultsPanel.Gene_RVDocSum

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

108) Bernardo ME, Zaffaroni N, Novara F, Cometa AM, Avanzini MA, Moretta A, Montagna D, Maccario R, Villa R, Daidone MG, Zuffardi O, Locatelli F: "Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Do Not Undergo Transformation after Long-term *In vitro* Culture and Do Not Exhibit Telomere Maintenance Mechanisms" *Cancer Res* 2007; 67: (19)

8. Abbildungsverzeichnis:

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

Abb. 2: Gilbert SF, Sunderland (MA): "Developmental Biology. 6th Edition"
Sinauer Associates; 2000.
Copyright ©2000, Sinauer Associates.

Abb. 3: MR Alison et al.: " Attributes of adult stem cells" J Pathol 2009; 217:
144-160

Abb. 4: Pountos I, Giannoudis PV: "Biology of mesenchymal stem cells" Injury
2005; 36 Suppl. 3 S8-S12

Lebenslauf

| | |
|-------------------------|--|
| Name | Stephanie Peter |
| Adresse | Wiesenhüttenplatz 39 60329 Frankfurt am Main |
| Geburtsdatum | 10.06.1985 in Offenburg |
| Familienstand | Ledig |
| 1991-1995 | Besuch der Hebelschule in Kehl |
| 1995-2004 | Besuch des Einstein-Gymnasiums in Kehl |
| Juli 2004 | Abitur |
| Oktober 2004 | Beginn des Studiums an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main |
| September 2006 | Physikum |
| 22.02.2010 – 22.01.2011 | Praktisches Jahr in der Schweiz, in Frankreich und in Deutschland |
| Mai 2011 | |

Frankfurt am Main, den

Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

Isolierung und Charaktisierung muriner mesenchymaler Stammzellen aus
Fettgewebe

in dem Zentrum für Innere Medizin III, Funktionsbereich Nephrologie unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. Helmut Geiger mit Unterstützung durch PD Dr. Patrick Baer ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt habe und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Frankfurt, den

Danksagung

Zuerst möchte ich mich Herrn PD Dr. Patrick Baer für die weltbeste Betreuung bedanken. Ich hätte mir keine bessere wünschen können.

Außerdem bei Frau Michaela Plößer, die mir beibrachte, in einem Labor zu arbeiten und wirklich immer für mich da war.

Nicht zuletzt natürlich meiner Familie und meinem Freund, die mir alle immer wieder freundlich in den Hintern getreten haben, wenn es einmal nötig war.