

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

betreut am
Zentrum der Inneren Medizin
Klinik für Innere Medizin III – Funktionsbereich Nephrologie
Leiter: Prof. Dr. Helmut Geiger

**Epitheliale Differenzierung mesenchymaler Stammzellen aus
humanem perirenal Fettgewebe**

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

vorgelegt von
Elena Sophie Hickmann

aus Kassel

Frankfurt am Main, 2015

Dekan:	Prof. Dr. Josef Pfeilschifter
Referent:	Prof. Dr. Patrick C. Baer
Korreferent/in:	Prof. Dr. Stefan Zielen
Tag der mündlichen Prüfung:	25.07.2016

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	X
1 Einleitung.....	1
1.1 Stammzellen	1
1.2 Mesenchymale Stammzellen und Besonderheiten von ASC	2
1.3 Die Stammzellnische	7
1.4 Epithelzellen	9
1.5 Regeneration von Nierenschädigungen und regenerative Medizin	10
1.6 Fragestellung und Ziele der Arbeit.....	11
2 Material.....	12
2.1 Geräte	12
2.2 Verbrauchsmaterialien.....	13
2.3 Chemikalien	14
2.4 Medien und Mediensupplemente.....	16
2.5 Material für Molekularbiologie.....	17
2.6 Antikörper.....	17
2.6.1 Primärantikörper	17
2.6.2 Sekundärantikörper.....	18
2.7 Primer	18
3 Methoden.....	19
3.1 Zellkultur.....	19
3.1.1 Kulturmedien.....	19
3.1.2 Materialien	19
3.1.3 Herkunft der Zellen	19
3.1.4 Isolierung von Stammzellen aus Fettgewebe	20
3.1.5 Zellzahlbestimmung mit Trypanblau.....	21
3.1.6 Kultivierung humaner mesenchymaler Stammzellen.....	21
3.1.7 Umsetzen der Zellen.....	21
3.2 Zellcharakterisierung	22
3.2.1 Durchflusszytometrie	22
3.2.2 Immunfluoreszenz.....	24
3.3 Zellstimulation mit supplementierten Medien	25

3.3.1 Adipogene, osteogene und chondrogene Differenzierung.....	25
3.3.2 Epitheliale Differenzierung	26
3.4 Nachweismethoden.....	27
3.4.1 Nachweis durch Anfärben	27
3.4.2 Nachweis durch Immunfluoreszenz.....	29
3.4.3 Proteinnachweis durch Western Blot.....	29
3.4.4 RNA-Nachweis durch qPCR	35
4 Ergebnisse.....	39
4.1 Ergebnisse der Zellzahlbestimmung.....	39
4.2 Morphologie der Zellen.....	39
4.3 Ergebnisse der Zellcharakterisierung	40
4.3.1 Durchflusszytometrie	40
4.3.2 Immunfluoreszenz.....	43
4.4 Einfluss von supplementierten Medien	44
4.4.1 Ergebnisse adipogener, osteogener und chondrogener Differenzierung	44
4.4.2 Epitheliale Differenzierung	49
5 Diskussion	53
5.1 Isolation, Morphologie und Charakterisierung von prASC.....	53
5.2 Epitheliale Differenzierung von prASC durch ATRA-haltiges Medium.....	55
6 Zusammenfassung	59
7 Abstract	60
Literaturverzeichnis.....	61
Lebenslauf	
Schriftliche Erklärung.....	
Danksagung	

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC	ATP binding cassette
ActA	Aktivin A
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASC	Adipose-derived stem cells (Stammzellen aus Fettgewebe)
ATP	Adenosintriphosphat
ATRA	All-trans-Retinolsäure
bFGF	Basischer Fibroblasten Wachstumsfaktor
BM-MSC	bone marrow-derived MSC (MSC des Knochenmarks)
BMP	Bone morphogenetic protein
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
β-ME	β-Mercaptoethanol
CD	Cluster of differentiation
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CK18	Zytokeratin 18
c-Kit	Tyrosinkinase KIT
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
Col IV	Kollagen IV
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol Dihydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DF	DMEM mit FCS
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribunukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal growth factor (Epidermaler Wachstumsfaktor)
ES	Embryonale Stammzellen
FACS	Durchflusszytometrie (fluorescence activated cell sorter)

FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FGF	Fibroblasten Wachstumsfaktor
FSC	forward scatter (Durchflusszytometrie)
<i>g</i>	Beschleunigung (9,81 m/s ²)
°C	Grad Celsius
h	Stunde
dH ₂ O	destilliertes Wasser
hES	Humane embryonale Stammzellen
HGF	Hepatocyte Growth Factor (Hepatozyten-Wachstumsfaktor)
HIF	Hypoxia-Inducible transcription Factor
HLA	Humanes Leukozytenantigen
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IFN	Interferon
IL	Interleukin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KGU	Klinikum der Goethe-Universität, Frankfurt
L	Liter
Lin	Lineage-Marker
M	Mol
mA	Milliamper
mAb	Monoklonaler Antikörper
mg	Miligramm
MgCl	Magnesiumchlorid
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
µm	Mikrometer
MSC	Mesenchymal stem cells (Mesenchymale Stammzellen)

MyD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NEM	N-Ethylmaleimide
Pan-CK	Pan-Zytokeratin
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Chain-Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
prASC	Stammzellen aus perirenalem Fettgewebe
qPCR	qualitative PCR
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
sec	Sekunde
smA	smooth muscle actin (Glattmuskuläres Aktin)
SDS	Sodium dodecyl sulfat (Natriumdodecylsulfat)
SSC	sideward scatter (in der Durchflusszytometrie)
STRO-1	Stromal precursor antigen-1
StM	Standardmedium
Tab.	Tabelle
TEC	Tubulusepithelzellen
TGF-β	Transforming growth factor beta (Transformierender Wachstumsfaktor beta)
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TNF	tumor necrosis factor (Tumornekrosefaktor)
TSG-6	Tumor necrosis factor-inducible gene 6 (Tumornekrosefaktor induzierendes Gen 6)
V	Volt
vWF	Von Willebrand Faktor
VEGF	Vascular endothelial growth factor

wnt-4 wingless-type MMTV integration site family 4
ZO Zonula occludens

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Eigenschaften von MSC und ihre Funktion in vivo und in vitro	3
Abb. 2 Differenzierungspotential von MSC (Auswahl)	4
Abb. 3 Kreislauf der MSC im Organismus.....	8
Abb. 4 Charakteristisches Bild undifferenzierter prASC der Passage P1	39
Abb. 5 Endotheliale und adipozytäre Morphologie der kultivierten Zellen.....	40
Abb. 6 Durchflusszytometrie: Eingeschlossene Zellen	41
Abb. 7 Durchflusszytometrie: Expression der Oberflächenantigene der Passage P1 ..	42
Abb. 8 Durchflusszytometrie: Expression der Oberflächenantigene der Passage P4 ..	43
Abb. 9 Immunfluoreszenzfärbung der Passage P0	44
Abb. 10 6-Loch-Platte mit prASC nach der Färbung	45
Abb. 11 Oil-Red-O-Färbung nach adipogener Differenzierung.....	46
Abb. 12 Alizarin Red Färbung nach osteogener Differenzierung.....	47
Abb. 13 Alcian Blue Färbung nach chondrogener Differenzierung	47
Abb. 14 Synovialfibroblasten K4IM nach cytochemischer Färbung	48
Abb. 15 Mikroskopische Ansicht der Synovialfibroblasten K4IM nach der Färbung.....	49
Abb. 16 CK18 positive Zelle nach Kultur	50
Abb. 17 Auswahl charakteristischer Western Blots nach Kultur	50
Abb. 18 Densitometrische Auswertung der Western Blots	51
Abb. 19 Auswertung qPCR von prASC nach Kultivierung mit ATRA und GFmix.....	52

Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Positive und negative Marker und Gene für ASC nach Schäffler und Bächler....	6
Tab. 2 Differenzierung von MSC in Abhängigkeit von Mediensupplementen	6
Tab. 3 Antikörper für die Durchflusszytometrie.....	23
Tab. 4 Antikörper für die Immunfluoreszenz (1)	25
Tab. 5 Medien und Mediensupplemente für die epitheliale Differenzierung.....	27
Tab. 6 Antikörper für die Immunfluoreszenz (2)	29
Tab. 7 Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel.....	32
Tab. 8 Antikörper für den Western Blot	34
Tab. 9 Lösungen für die Reverse Transkription.....	37
Tab. 10 CK18 Expression von prASC in Abhängigkeit vom Medium (DF10; ATRA)	51

1 Einleitung

1.1 Stammzellen

Stammzellen sind undifferenzierte Zellen mit der Fähigkeit zu differenzieren und sich selbst zu erneuern. Die Tochterzellen, die bei der Zellteilung hervorgehen, können beide als Stammzellen im Stammzellpool verbleiben (self-renewal). Eine weitere Möglichkeit ist die asymmetrische Zellteilung, aus der eine Tochterzelle zur weiteren Differenzierung und ein Replikat der Stammzelle hervorgehen [1]. Stammzellen unterscheiden sich in ihrem Differenzierungspotenzial, welches mit fortlaufender Embryonalentwicklung abnimmt.

Man unterscheidet zwischen den folgenden vier Arten von Stammzellen. Eine totipotente (omnipotente) Stammzelle kann zu jeder Körperzelle sowie extraembryonalem Gewebe differenzieren (Bsp.: befruchtete Eizelle). Aus ihr kann ein ganzer Organismus hervorgehen. Ist eine Stammzelle pluripotent, so kann aus ihr sämtliches somatisches Gewebe sowie Keimzellen hervorgehen (Bsp.: Innere Zellmasse der Blastozyste). Aus multipotenten Zellen können unterschiedliche Zelltypen ihrer Keimblattlinie hervorgehen (Bsp.: hämatopoietische Stammzellen). Aus unipotenten Zellen geht nur ein Zelltyp hervor (Bsp.: spermatogoniale Stammzelle) [2].

Eine weitere Einteilung basiert auf einer Zuordnung zu embryonalen oder adulten Stammzellen. Embryonale Stammzellen (ES) sind pluripotent und können somit zu allen Geweben differenzieren. ES werden aus der Inneren Zellmasse der Blastozyste gewonnen [3]. Humane ES (hES) werden aus Embryonen gewonnen, die durch In-vitro-Fertilisation gezeugt aber nicht in die Gebärmutter übertragen wurden [4, 3]. Die Gewinnung und Verwendung von hES hat eine ethische Diskussion zur Folge, in dessen Mittelpunkt die Frage nach der Schutzwürdigkeit des menschlichen Embryos steht und ob diese es gestattet, Embryonen zu diesem Zweck zu verbrauchen oder zu erzeugen [5]. Adulte Stammzellen sind undifferenziert und können im Körper ein Leben lang Tochterzellen bilden. Diese können sich differenzieren, ersetzen so untergegangene Zellen und regenerieren geschädigtes Gewebe [1]. Synonym wird der Begriff somatische Stammzelle verwendet. Da Adulte Stammzellen

sowohl im kindlichen als auch adulten Organismus vorkommen wird dieser Begriff von manchen Autoren bevorzugt verwendet [6].

Ein großer Unterschied zwischen somatischen und embryonalen Stammzellen ist ihr Differenzierungspotential, welches bei somatischen Stammzellen limitiert ist [7]. Des Weiteren sind somatische Stammzellen, im Gegensatz zu ES, ethisch unbedenklich. Sie können oft aus Gewebe gewonnen werden, das bei medizinischen Eingriffen anfällt und sonst verworfen wird (z. B. Liposuktionsaspirat) und sie bilden im Gegensatz zu ES keine Teratome [8].

Basierend auf diesem Wissen liegt der Gedanke nahe diese Zellen zu nutzen, um untergegangenes Gewebe im Organismus zu ersetzen, um so die physiologische Funktion wieder herzustellen.

1.2 Mesenchymale Stammzellen und Besonderheiten von ASC

Mesenchymale Stammzellen (MSC), die erstmalig im Knochenmark beschrieben wurden [9], können aus unterschiedlichen Geweben isoliert werden. Neben ihrer fibroblastenartigen Morphologie in der Zellkultur dient der Nachweis der Expression bestimmter Oberflächenproteine der Charakterisierung mesenchymaler Stammzellen. Je nach Ursprungsgewebe können sich diese Zellmembranepitope unterscheiden oder Übereinstimmungen zeigen. Unabhängig von ihrer Quelle müssen MSC nach der Definition von Dominici et al. [10] die folgenden drei Kriterien erfüllen:

1. Sie sind unter Standardkulturbedingungen in Gewebekulturflaschen adhärent an Plastikoberflächen.
2. ≥ 95 % der MSC Population exprimieren CD105, CD73 und CD90 und sind negativ für die Marker CD45, CD14 oder CD11b, CD79a oder CD19 und HLA-II.
3. Die Zellen besitzen das Potential in vitro zu Adipozyten, Chondrozyten, und Osteoblasten zu differenzieren.

MSC stammen von embryonalem Mesenchym [11]. Mesenchym ist das embryonale Bindegewebe, aus dem beispielsweise Knorpel-, Knochen- und Muskelgewebe hervorgehen. Der Begriff Mesenchym ist nicht mit dem mittleren

Keimblatt, dem Mesoderm, zu verwechseln, obgleich im Mesoderm ebenso Mesenchymgewebe gebildet wird [12]. In allen drei Keimblättern kommt Mesenchym vor. Demnach können aus allen Gewebeabkömmlingen der Keimblätter MSC gewonnen werden, so zum Beispiel aus Knochenmark, Fettgewebe, Muskeln, der Lunge und neonatalem Gewebe, wie Plazenta, Nabelschnurblut [13].

Die Abbildung 1 zeigt eine Übersicht der Eigenschaften von MSC unabhängig von ihrer Quelle.

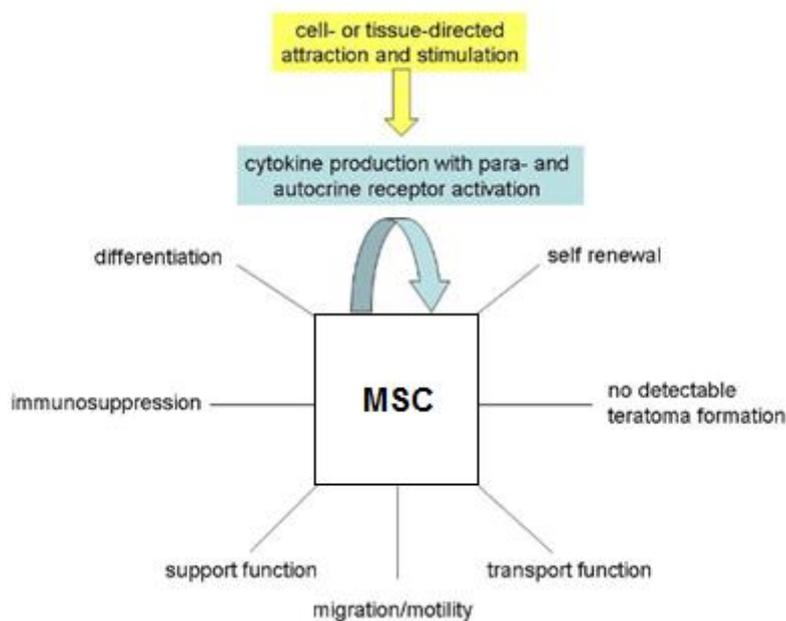


Abb. 1 Eigenschaften von MSC und ihre Funktion in vivo und in vitro (vgl. [13])

Neben ihrem Differenzierungspotential, der Definition entsprechend, in Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten, können MSC abhängig vom supplementierten Medium zu weiteren Zelltypen differenzieren. Es konnte bisher die Differenzierung in verschiedene Arten von Myozyten, wie glatte Muskulatur [14] und Skelettmuskulatur [15] induziert werden. Makino et al. beschrieben erstmals die in vitro Differenzierung von MSC mit 5-Azacytidin in Zellen mit Morphologie und Eigenschaften von Kardiomyozyten [16].

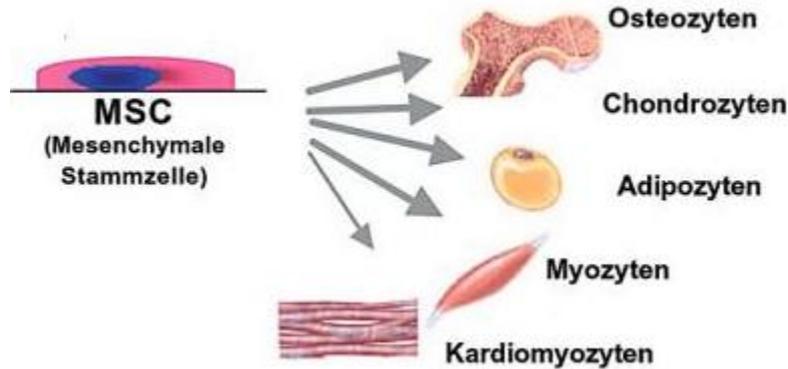


Abb. 2 Differenzierungspotential von MSC (Auswahl) [17]

Neben mesodermalen Zelllinien können MSC auch hepatogen [18, 19], neurogen [20, 21], in endokrine Pankreaszellen [22] und in endotheliale [23, 24] und epitheliale Zellen [25] differenzieren.

Als weitere gemeinsame Eigenschaft von MSC konnte in mehreren Versuchen ein suppressiver, anti-inflammatorischer Einfluss auf das Immunsystem gezeigt werden. Sie wirken suppressiv auf die T-Zell- und NK-Zell-Proliferation und auf B-Zell-Funktionen sowie auf die Zytokinproduktion. Außerdem verhindern sie die Differenzierung, Reifung und Aktivierung von Dendritischen Zellen [26]. Es wird davon ausgegangen, dass dafür von MSC freigesetzte lösliche Faktoren verantwortlich sind sowie ein Indolamin-2,3-Dioxygenase-vermittelter Abbau von Tryptophan. Tryptophan ist eine für die lymphatische Proliferation essentielle Aminosäure [27].

In den Membranen von MSC konnte eine Reihe von ABC-Transportern nachgewiesen werden [28]. Humane ABC-Transporter (ATP-binding cassette-Transporter) werden durch 49 ABC-Gene codiert. Sie spielen eine wichtige Rolle für Entgiftungs- und Transportprozesse an Plasmamembranen und an intrazellulären Membranen, zudem können sie auch für die Multidrug-Resistance von Tumorzellen verantwortlich sein [29].

Eine weitere bekannte Eigenschaft von MSC ist ihre Resistenz gegenüber Hypoxie. MSC stammen aus perivaskulären Nischen mit hypoxischem Milieu. Demnach ist es naheliegend, dass eine hypoxische Umgebung Einfluss auf die Eigenschaften von MSC hat. Es konnte gezeigt werden, dass MSC, die unter hypoxischen Bedingungen kultiviert wurden, in niedrigerem Maße Gene exprimieren, die für Apoptose und Seneszenz der Zellen verantwortlich sind [30].

Daraus lässt sich mutmaßen, dass MSC auch unter ischämischen Bedingungen überleben und untergangenes Gewebe ersetzen könnten.

Um geschädigtes Gewebe zu ersetzen, müssen MSC die Kapazität besitzen zum Zielgewebe, wie Entzündungsherde, zu migrieren. In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass die Migration von MSC von Chemokinen und ihrer Rezeptorinteraktion abhängt. Da auch Tumoren Entzündungsmediatoren produzieren, wandern auch dort MSC ein [26, 31]. Es konnte gezeigt werden, dass diese Tatsache ein Grund für ihre Chemotherapie-Resistenz sein kann [32]. Eine Hemmung der Migration kann somit einen neuen Ansatz in der Therapie maligner Tumoren darstellen.

2001 zeigten Zuk et al, dass auch MSC aus dem Fettgewebe (ASC, adipose-derived mesenchymal stem cells) in verschiedene Zellarten differenzieren können [33]. Für die Isolation von ASC steht eine Bandbreite an Quellen zur Verfügung. Fettgewebe besteht aus Bindegewebe, Blutgefäßen und Fettzellen, die über Präadipozyten zu Adipozyten ausreifen. Man unterscheidet zwischen univakuolärem (weißem) und plurivakuolärem (braunem) Fettgewebe. Beide fungieren als Speicher von energiereichen Lipiden. Während plurivakuoläre Adipozyten hauptsächlich der Thermogenese von Neugeborenen und Kleinkindern dienen, kommen weißem Fettgewebe Funktionen als Baufett (z. B. van Hoffer-Fettkörper, perirenales Fettgewebe), Isolierfett und Depotfett (Energiereserve) zu. Außerdem sezernieren Adipozyten Faktoren wie Hormone und Zytokine, sodass Fettgewebe auch endokrine Funktionen zukommen [34]. ASC erfüllen auch die MSC-Kriterien nach Dominici, die für bone marrow-derived MSC (BM-MS) definiert wurden. Jedoch sind die Eigenschaften von ASC und BM-MS nicht identisch. Es konnte eine Überschneidung des Immunphänotyps von BM-MS und ASC von über 90 % nachgewiesen werden. Unterschiede ergeben sich in der Expression von CD49d, welches von ASC jedoch nicht von BM-MS exprimiert wird, und CD106, welches auf BM-MS nachgewiesen werden konnte aber nicht auf ASC [35]. Schäffler und Büchler fassten 2007 positive und negative Marker und Gene für ASC zusammen (s. Tab. 1) [36].

Tab. 1 Positive und negative Marker und Gene für ASC nach Schäffler und Bächler (positiv = Marker und Gene werden in ASC nachgewiesen, negativ = diese Marker und Gene werden in ASC nicht nachgewiesen).

positiv	CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD49d, CD49e, CD54, CD55, CD59, CD73, CD90, CD105, CD106, CD146, CD166, HLA I, Fibronectin, Endomucin, smooth muscle cell-specific alpha actin, Vimentin, Collagen-I
negativ	CD11b, CD14, CD19, CD31, CD34*, CD45, CD79a, CD80, CD117, CD133, CD144, HLA-DR, c-kit, MyD88, STRO-1, Lin, HLA-II

* Obwohl nach dieser Definition ASC negativ für CD34 sind, konnten in anderen Studien in frühen Passagen CD34-positive ASC in vitro nachgewiesen werden [37].

Die Differenzierungsfähigkeit von ASC zeigt zudem Unterschiede im Vergleich zu anderen MSC. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass ASC schneller adipogen und osteogen differenzieren als MSC aus Plazentagewebe [38] und dass MSC aus Knochenmark besser osteogen differenzieren als ASC [39]. Nichtsdestotrotz zeigen sowohl ASC als auch MSC ein breites Spektrum an Differenzierungsmöglichkeiten. Die Tabelle 2 zeigt eine Übersicht über die Differenzierungspfade und durch welches Medium diese induziert werden können [40].

Tab. 2 Darstellung der Differenzierung von MSC in unterschiedliche Zelllinien in Abhängigkeit von Mediensupplementen (Induktionsfaktoren)

Zelllinie	Induktionsfaktoren
Adipozyten	Dexamethason, Isobutylmethylamin, Indomethazin, Insulin, Thiazolidinedion
Kardiomyozyten	Transferrin, IL-3, IL-6, VEGF
Chondrozyten	Ascorbinsäure, BMP-6, Dexamethason, Insulin, TGF- β
Endothelial	Ascorbat haltiges Medium (EGM-2-MV; Cambrex), EGF, BFGF, Hydrocortison
Myozyten	Dexamethason, Pferdeserum
Neuronal	Butyliertes Hydroxyanisol, Valproinsäure, Insulin
Osteoblasten	Ascorbinsäure, BMP-2, Dexamethason, 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D3

1.3 Die Stammzellnische

Die Theorie einer Stammzellnische wurde 1978 von Schofield entwickelt [41]. Seine These besagt, dass Stammzellen in Nischen liegen, welche den Status dieser undifferenzierten Zellen aufrechterhalten. Die folgenden drei Charakteristika der Stammzellnische sind ausschlaggebend, um die Eigenschaften der Stammzellen zu kontrollieren.

1. Von der Nische ausgehende Faktoren regulieren die Selbsterneuerung der Stammzellen, ihr Überleben und ihren Erhalt.
2. Die Beziehung zwischen Stammzellen und umliegenden Zellen können Stammzellen polarisieren und eine asymmetrische Zellteilung fördern.
3. Die Adhäsion zwischen Stammzellen und umliegenden Zellen oder der extrazellulären Matrix (ECM) verankert sie in der Nische und hat Einfluss auf das Zellüberleben.

Die Stammzellnische bietet also ein Mikromilieu, das strukturgebend ist, trophische Eigenschaften hat und die Stammzellfunktion aufrechterhält. Des Weiteren besteht die These, dass Stammzellen ihre Konzentration in der Nische durch die Sekretion von Wachstumsinhibitoren selbst regulieren. Je mehr Stammzellen in der Nische lokalisiert sind, desto mehr Wachstumsinhibitoren werden abgegeben und die Zellproliferation sistiert [42]. ASC und andere Stammzellen benötigen eine hypoxische Umgebung für den Erhalt des undifferenzierten Stadiums und um die Wahrscheinlichkeit für einen DNA-Schaden durch Oxygenierung zu verringern. Hypoxie in der Nische wird durch HIFs (Hypoxia-Inducible transcription Factor) aufrechterhalten, welche außerdem proliferative Zielgene wie VEGF regulieren und folglich Einfluss auf das Voranschreiten und die Metastasierung von Tumoren haben [43, 44]. Typischerweise werden ASC sowie andere MSC unter normoxischen Bedingungen kultiviert ($pO_2 = 21 \%$). Physiologisch existieren sie jedoch bei einem Sauerstoffpartialdruck im Bereich von 1 % bis 14 %. Studien zeigten, dass die Kultivierung von MSC im hypoxischen Milieu einen günstigen Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung zu haben scheint [30]. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass hypoxisch kultivierte ASC schneller wachsen, eine

größere Viabilität besitzen und für mehr Generationen passagierbar sind als ASC der normoxischen Vergleichskultur [45].

Wie oben bereits erwähnt, können Stammzellen für Reparaturvorgänge ihre Nische verlassen und zum Ort der Gewebeschädigung migrieren. Diese Mobilität ist nicht unidirektional. Verlassen MSC die Blutstrombahn durch Transmigration über das Endothelium spricht man von „Homing“, dem Zurückkehren von MSC in die Stammzellnische (s. Abb. 3) [46].

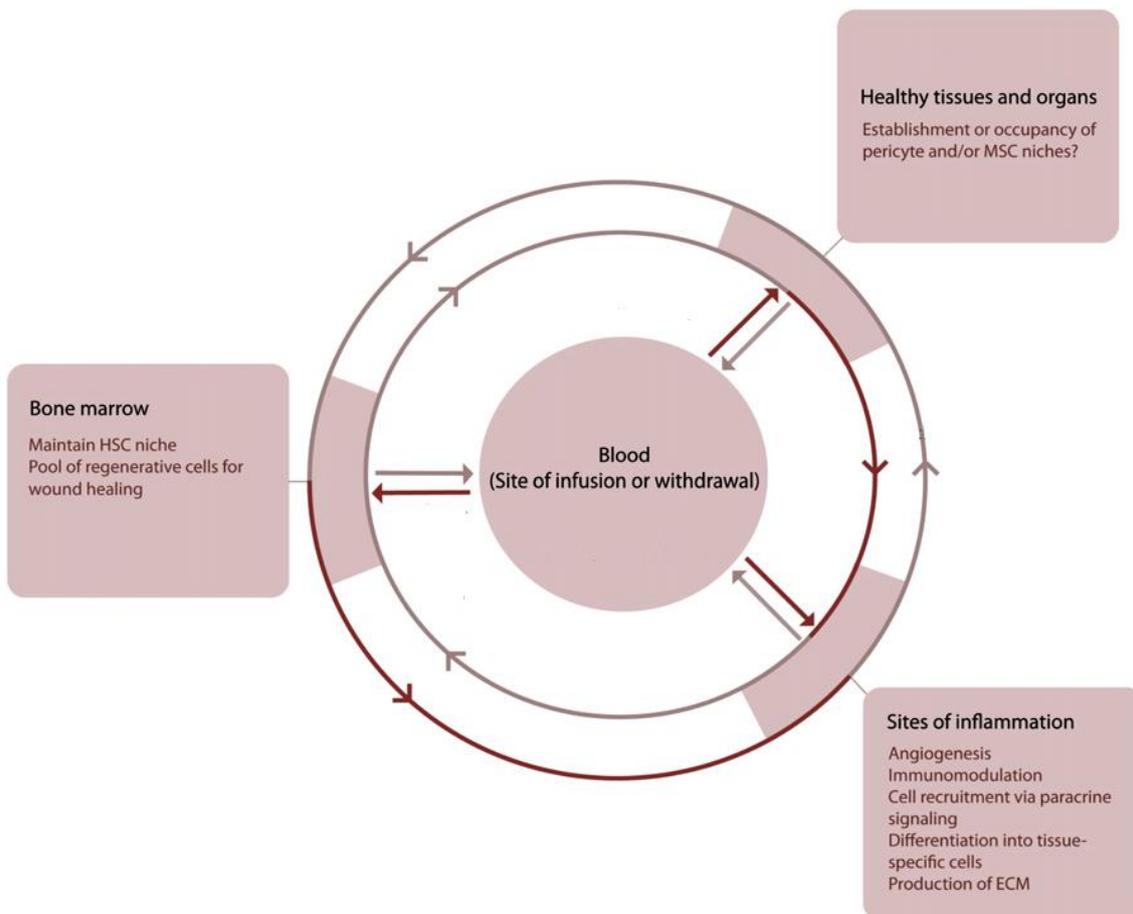


Abb. 3 Kreislauf der MSC im Organismus. MSC sind an verschiedenen anatomischen Lokalisationen aktiv (siehe rosa Kästen). Studien wiesen ihr Vorkommen im peripheren Blut und in gesundem Gewebe und Organen nach, neben ihrem Vorkommen im Knochenmark aus dem MSC in der Vergangenheit meist isoliert wurden. Die roten Pfeile repräsentieren Homing Routen, die bereits in Studien veröffentlicht wurden (vgl. [46]).

1.4 Epithelzellen

Da sich diese Arbeit mit der epithelialen Differenzierung von MSC befasst, soll an dieser Stelle ein Überblick über die Eigenschaften und Aufgaben von Epithelien gegeben werden.

Epithelgewebe besteht aus Epithelzellen, welche Schichten bilden, die Oberflächen bedecken oder das Lumen von Hohlorganen auskleiden. Außerdem kleiden sie die röhrenförmigen Strukturen der Nierentubuli aus. Unter der Epithelzellschicht liegt die Basalmembran aus Basallamina und Lamina fibrosa. Sie dient der Aufrechterhaltung der Polarität und stellt die Verbindung mit dem darunter liegenden Gewebe her. In den Nierenglomeruli dient die Basalmembran als Bestandteil der Blut-Harn-Schranke.

Epithelien lassen sich in drei Gruppen aufteilen. Man unterscheidet Oberflächenepithelien, Drüsenepithelien und Sinnesepithelien und kann diese wiederum nach ihrer Gestalt (platt, kubisch, prismatisch) sowie der Zahl ihrer Schichten (einschichtig, zweischichtig, vielschichtig) klassifizieren.

Epithelzellen sind durch spezifische Zellhaften über Cadherine miteinander und über Integrine mit der ECM verbunden. Man unterscheidet zwischen Adhäsions-, Kommunikations- und Verschluss-(Barriere-)Kontakten. Alle drei sind Bestandteil des apikalen Haftkomplexes von Epithelzellen. Desmosomen dienen als Adhäsionskontakten dem mechanischen Zusammenhalt der Zellen. Gap junctions ermöglichen als Kommunikationskontakte den Austausch von Molekülen und Signalen zwischen den Zellen. Zonulae occludentes (ZO) riegeln als Verschlusskontakte den Interzellularraum ab. Ihnen kommt in der Niere eine besondere Bedeutung zu. Durch ihre Barrierefunktion tragen ZO der Bildung eines Gradienten zwischen Tubuluslumen und Nierentubuluszellen bei, welcher für die Konzentration des Harns und der Regulation des Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushalts eine entscheidende Rolle spielt. Die Verbindung zwischen Epithelzellen und Basallamina bilden die Hemidesmosomen [34].

1.5 Regeneration von Nierenschädigungen und regenerative Medizin

Durch eine zunehmende Lebenserwartung und steigende Inzidenz von Nieren affektierenden Krankheiten wie Hypertonie, Diabetes mellitus und Hyperlipidämie (Metabolisches Syndrom), kommt der Frage nach einer suffizienten und nebenwirkungsarmen Therapie der akuten und chronischen Nierenerkrankungen eine essentielle Bedeutung zu. Organtransplantationen sind durch eine Organknappheit mit langen Wartezeiten verbunden. Die Prävention der Transplantatabstoßung ist mit gesundheitlichen Risiken verbunden. Durch eine permanente Suppression des Immunsystems kann es zu lebensbedrohlichen Infektionen kommen. Die Dialyse bietet zwar eine suffiziente Alternative, beeinträchtigt jedoch stark den Alltag und die Lebensqualität der Patienten. Neben einem hohen zeitlichen Aufwand werden eine spezielle Diät und Flüssigkeitsrestriktion notwendig [47].

Viele klinische und präklinische Modelle indizieren eine kritische Rolle der MSC bei der Wundheilung. Bei Patienten mit Leberzirrhose und Hepatitis führten autologe BM-ASC zu einer Verbesserung der Leberfunktion [48]. Außerdem konnte der Nutzen von MSC in der Behandlung von Herzinfarkten und Corneaschäden gezeigt werden, welcher auf die Sekretion von TSG-6 (tumor necrosis factor-inducible gene 6) zurückzuführen ist. Es reduziert die Entzündungsreaktion und fördert die Geweberekonstruktion [8, 49].

Ein positiver Effekt in der Therapie des Nierenversagens konnte ebenso nachgewiesen werden [50]. Es wurde gezeigt, dass transplantierte MSC den Phänotyp der renalen Tubuluszellen ihrer Empfänger übernehmen können und sich in den Zellverband der Tubuli integrieren. MSC steigern so die strukturelle Genesung und verbessern die Funktion der Niere nach einer akuten Schädigung. Des Weiteren wird vermutet, dass die Verbesserung der renalen Funktion durch ASC bei ischämischen Nierenschäden durch eine Suppression der Inflammation und des oxidativen Stresses bedingt ist. Zudem führten sie zu einer Steigerung der Angiogenese im geschädigten Areal [50, 51]. Dieses positive therapeutische Potenzial lässt sich durch eine hypoxische Präkonditionierung der ASC steigern, welche dazu führt, dass Faktoren der

Angiogenese vermehrt freigesetzt werden. Dadurch wird die Sauerstoffversorgung erhöht und die Apoptose reduziert [52].

1.6 Fragestellung und Ziele der Arbeit

In der vorgelegten Arbeit wurde die epitheliale Differenzierung von ASC aus humanem perirenalem Fettgewebe (prASC) untersucht. Es wurde gezeigt, dass das die Nieren umgebende Fettgewebe eine weitere Quelle für ASC darstellt und es möglich ist diese Zellen mit bereits etablierten Methoden zu isolieren.

Bei dieser Quelle handelt es sich um anatomisch nah an den Nieren lokalisierte Nischen, aus denen im Falle einer Nierenschädigung folglich Stammzellen abgegeben werden könnten, um Regenerationsprozesse zu fördern. Dies kann möglicherweise durch Integration der Zellen ins geschädigte Gewebe mit folgender Differenzierung oder durch parakrine Effekte geschehen.

Der Schwerpunkt der Arbeit befasst sich mit der Untersuchung der Differenzierung von prASC in epitheliale Zellen. Zur Induktion der epithelialen Differenzierung wurden ASC mit all-trans-Retinolsäure (ATRA) in unterschiedlichen Konzentrationen stimuliert. Eine weitere Kultivierung erfolgte im Medium mit löslichen Faktoren („konditioniertes Medium“), die aus Nierentubuluszellen (TEC) sezerniert werden.

Zusätzlich wurden ASC während der Kultivierung mit supplementierten Medien inkubiert, um ihre „Tri-Lineage“-Differenzierung in Adipozyten, Chondrozyten und Osteozyten nachzuweisen. Es folgte der Nachweis der Differenzierung mit unterschiedlichen Färbungen. Der Nachweis der adipogenen Differenzierung erfolgte durch Anfärben der Lipidvakuolen mit Oil-Red-O. Die Calcium-haltige Matrix, die durch osteogen differenzierte Zellen produziert wird, wurde durch die Alizarin-Färbung dargestellt. Als Nachweis von chondrogener ECM erfolgte die Alcian-Blue-Färbung.

2 Material

2.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Analysensieb (125 µm)	Retsch, Haan
Analysewaage	Mettler, Gießen
Autoklav (CertoClav CV-EL 10l/12l)	Kelomat Sterilizer Division
Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
Brutschrank (BB 6060)	Heraeus, Hanau
Combitips	Eppendorf, Hamburg
Digitalkamera (Typ DFC 480)	Leica, Solms
Durchflusszytometer (FACScan)	Becton Dickinson, Heidelberg
Elektrophoresegerät (Trans-Blot SD)	BioRad, München
ELISA Reader (MR5000 Microplate Reader)	Dynatech Deutschland GmbH
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Fluoreszenzmessgerät (FLUOStar)	BMG, Offenburg
Fluoreszenzmikroskop: AxioLab DSC480 DMRB	Zeiss, Oberkochen Leica, Solms
Heizblock	Grant Boekel BBA, Cambridge
Hypercassette	Amersham (GE Healthcare), Freiburg
Magnetrührer (Ikamag Reo)	IKA-Labortechnik, Staufen
Durchlichtmikroskop (Axiovert 10)	Zeiss, Oberkochen
MiniMACS System	Miltenyi, Bergisch-Gladbach
Neubauer-Kammer	Assistent, Sondheim; Scherf Präzision, Meiningen-Dreissigacker
Thermocycler: AB7300 Primus RoboCycler Gradient 96	ABI, Darmstadt MWG-Biotech Stratagene
pH-Meter 632	Metrohm, Filderstadt

Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Plattenschüttler: Delfia Plateshake PMR-30	Wallac (Perkin Elmer, Rodgau) Heidolph, Schwabach
Spectrophotometer (NanoDrop)	ThermoScientific, Epsom (UK)
Sterilbank (Lamin Air HB 2448)	Heraeus, Hanau
Stromversorgung Elektrophorese (PowerPack 1000)	Biorad, München
Vortex (V-530)	JASCO Labor- u. Patenttechnik, Groß-Umstadt
Waage (VF2)	IKA-Labortechnik, Staufen
Wasserbad	Mettler, Gießen Julabo Labortechnik, Seelbach GFL, Burgwedel
Zentrifuge (Megafuge 1.0)	Heraeus, Hanau
Zentrifuge (Mikro22R)	Hettich, Tuttlingen

2.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
0,22 µm Filter	Millipore, Millex
0,45 µm Filter	Millipore, Millex
1,5 ml Tubes	Eppendorf, Hamburg
20 ml Spritze	Braun, Melsungen
50 ml, 15 ml Tubes	Greiner, Frickenhausen
6-Loch-Platte	Falcon, Heidelberg; Greiner, Solingen
Blotpapier	Schleicher und Schuell, Dassel
Chamber Slides	Nunc, Langenselbold
Combitips	Fischer/WS Laborservice
FACS Röhrchen (4 ml)	Greiner, Solingen
Latexhandschuhe	B. Braun, Melsungen
MACS Columns for large cells	Miltenyi, Bergisch Gladbach

Maxisorb Platten	Fischer (Nunc), Langenselbold
PCR 96- Loch Platten	ABgene, Epsom, UK
PCR Abdeckfolie	ABgene, Epsom, UK
PCR Tubes	VWR, Darmstadt
Petrischalen	Cell Star greiner bio one
PVDF Membran (Transferrmembran)	Millipore, Schwalbach
Röntgenfilm	Amersham, Freiburg
Skalpell	Feather, Osaka
Spitzen	Starlab Ahrensburg
Zellkulturflaschen (25 cm ² ; 75 cm ²)	Greiner, Frickenhausen
Zellschaber	Greiner, Frickenhausen

2.3 Chemikalien

Material	Hersteller
0,9 % NaCl-Lösung	Fresenius Kabi, Bad Homburg
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Sigma, Hamburg; Alexis, Lörrach
6-Aminohexansäure	Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn
Aceton	Fischar, Saarbrücken
Acrylamid	Applichem, Darmstadt
Alcian-Blue 8 Gx Solution	FluKa
Alizarin Red S	FluKa
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Biorad, München
Benzamidin	AppliChem, Darmstadt
Bovines Serumalbumin (BSA)	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
Collagenase Typ1	Worthington, Lakewood, NJ, USA
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth, Karlsruhe
Enhanced Chemiluminescence Substrate (ECL)	Amersham (GE Healthcare, Freiburg); Perkin Elmer, Waltham (USA)
Entwickler	AppliChem, Darmstadt

Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol 70 %	Appllichem, Darmstadt
Ethanol absolut	Appllichem, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma, Hamburg
Fixierer	Fisher/Sehner, Berlin
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Glucose	Merck, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Guanidinthiozyanat	Roth, Karlsruhe
Isoamylalkohol	AppliChem, Darmstadt
Isopropanol	Riedel deHaen, Seelze
Magermilchpulver	Naturaflor Töpfer, Dietmannsried
Methanol	J.T. Baker, Griesheim; Fluka (Sigma, Hamburg)
Moviol	Sigma, Hamburg
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem, Darmstadt
Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe
N-Ethylmaleimide (NEM)	Sigma, Hamburg
Oil Red O	Sigma, Hamburg
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PBS	Gibco, Karlsruhe
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Merck, Darmstadt
Reagenz A	Biorad, München
Reagenz B	Biorad, München
Reagenz S	Biorad, München
Rotiphenol	Roth, Karlsruhe
Sacrosyl (N-Laurylsacrosin Na-Salz)	VWR, Darmstadt
sodium dodecylsulfate (SDS)	Merck, Darmstadt
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Fluka (Sigma, Hamburg)
Tri-Na-citrat-dihydrat	Roth, Karlsruhe

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck, Darmstadt
Triton-x-100	Sigma, Hamburg; AppliChem, Darmstadt
Trypsin/EDTA	Sigma, Hamburg
Trypanblau	Sigma, Hamburg
Tween 20	Merck, Darmstadt; Serva
Urea	Roth, Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt

2.4 Medien und Mediensupplemente

Material	Hersteller
3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX)	Sigma, Hamburg
Activin A	R&D Systems, Wiesbaden
All Trans Retinolsäure (ATRA)	Sigma, Hamburg
Ascorbinsäure	Sigma, Hamburg
Bone Morphogenetic Protein (BMP-2)	Immunotools, Friesoythe
Dexamethason	Ratiopharm, Ulm
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich, Hamburg Gibco, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA, Cölbe
Glucose	Merck, Darmstadt
Glycerophosphat	Merck, Darmstadt
Hepatocyte Growth Factor (HGF)	Immunotools, Friesoythe
Indomethacin	Fluka (Sigma, Hamburg)
Konditioniertes Medium TEC	Eigene Herstellung aus humanen renalen Tubuluszellen
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Gibco, Karlsruhe
RPMI -1640	Sigma-Aldrich, Hamburg
TGF-beta	Cellconcept Peptotech
Ziegenserum	Kraeber und Co. GmbH
α -Globulin	Grifols, Langen

2.5 Material für Molekularbiologie

Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP)	Fermentas, St. Leon-Rot
Magnesiumchlorid (MgCl)	Invitrogen, Karlsruhe
10 × Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
Random Hexamer	Applied Biosystems, Foster City
Reverse Transcriptase	Fermentas, St. Leon-Rot
RNase Inhibitor	Fermentas, St. Leon-Rot
SybrGreen Rox Mix	Thermo Scientific; ABgene, Epsom
Taq Polymerase	Peqlab, Erlangen Invitrogen, Karlsruhe

2.6 Antikörper

2.6.1 Primärantikörper

Antikörper	Hersteller
Anti-Aktin	Sigma, Hamburg
CK18	EXBIO, Prag
Pan-CK 488 Alexa	eBioscience
smA	Dako, Glostrup
ZO-1	BD Biosciences, Heidelberg
CD11a FITC	Immunotools, Friesoythe
CD13 PE	Immunotools, Friesoythe
CD29 FITC	Immunotools, Friesoythe
CD31 FITC	Immunotools, Friesoythe
CD31	Dako, Glostrup
CD34 FIM	Immunotools, Friesoythe
CD44 FITC	Immunotools, Friesoythe
CD73	BD Biosciences, Heidelberg
CD90	e-biosciences, Lab Vision,

	dianova, Hamburg
CD105 PE	Immunotools, Friesoythe
CD166 PE	BD Biosciences- Pharmingen, Heidelberg
Von Willebrand Faktor (vWF)	Dako, Glostrup

2.6.2 Sekundärantikörper

Antikörper	Hersteller
Goat Anti Mouse-Cy3	Jackson Immuno Research, Newmarket
Goat Anti Rabbit - FITC	Boehringer, Ingelheim
Goat Anti Mouse - FITC	Jackson Immuno Research, Newmarket

2.7 Primer

β -Aktin	forward actggaacggtgaaggtgac reverse agagaagtgggggtggctttt	NM_001101.2 169 bp
β -Aktin	forward ctctccagccttcctctct reverse ctcaagttgggggacaaaaa	NM_001101.2 842 bp
wnt-4	acatgcaacaagacgtccaa reverse aagcagcaccagtggaattt	NM_030761 122 bp
ZO-1	forward gaacgaggcatcatccctaa reverse gagcggacaaatcctctctg	NM_003257 163 bp
CK18	forward cacagtctgctgaggttga reverse caagctggccttcagatttc	NM_000224 110 bp
CK18	forward gcatccagaacgagaaggag reverse ctgagattgggggcatcta	NM_000224.2 503 bp

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Kulturmedien

Als Kulturmedium (Standardmedium, StM) wurde DF10 verwendet. Dem Medium waren Penicillin und Streptomycin zugesetzt.

DF10:

- 450 ml Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)
- 50 ml fetales Kälberserum (FCS)
- 5 ml PenStrep (10.000 U/ml Penicillin, 10.000 µg/ml Streptomycin)

3.1.2 Materialien

Alle Materialien, die zur Zellkultur verwendet wurden und mit den Zellen in Berührung kamen, waren steril oder wurden vor ihrer Benutzung sterilisiert. Die Sterilisation erfolgte entweder durch Autoklavieren, Gassterilisation oder durch Reinigung mit 70 % Ethanol. Vor dem Arbeiten an der sterilen Werkbank wurden Werkbank und Handschuhe mit 70 % Ethanol desinfiziert.

3.1.3 Herkunft der Zellen

Die Zellen wurden aus humanem perirenenal Fettgewebe gewonnen. Das Fettgewebe stammte aus dem bei Tumor-Nephrektomien entfernten Nierenfettgewebe (Urologie der KGU Frankfurt). Ein Ethikvotum lag vor. Es wurde nicht zwischen männlichen und weiblichen Patienten unterschieden.

Das Fettgewebe wurde zwischen Entnahme und Zellisolierung in Kulturmedium (StM) maximal 20 Stunden im Kühlschrank bei 7 °C gelagert.

3.1.4 Isolierung von Stammzellen aus Fettgewebe

Lösungen:

- Enzymlösung
 - o 50 mg Collagenase Typ 1, Endkonzentration in Lösung 1 mg/ml
 - o Ad 50 ml RPMI

Die Isolierung der Stammzellen erfolgte unter sterilen Bedingungen an einer Werkbank.

Zunächst wurde renales Fettgewebe aus dem Nährmedium entnommen und zur weiteren Bearbeitung in eine Petrischale überführt. Das Gewebe wurde mithilfe zweier Skalpell („crossed blades“) zerkleinert bis es seine zusammenhängende Konsistenz verlor. Zur Herstellung der im nächsten Schritt benötigten Enzymlösung wurden 50mg Collagenase Typ 1 in 10 ml RPMI gelöst und steril durch einen 22 µm Filter filtriert. Die gewonnene Lösung wurde dann zu einer Gesamtmenge von 50 ml mit RPMI aufgefüllt und bei 37 °C vorgewärmt. Das zerkleinerte Fettgewebe wurde in 50 ml Röhrchen verteilt und 25 ml der Enzymlösung hinzugefügt. Daraufhin wurden die verschlossenen Röhrchen im Wasserbad für 60 min bei 37 °C inkubiert. Während der Inkubation wurde das Fett-Enzymgemisch mehrfach aufgeschüttelt, um die Phasen zu durchmischen. Nach der Inkubation wurde das Gemisch bei 300 g für 5 min zentrifugiert. Das Pellet am Boden des Röhrchens wurde mit einer Pipette abgesaugt und in ein 15 ml Röhrchen pipettiert. Der Überstand wurde erneut bei 300 g für 5 min zentrifugiert und das Pellet danach wieder abgesaugt und zu dem vorherigen Pellet hinzugefügt. Der Vorgang wurde noch ein weiteres Mal wiederholt. Nun wurde das gesammelte Pellet erneut bei den oben genannten Einstellungen zentrifugiert. Der Überstand wurde dann abgegossen, das Pellet in ein neues Röhrchen überführt und in 10 ml 0,9 % NaCl-Lösung aufgenommen. Die Lösung wurde erneut zentrifugiert und der Überstand danach abgegossen. Das Pellet wurde dieses Mal in 20 ml 0,9 % NaCl-Lösung aufgenommen und mithilfe eines Vortexers durchmischt. Die Lösung wurde dann durch ein 125 µm Sieb laufen gelassen und in einer Petrischale aufgefangen. Das Gemisch aus der Petrischale wurde dann erneut bei 300 g für 5 min zentrifugiert.

Der bei der Zentrifugation entstandene Überstand wurde abgegossen und das Pellet in 10 ml StM aufgenommen und in eine 25 cm² Kulturflasche gegeben.

3.1.5 Zellzahlbestimmung mit Trypanblau

Für die Zellzählung wurden nach der Zellisolierung 20 µl des Zellgemischs mit 20 µl Trypanblau in einem Eppendorf Reaktionsgefäß (Eppi) gemischt. Das Zellgemisch wurde für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurde die Neubauer-Zählkammer vorbereitet. Nach der Inkubationszeit wurde das Gemisch in die Zählkammer pipettiert. Es folgte die Zellzählung, bei der vier Quadrate der Zählkammer ausgezählt wurden.

Nach folgender Formel wurde die Zellzahl bestimmt:

Summe der Anzahl gezählter Zellen pro Quadrat / $4 \times 2 \times 10^5 = \text{Zellen/ml}$

3.1.6 Kultivierung humaner mesenchymaler Stammzellen

Die gewonnenen humanen mesenchymalen Stroma-/Stammzellen wurden, in mit Medium gefüllten Kulturflaschen, im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Luft im Brutschrank war wasserdampfgesättigt.

Das Nährmedium wurde alle drei bis fünf Tage gewechselt. Dazu wurde das Medium unter sterilen Bedingungen abgesaugt und die Flasche mit neuem Medium befüllt.

3.1.7 Umsetzen der Zellen

Lösungen:

- PBS
- Trypsin/EDTA
- StM

Um Zellen in neue Kulturflaschen aufzuteilen, wurde zunächst das Medium der Kulturflaschen abgesaugt. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und PBS abgesaugt. Als nächstes wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung benetzt und für 5 bis 7 min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

Die Zellen lösten sich währenddessen von der Wachstumsfläche. Durch Aufschlagen der Kulturflasche auf die Arbeitsfläche lösten sich die restlichen, noch am Flaschengrund haftenden Zellen. Zu dem Trypsin-Zellgemisch wurde nun StM gegeben und die Lösung mit der Pipette aufgenommen und in ein Zentrifugen-Röhrchen gegeben. Die Lösung wurde dann bei 300 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde in frischem Nährmedium aufgenommen und in neue Kulturflaschen überführt. Die Zellen wurden beim Umsetzen in eine neue Kulturflasche in Abhängigkeit von der Zelldichte der Ausgangskultur im Verhältnis von 1:2 oder 1:3 passagiert.

3.2 Zellcharakterisierung

3.2.1 Durchflusszytometrie

Lösungen:

- PBS
- Trypsin/EDTA
- Primär-Antikörper
- Sekundär-Antikörper

Die folgenden Arbeitsschritte wurden unsteril durchgeführt.

Für die Charakterisierung der Zellen durch Analyse im Durchflusszytometer wurde zunächst das Medium aus der Kulturflasche abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA benetzt und für 5 min im Brutschrank gelagert. Die abgelösten Zellen wurden dann in PBS aufgenommen und bei 300 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen.

Das dabei entstandene Pellet wurde in PBS aufgenommen und auf FACS-Röhrchen verteilt. Die mit Zellen und PBS bestückten Röhrchen wurden nun erneut bei 300 g für 5 min zentrifugiert. Der flüssige Überstand wurde vorsichtig abgesaugt bis nur noch das Pellet im Gefäß zurückblieb.

Nun wurde der Erstantikörper hinzugefügt, dieser wurde mit PBS verdünnt (ad 100 µl). Das Pellet wurde mithilfe eines Vortexmischers in der Antikörperlösung suspendiert. Nach der Inkubation im Dunklen bei Raumtemperatur für 15 min wurde PBS hinzugefügt und die Mischung erneut bei 300 g für 5 min zentrifugiert.

Wenn ein mit einem fluoreszierenden Farbstoff versehener Erst-Antikörper verwendet wurde, wurde der Überstand entfernt und das Pellet in PBS resuspendiert. Für die anderen Erst-Antikörper ist die Zugabe eines fluoreszierenden Sekundär-Antikörpers notwendig. Nach dem Zentrifugieren (300 g, 5 min) wurde das Pellet nicht in PBS sondern in einem Gemisch aus Zweitantikörper und PBS suspendiert. Die Suspension wurde im Kühlschrank bei 4 °C im Dunkeln für 20 min inkubiert. Danach wurde PBS hinzugefügt und das Gemisch zentrifugiert (300 g, 5 min). Nachdem der Überstand vorsichtig abgesaugt wurde, konnte das verbliebene Pellet in 100 µl PBS resuspendiert werden. Danach erfolgte die Messung mit dem Durchflusszytometer (FACSscan-Cytometer BD Biosciences).

Tab. 3 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Probe	Primärantikörper (Verdünnung)	Sekundärantikörper (Verdünnung)
1	-	-
2	CD73 (1:50)	GAM-Cy3 (1:100)
3	CD90 (1:33)	GAM-Cy3 (1:100)
4	CD31 FITC + CD105 PE (1:100)	-
5	CD11a FITC + CD13 PE (1:20)	-
6	CD44 FITC + CD105 PE (1:20)	-
7	CD29 FITC + CD166PE (1:20 + 1:5)	-

Es wurden 10.000 Zellen gemessen. Die Auswertung erfolgte mittels der Software WinMDI 2.8 (The Scripps Research Institute).

3.2.2 Immunfluoreszenz

Lösungen:

- Aceton/Methanol (1:1)
- Blocklösung
 - o Ziegenserum (1:20), α -Globulin 5 % (1:10) in PBS
- Primär-Antikörper
- Sekundär-Antikörper
- PBS

Für die Zellcharakterisierung durch Immunfluoreszenzfärbungen wurden die Zellen zunächst in einer 8-Loch-Kulturplatte (Chamber-Slide) ausgesät und für einige Tage im Brutschrank kultiviert.

Als ersten Schritt wurde das Medium aus den Kammern abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Zur Zellfixierung wurde nun eiskaltes Aceton-Methanol in die Kammern gefüllt. Die Zellen wurden für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach zweimal mit PBS gewaschen. Nachdem das PBS abgesaugt wurde, wurde die zuvor angesetzte Blocklösung auf die Zellen gegeben. Nach zehnmütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen erneut zweimalig mit PBS gewaschen. Daraufhin wurde der Primär-Antikörper zu den Zellen gegeben. Dieser wurde zuvor in verdünnter Blocklösung (Verdünnungsverhältnis der Blocklösung 1:10 in PBS) ebenfalls verdünnt. Die Zellen wurden dann bei 37 °C für 45 min auf einem Plattenschüttler im Brutschrank inkubiert. Danach wurde der Antikörper abgesaugt und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Nun wurde der Sekundär-Antikörper hinzugegeben. Diesem wurde DAPI zugesetzt und es folgte die Verdünnung in Blocklösung. Die Zellen wurden erneut bei 37 °C für 45 min auf einem Plattenschüttler im Brutschrank inkubiert und danach zweimal mit PBS gewaschen. Als letzten Schritt wurden die Kammern entfernt und der Chamber-Slide mit Moviol eingedeckelt.

Die Betrachtung und fotografische Dokumentation erfolgten mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Keyence BZ9000, Neu-Isenburg).

Tab. 4 Antikörper für die Immunfluoreszenz (1)

Kammer	Primärantikörper (Verdünnung)	Sekundärantikörper (Verdünnung)
1	-	-
2	Pan-CK Alexa 488 (1:500)	Nur DAPI (1:100)
3	CD34 FIM (1:10)	Nur DAPI (1:100)
4	CD31 (1:100)	GAM-Cy3 + DAPI (1:100)
5	-	GAM-Cy3 + DAPI (1:100)
6	SmA (DAKO) (1:30)	GAM-Cy3 + DAPI (1:100)
7	vWF (DAKO) (1:30)	GAM-Cy3 + DAPI (1:100)
8	CD31 (DAKO) (1:100)	GAM-Cy3 + DAPI (1:100)

3.3 Zellstimulation mit supplementierten Medien

3.3.1 Adipogene, osteogene und chondrogene Differenzierung

Medium zur adipogenen Differenzierung

- StM
- 0,5 mM IBMX (3-Isobuthyl-1-Methylxanthin)
- 1 µM Dexamethason
- 1,74 µM Insulin
- 3500 mg/l Glucose
- 200 µM Indomethacin

Medium zur osteogenen Differenzierung

- StM
- 0,1 µM Dexamethason
- 50 µM Ascorbinsäure
- 10 mM Glycerophosphat
- 100 ng/ml BMP2 (bone morphogenetic protein 2)

Medium zur chondrogenen Differenzierung

- DMEM + 1 % FCS + PenStrep (DF1)
- 50 nM Ascorbinsäure
- 6,25 µg/ml Insulin
- 10 ng/ml TGFβ (Transforming growth factor beta)

Die Zellen wurden aus verschiedenen Passagen auf 6-Loch-Platten ausgesät und zunächst mit StM für einige Tage im Brutschrank kultiviert. Danach wurden die Zellen mit dem für die erwünschte Differenzierung spezifischen Medium stimuliert. Zur Kontrolle wurden drei Kammern nicht stimuliert sondern mit dem Basismedium (StM) kultiviert. Des Weiteren wurde eine Kontrollreihe mit immortalisierten humanen Synovialfibroblasten (Fibroblasten aus der Gelenkinnenhaut, Zellname: K4IM) durchgeführt. Die Fibroblasten wurden ebenfalls mit supplementierten Medien und StM als Kontrollmedium inkubiert. Alle vier bis fünf Tage wurde das Medium durch frisches ersetzt. Nach zwei Wochen erfolgte der Nachweis der für die Differenzierung spezifischen Stoffwechselprodukte. Die Ergebnisse wurden fotografisch dokumentiert.

3.3.2 Epitheliale Differenzierung

Die Zellen wurden aus verschiedenen Passagen sowohl in Kulturflaschen als auch auf 8-Loch-Platten (chamber slides) ausgesät und zunächst mit StM für einige Tage im Brutschrank kultiviert. Danach wurden die Zellen mit den verschiedenen Medien (s. Tab. 5) stimuliert.

Es wurden Kontrollen angesetzt, die nur mit Basismedium (StM), nicht aber mit Induktionsmedium, kultiviert wurden. Alle vier bis fünf Tage wurde das Medium durch frisches ersetzt. Nach drei Wochen erfolgte der Nachweis der für die Differenzierung spezifischen Marker. Die Ergebnisse des Nachweises der Expression mittels Immunfluoreszenzfärbungen wurden fotografisch dokumentiert.

Tab. 5 Medien und Mediensupplemente für die epitheliale Differenzierung

Stammmedium	Supplement
DMEM + 10 % FCS + PenStrep (DF10)	5 µM ATRA
DF 10	2,5 µM ATRA
DMEM + 2 % FCS + PenStrep (DF2)	5 µM ATRA
DF2	2,5 µM ATRA
DF2	10 ng/ml Activin A 10 ng/ml HGF 5 µM ATRA
Konditioniertes Medium (CM) von epithelialen Tubuluszellen (TEC)	
Konditioniertes Medium von TEC	5 µM ATRA
GFmix (DF2 plus Supplemente)	5 µM ATRA 10 ng/mL Activin A 50 ng/mL BMP-7

3.4 Nachweismethoden

3.4.1 Nachweis durch Anfärben

Die Stoffwechselprodukte der auf 6-Loch-Platten kultivierten Passagen wurden mit den im Folgenden genannten Färbungen nachgewiesen. Die Ergebnisse der Färbung wurden mikroskopiert und fotografisch dokumentiert.

3.4.1.1 Oil-Red-O-Färbung

Lösungen:

- Oil-Red-O-Lösung (3:2 Verdünnung der 0,5 % Stammlösung mit destilliertem Wasser)
- PBS
- 4 % PFA
- Destilliertes Wasser

Zunächst wurden das adipogene Medium und das Basismedium aus dem Kontrollloch abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit einer vierprozentigen PFA-Lösung bedeckt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und somit fixiert.

Die Oil-Red-O-Lösung wurde nach der Verdünnung mit destilliertem Wasser für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und durch einen 22 µm Sterilfilter filtriert. Nachdem das PFA abgesaugt wurde, wurden die entsprechenden Kammern mit Oil-Red-O-Lösung befüllt. Nach der Inkubation bei Raumtemperatur für 60 min wurde die Oil-Red-O-Lösung abgesaugt und die Zellen wurden zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen.

3.4.1.2 Alizarin-Red-Färbung

Lösungen:

- Alizarin Red S
- PBS
- 1 % PFA

Das osteogene Medium und das Kontrollmedium wurden aus den zugehörigen Kammern abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen mit 1 % PFA für 15 min fixiert. Alizarin Red S wurde durch einen 22 µm Filter filtriert und nach einmaligem Waschen mit PBS zu den Zellen hinzugegeben. Nach 20 min Inkubation wurden die Zellen viermal mit PBS gewaschen.

3.4.1.3 Alcian-Blue-Färbung

Lösungen:

- Alcian-Blue 8 Gx Solution
- PBS
- 1 % PFA

Das chondrogene Medium und das Kontrollmedium wurden aus den entsprechenden Kammern entfernt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurden sie mit 1 % PFA bei Raumtemperatur für 15 min. fixiert. Alcian-Blue 8Gx Solution wurde durch einen 22 µm Filter steril filtriert. Nach erneutem Waschen mit PBS inkubierten die Zellen für 30 min bei Raumtemperatur in der Alcian-Blue-Lösung. Nach der Inkubation wurden die Zellen viermal sorgfältig mit PBS gewaschen.

3.4.2 Nachweis durch Immunfluoreszenz

Die Arbeitsschritte zum Nachweis der Zelldifferenzierung mittels Immunfluoreszenz sind analog zu den unter dem Punkt „3.2.2 Immunfluoreszenz“ beschriebenen Schritten.

Tab. 6 Antikörper für die Immunfluoreszenz (2)

OT	Primärantikörper (Verdünnung)	Sekundärantikörper (Verdünnung)
1	Pan-CK Alexa 488 (1:500)	Nur DAPI (1:100)
2	CK18 (Exbio) (1:500)	GAM Cy3 (1:50) + DAPI (1:100)
3	ZO-1 (1:50)	GAM Cy3 (1:50) + DAPI (1:100)

3.4.3 Proteinnachweis durch Western Blot

3.4.3.1 Proteingewinnung

Lösungen:

- PBS (4 °C)
- RIPA-Puffer (Radioimmunoprecipitation assay Puffer) Stammlösung
 - o 10 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1 M Urea, 0,5 % Triton-x-100, 0,1 % Tween 20, 0,1 % SDS

Direkt vor Gebrauch zum RIPA-Puffer hinzugefügt wurden:

- 1 mM PMSF
- 4 mM Benzamidin
- 10 mM NEM

Für die Proteingewinnung wurde auf Eis gearbeitet und steriles Material verwendet. Zunächst wurde das Kulturmedium von den Zellen entfernt und diese daraufhin mit kaltem PBS gewaschen. Als nächstes wurde 1 ml RIPA-Puffer in die Kulturflaschen gegeben, sodass die Zellen damit bedeckt waren. Dann wurden die Zellen mit einem sterilen Zellschaber vom Boden der Kulturflaschen abgeschabt und der Inhalt in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden bei 4 °C für 10 min bei 18890 g zentrifugiert. Der dabei entstandene Überstand wurde mit einer Pipette auf weitere Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -20 °C bis zur Proteinquantifizierung und Weiterverwendung gelagert.

3.4.3.2 Proteinquantifizierung nach Lowry

Lösungen:

- Reagenzgemisch aus Reagenz S und Reagenz A
- Reagenz B
- 1 % BSA

Zuerst wurde eine Standardreihe aus verschiedenen Verdünnungen von 1 % BSA in destilliertem Wasser hergestellt (3000 µg/ml, 2000 µg/ml, 1500 µg/ml, 1000 µg/ml, 750 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml).

5 µl der Standardverdünnungen beziehungsweise der Proben wurden in eine 96-Loch-Platte pipettiert. Von jeder Konzentration oder Probe werden zwei Kammern der Platte zur Doppelbestimmung befüllt. Die ersten beiden Kammern wurden mit 5 µl destilliertem Wasser zu Leerwertbestimmung bestückt. Als nächstes wurden 25 µl des angesetzten Reagenzgemisches und daraufhin 200 µl Reagenz B zu jeder Kammer hinzugefügt. Nach kurzem Mischen der Lösungen wurde die Platte bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert.

Anschließend erfolgte die photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration bei 650 nm mithilfe des Dynatech MR 500.

3.4.3.3 Western Blot

Lösungen:

- Trenngelpuffer (18,18 % Tris, 0,4 % SDS in dH₂O, pH 8,8)
- Sammelgelpuffer (6,06 % Tris, 0,4 % SDS in dH₂O, pH 7)
- Laufpuffer (3,026 % Tris, 1 % SDS, 14,4 % Glycin in dH₂O)
- SDS-Puffer (dreifach konzentriert) (Tris pH 8,6 62,5 mM, Glycerin 30 %, SDS 6 %, β -Mercaptoethanol 6 %, Bromphenolblau 0,01 % in dH₂O, pH 6,8)
- TBS (0,59 % Tris, 0,875 % NaCl in dH₂O, pH 7,4)
- PBS
- Blotpuffer
 - o A1 (36,6 g Tris, 0,1 g Na-acid, 200 ml Methanol ad 1 L dH₂O)
 - o AII (3,03 g Tris, 0,1 g Na-acid, 200 ml Methanol ad 1 L dH₂O)
 - o K (5,2 g 6-Aminohexansäure, 0,1 g SDS, 0,1 g Na-acid ad 1 L dH₂O)
- Blocklösung (3 % Magermilch, 0,1 % Tween 20 in TBS)
- Waschlösung (0,1 % Magermilch, 0,1 % Tween 20 in TBS)
- ECL-Lösung (Enhanced Chemiluminescence Lösung)
- Primär-Antikörper
- Sekundärantikörper
- Strippingsolution (2 ml 10 % SDS, 625 μ l 1 M Tris pH 6,8 und 70 μ l β -Mercaptoethanol in 7,3 ml dH₂O)

Zuerst erfolgte das Auftrennen der Proteine durch Gelelektrophorese. Der gläserne Gelrahmen wurde mit Agarosegel abgedichtet. Daraufhin wurde das nach Tabelle 7 vorbereitete Trenngel in den Glasrahmen gefüllt. Der Rest des Rahmens wurde mit destilliertem Wasser befüllt. Das Trenngel wurde zum Aushärten nun bei 50 °C für 45 min in den Wärmeschrank gestellt.

Tab. 7 Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel

Trenngel	8 %	10 %	Sammelgel	
Acrylamid 30 %	6 ml	7,5 ml	Acrylamid 30 %	1 ml
Trenngelpuffer	5,625 ml	5,625 ml	Sammelgelpuffer	1,875 ml
Aqua dest.	10,875 ml	9,375 ml	Aqua dest.	4,75 ml
TEMED	37,5 µl	37,5 µl	TEMED	29 µl
APS 40 %	21 µl	21 µl	APS 40 %	15 µl

Der Teil des Gelrahmens, in den der Trennkamm eingebracht wird, wurde, nachdem das Wasser abgegossen wurde, mit Sammelgel aufgefüllt. In das flüssige Sammelgel wurde der Trennkamm eingespannt, der zehn Kammern für die Proteinproben ausgefüllt hat. Das Sammelgel polymerisierte bei 50 °C für 30 min.

In der Zwischenzeit wurden die Proteinproben für die Gelelektrophorese vorbereitet. Die Proteinkonzentration wurde bereits mithilfe des Lowry-Assays bestimmt. Es wurde mit einer Proteinmenge von 5 µg gearbeitet. Die Proteinproben wurden in ein kleines Reagenzgefäß gefüllt und mit destilliertem Wasser und 3 x SDS aufgefüllt. Die Mengen wurden so gewählt, dass Probe und Wasser zwei Drittel und 3 x SDS ein Drittel der Proben ausmachten. Das Probengemisch mit einem Endvolumen von 45 µl wurde dann für 10 min bei 95 °C inkubiert, kurz abzentrifugiert und abgekühlt.

Das Gel für die Elektrophorese wurde in die Elektrophoresekammer gesetzt und die Kammer mit Laufpuffer befüllt. Danach wurde der Kamm vorsichtig aus dem Gel gezogen. In die entstandenen Taschen wurden die Proteinproben pipettiert. In der Elektrophoresekammer wurden die Proteine zuerst für 15 min bei 100 Volt (V) und 20 Milliampere (pro Gel) und danach für eine Stunde bei 110 V und 30 mA pro Gel aufgetrennt.

Nach der Elektrophorese wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran im Semi-Dryblotter übertragen. Dazu wurde die Membran auf die Größe des Trenngels zugeschnitten und zunächst für 10 min in eine Schale mit Methanol getaucht. Danach wurde die Membran in destilliertem Wasser gebadet. Die mit Wasser und Membran gefüllte Schale wurde dabei für 5 min auf einen Plattenschüttler gestellt. Als letzten Schritt zur Vorbereitung der Membran wurde diese für etwa 5 min in Blotpuffer All getränkt.

Nun erfolgte die Vorbereitung der Blotpapiere. Insgesamt wurden pro Gel drei Stück benötigt, die etwas größer zugeschnitten wurden als die Membran. Jeweils ein Blotpapier wurde in Blotpuffer A1, AII und K getränkt. Danach wurden die Membran, Gel und Blotpapiere in folgender Reihenfolge auf die mit destilliertem Wasser befeuchtete Anode des Blotters gelegt: A1-Blotpapier, AII-Blotpapier PVDF-Membran, Gel, K-Blotpapier.

Um das Gel aus der Kammer zu lösen, wurden die Glasrahmen mit dem Gel aus der Elektrophoresekammer genommen. Die obere Glasplatte wurde vorsichtig abgehoben und das Sammelgel abgetrennt und verworfen. Daraufhin wurde das Gel auf die Membran aufgelegt und die Glasplatte vorsichtig abgetrennt. Dies wurde so ausgeführt, dass weder das Gel austrocknen konnte, noch Luftblasen zwischen den Schichten entstanden. Danach konnte die oben beschriebene Schichtung fortgeführt werden und die ebenfalls mit destilliertem Wasser befeuchtete Kathode (Deckel) aufgelegt werden. Das Gel wurde dann für anderthalb Stunden bei 15 V und 55 mA pro Gel geblottet.

Danach wurden die Kathode, das Blotpapier und das Gel entfernt und die Oberseite der Membran markiert und beschriftet und dann zum Lumen zeigend in ein 50 ml Zentrifugationsröhrchen überführt. Diese Seite wurde mit den Proteinen beladen. Das Röhrchen wurde mit Blocklösung befüllt, in welcher die Membran über Nacht bei 4 °C unter Rotation inkubiert wurde.

Vor dem nächsten Schritt wurde die Membran nach dem Blocken mit Waschlösung unter Rotation für 5 min gewaschen. Die Waschlösung wurde frisch hergestellt.

Danach erfolgte unter Rotation die Inkubation mit dem Primärantikörper für 1,5 h bei Raumtemperatur. Daraufhin wurde die Membran zunächst für 15 min, danach dreimal für 5 min mit Waschlösung gewaschen, ebenfalls bei Raumtemperatur und unter Rotation. Die Waschlösung wurde nach jedem Schritt abgesaugt und durch neue ersetzt. Nun konnte die Membran mit dem Sekundärantikörper unter Rotation für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert werden. Dann wurde die Membran in gleicher Weise wie nach der Inkubation mit dem Primärantikörper gewaschen.

Tab. 8 Antikörper für den Western Blot und ihre Verdünnung

Primärantikörper	Anti-Aktin (1:1000)	CK-18 (1:1000)
Sekundärantikörper	Anti-rabbit (1:10000)	Anti-mouse (1:2000)

Für die Filmentwicklung wurden zunächst je 1 ml ECL-Lösung 1 mit 1 ml ECL-Lösung 2 in einem Reagenzgefäß gemischt. Die Membran wurde nach dem Waschen mit 1 ml ECL-Lösungsgemisch inkubiert und danach luftblasenfrei in Frischhaltefolie verschlossen. Die so luftdicht verpackte Membran wurde in eine Filmkassette gelegt. In der Dunkelkammer wurde Filmpapier auf die Größe der Membran zugeschnitten und in die Filmkassette auf die Membran gelegt. Die Dauer variierte, je nachdem, wie stark das Filmpapier belichtet werden sollte. Das Filmpapier wurde danach in Entwicklerlösung getaucht bis Banden sichtbar wurden. Danach wurde das Papier in einer Schale mit Wasser gewaschen, bevor es in Fixierlösung gebadet wurde. Danach wurde der Film nochmals mit Wasser gewaschen und dann getrocknet.

Um weitere Proteine nachweisen zu können, müssen die Antikörper durch die folgenden Arbeitsschritte von der Membran entfernt werden („Membrane Stripping“). Hierzu wurde die Membran für 30 min bei 50 °C mit Strippingsolution inkubiert. Danach wurde die Membran zweimal für 15 min bei Raumtemperatur in Waschlösung gewaschen. Als nächstes erfolgte die Inkubation mit TBS ebenfalls zweimal für 15 min bei Raumtemperatur. Daraufhin konnte die Membran erneut mit Blocklösung für 2 h blockiert werden. Die Inkubationsschritte erfolgten alle unter Rotation.

Nun wurde die Membran wie oben genannt mit Antikörpern behandelt. Die Arbeitsschritte bis zur Filmentwicklung erfolgten nach dem gleichen Schema.

3.4.4 RNA-Nachweis durch qPCR

3.4.4.1 RNA-Extraktion

Lösungen:

- Lösung D:
 - o 4 M Guanidinthiocyanat
 - o 113,5 ml DEPC-Wasser
 - o 25 mM Natrium-Citrat pH 7
 - o 0,5 % Sacrosyl (N-Laurylsacrosin Na-Salz)
 - o β -Mercaptoethanol (kurz vorher hinzugeben, 72 μ l auf 10 ml)
- Natrium-Azetat
- Phenol
- Chloroform-Isoamylalkohol (49:1)
- Isopropanol

Für die Gewinnung der RNA aus ASC wurde auf Eis und mit RNase und DNase freiem, sterilisiertem Material gearbeitet.

Zur RNA-Gewinnung wurden zuerst das Medium aus den Kulturflaschen abgesaugt und die Zellen mit kaltem PBS gewaschen. Danach wurde je 1 ml Lösung D in die Flaschen gegeben. Dann wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgetragen und das Gemisch aus Lösung D und Zellen in ein vorgekühltes Reaktionsgefäß gefüllt. Diese wurden bis zum weiteren Gebrauch bei -20 °C gelagert.

Zur Weiterverarbeitung wurden die Proben aufgetaut und auf mehrere Reaktionsgefäße aufgeteilt. Zu den aliquotierten Proben wurden je 50 μ l Natrium-Azetat, 130 μ l Chloroform-Isoamylalkohol und 500 μ l Phenol gegeben und mit dem Vortexmischer für 10 bis 15 sec gemischt. Danach inkubierten die Proben für 15 min auf Eis. Als nächstes erfolgte die Zentrifugation der Proben bei 4 °C für 20 min bei 18890 g. Der Überstand über der milchigen Phase wurde abgesaugt, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und um die gleiche Menge Isopropanol ergänzt. Die Probe wurde für 10 sec mit dem Vortexer gemischt und vor dem nächsten Arbeitsschritt wieder bei -20 °C eingefroren, sofern die anschließenden Arbeitsschritte nicht unmittelbar folgten.

Nach dem Auftauen wurden die Proben erneut bei 4 °C und 18890 g für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und durch 1 ml 70 % Ethanol ersetzt. Es erfolgte erneut die Zentrifugation mit den genannten Einstellungen. Der Überstand wurde entfernt und durch 500 µl absolutes Ethanol ersetzt. Nach einem letzten Zentrifugationsschritt (Einstellungen beibehalten) wurde das Ethanol abgezogen und das Pellet an der Luft getrocknet. Danach wurden pro Eppendorfgefäß 25 µl DEPC-Wasser hinzugegeben und das Pellet mithilfe des Vortexmischers suspendiert.

Die Proben wurden bei -80 °C gelagert. Vor dem Einfrieren wurde die RNA-Konzentration gemessen. Die Messung erfolgte mit dem Nanodrop Spectrophotometer 1000 (Thermo Scientific).

3.4.4.2 Reverse Transkription (RT-Reaktion)

Lösungen:

- 1 µM Random Hexamer
- DEPC-Wasser
- Lösungen aus Tabelle 8

Für die PCR muss die RNA zuerst in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden.

Zuerst wurde 1 µg RNA (Probenmenge ist abhängig von der Konzentration) mit 1 µl Random Hexamer gemischt. Das Gemisch wurde erst bei 70 °C für 1 min und danach bei 4 °C für 5 min inkubiert. Anschließend wurde die Probe mit DEPC-Wasser zu einer Menge von 11,25 µl ergänzt. Dazu wurden die Lösungen der Tabelle 9 in den angegebenen Mengen hinzugefügt.

Die insgesamt 20 µl Probe sind ausreichend für drei PCR-Ansätze. Für mehr Ansätze wird nach dem gleichen Schema mit vielfacher Menge gearbeitet. Die Probe inkubierte für 30 min bei 37 °C und wurde nach dem Abkühlen für 2 min auf 75 °C erhitzt. Dabei wird die Reverse Transkriptase zerstört. Die gewonnene cDNA wurde nun für die qPCR weiterverwendet.

Tab. 9 Lösungen für die Reverse Transkription

Menge	Lösung
2 µl	5 mM MgCl ₂
2 µl	PCR 10x Puffer
2 µl	dNTP
1 µl	1 mM β-Mercaptoethanol
0,5 µl	RNase out (RNase-Inhibitor)
0,25 µl	Reverse Transkriptase (kurz vor Gebrauch hinzugeben)

3.4.4.3 Qualitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Lösungen:

- SybrGreen Master Mix (Fertiglösung)
- DEPC-Wasser
- Primer
 - o Aktin
 - o CK 18
 - o ZO-1
 - o WNT-4

Die Schritte wurden semisteril auf Eis durchgeführt. Zuerst wurde in ausreichender Menge ein Mastermix aus 12,5 µl SybrGreen Mastermix, 8,5 µl DEPC-Wasser und 2 µl Primer (Mengenangaben pro Kammer) hergestellt. In eine 96-Loch-Platte wurden 2 µl der cDNA-Probe und 23 µl Mastermix pro Kammer gefüllt.

Danach erfolgte die quantitative RT-PCR in einem Thermocycler. Zunächst denaturiert die DNA bei 95 °C für 15 min. Im nächsten Schritt hybridisiert die einzelsträngige Nukleinsäure mit komplementären Primern bei einer Abkühlung auf 63 °C für 15 sec (Annealing). Bei 72 °C für 20 sec repliziert sich die DNA zu Doppelsträngen. Dieser Zyklus wurde vierzigmal wiederholt. Danach wurde das DNA-Produkt für 15 min auf 90 °C erhitzt und dann für 15 min auf 60 °C abgekühlt gefolgt von der Schmelzpunktanalyse. Dabei wurde die Spezifität des PCR-Produkts überprüft.

Während der qPCR wurde die Fluoreszenz gemessen. Die Fluoreszenzstärke ist proportional zur DNA-Menge und lässt somit eine quantitative Auswertung zu. Das Fluoreszenzsignal wird emittiert, sobald SybrGreen eine Bindung mit doppelsträngigen DNA-Molekülen eingeht. SybrGreen hat ein Excitations- und Emissionsmaximum bei 494 nm bzw. 521 nm.

Die Ermittlung des relativen Expressionsunterschieds erfolgte in drei Schritten [53]. Für die Auswertung der Ergebnisse wurden die CT-Werte zunächst gegen die Expression von Aktin als Referenzgen normalisiert.

$$\Delta CT = CT \text{ Zielgen} - CT \text{ Referenzgen}$$

Im zweiten Schritt wurde der $\Delta\Delta CT$ Wert ermittelt. Dabei wird der ΔCT -Wert der behandelten Probe mit dem ΔCT -Wert einer unbehandelte Kontrolle normalisiert.

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ Probe} - \Delta CT \text{ Kontrolle}$$

Die Berechnung des relativen Expressionsunterschieds erfolgte mit folgender Formel:

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Die Methode zeigt den Unterschied in der Expression des untersuchten Gens im Vergleich zu einer Kontrolle.

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der Zellzahlbestimmung

Das verwendete Fettgewebe betrug durchschnittlich 75 Gramm. Daraus konnten durchschnittlich 683×10^6 Zellen gewonnen werden, was einer Zellzahl von 9×10^6 Zellen pro Gramm Gewebe entspricht.

24 h nach der Aussaat ließ sich beobachten, dass nur ein kleiner Teil der Zellen am Boden der Kulturflaschen adhärierte. Nach 24 h wurden die Zellen, die im Medium schwammen, abgesaugt und somit verworfen, und frisches Medium (StM) aufgefüllt.

4.2 Morphologie der Zellen

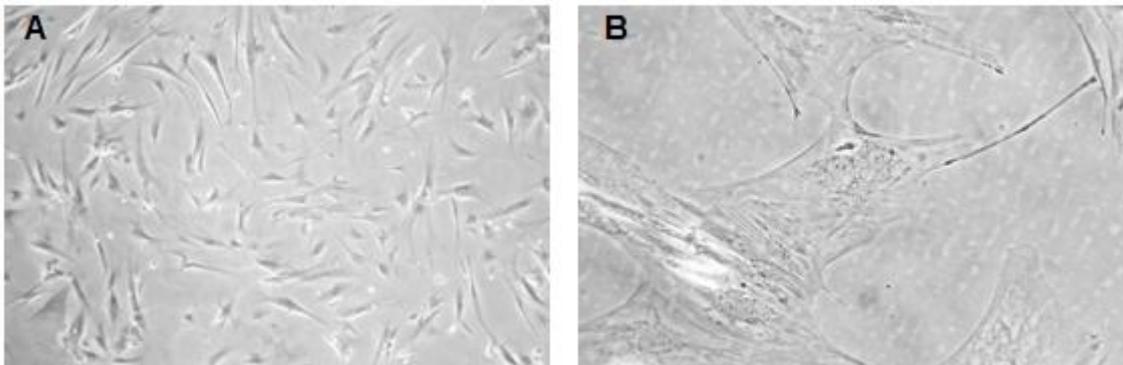


Abb. 4 Charakteristisches Bild undifferenzierter prASC der Passage P1 in 50-facher (A) und 200-facher (B) Vergrößerung

Die Zellen zeigen während der Primärzellkultur eine heterogene Morphologie. Viele sind länglich, andere Zellen wiederum sind um den Zellkern rundlich und verjüngen mit zunehmender Entfernung vom Zellkern (s. Abb. 4). Eingestreut sind Kolonien, die sich morphologisch von den restlichen Zellen unterscheiden. So sind Zellen mit epithelialer Morphologie (wahrscheinlich Endothelzellen) und Zellen mit multiplen Vakuolen sichtbar, die optisch an Prä-Adipozyten erinnern (siehe Abb. 5).

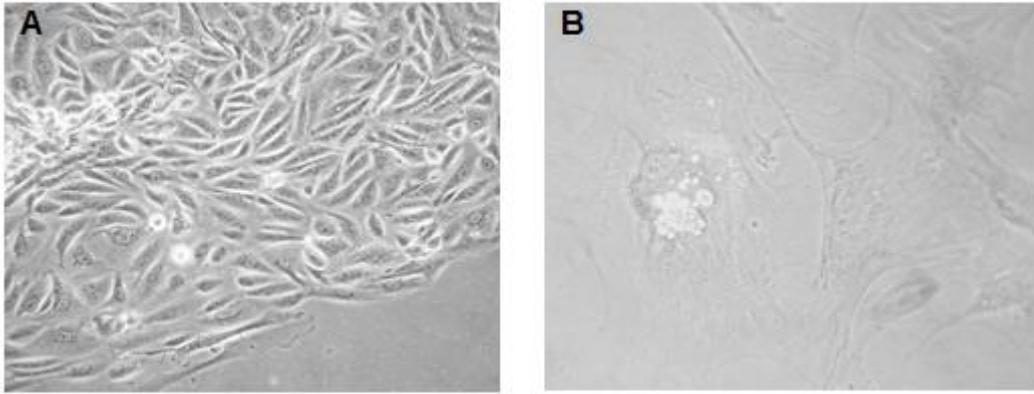


Abb. 5 Endotheliale (A) und adipozytäre (B) Morphologie der kultivierten Zellen

Mit zunehmender Passage wurde das Bild homogener und die Zellen wuchsen schneller, so dass sie früher passagiert werden mussten.

4.3 Ergebnisse der Zellcharakterisierung

4.3.1 Durchflusszytometrie

Um die isolierten Zellen zu charakterisieren und zu bestätigen, dass ASCs gewonnen wurden, wurde eine Zellcharakterisierung mithilfe der Durchflusszytometrie durchgeführt.

Die Zellen wurden mit, für bestimmte Oberflächenantigene spezifischen, fluoreszierenden Antikörpern markiert. So kann in der Durchflusszytometrie bestimmt werden, ob und in welcher Quantität die Oberflächenantigene (Cluster of Differentiation, kurz CD) auf den zu untersuchenden Zellen exprimiert werden. Die verschiedenen Antigene geben Aufschluss darüber, um welche Zellen es sich handelt, da charakteristische Marker nachgewiesen wurden.

Die Ergebnisse werden in Histogrammen dargestellt. Um die Qualität der Ergebnisse zu erhöhen, kann man die Messung modifizieren. So können zum Beispiel mithilfe des „Gatings“ Zellfragmente aus der Messung ausgeschlossen werden, da diese eine Mindestgröße nicht überschreiten. Des Weiteren kann bestimmt werden, dass Zellen abhängig von der Granularität ausgeschlossen werden.

Die Abbildung 6 zeigt, welche Zellen für die Messung berücksichtigt wurden (eingerahmter Bereich). Die X-Achse zeigt das größenabhängige Signal an (FSC-H = Forward Scatter), die Y-Achse das granularitätsabhängige Signal (SSC-H = Side Scatter). Nur die eingeschlossenen Zellen wurden für die Diagramme ausgewertet.

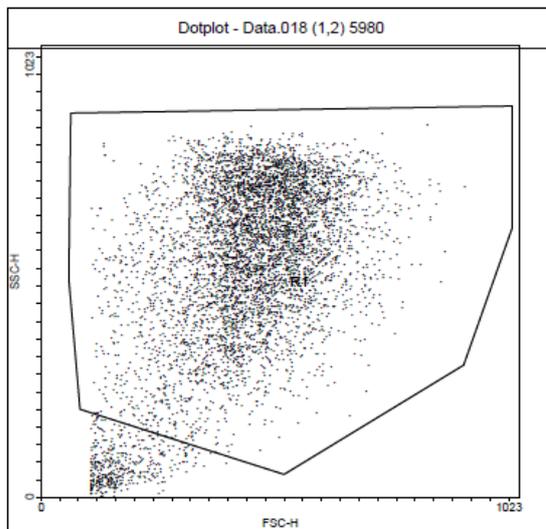


Abb. 6 Durchflusszytometrie: Eingeschlossene Zellen in Abhängigkeit von Granularität (SSC-H) und Größe (FSC-H)

Die Abbildung 7 zeigt Histogramme, die die Fluoreszenzstärke (FL-1 bzw. FL-2) in Abhängigkeit von der Zellzahl darstellen.

Die Histogramme stellen Zellen einer Isolation mit charakteristischen Ergebnissen dar. Die Expression folgender Oberflächenantigene konnte bei prASC nachgewiesen werden: CD73, CD90, CD105, CD44, CD29, CD166.

Die Expression von CD31, CD11b, CD13 sowie CD45 konnten erwartungsgemäß nicht nachgewiesen werden.

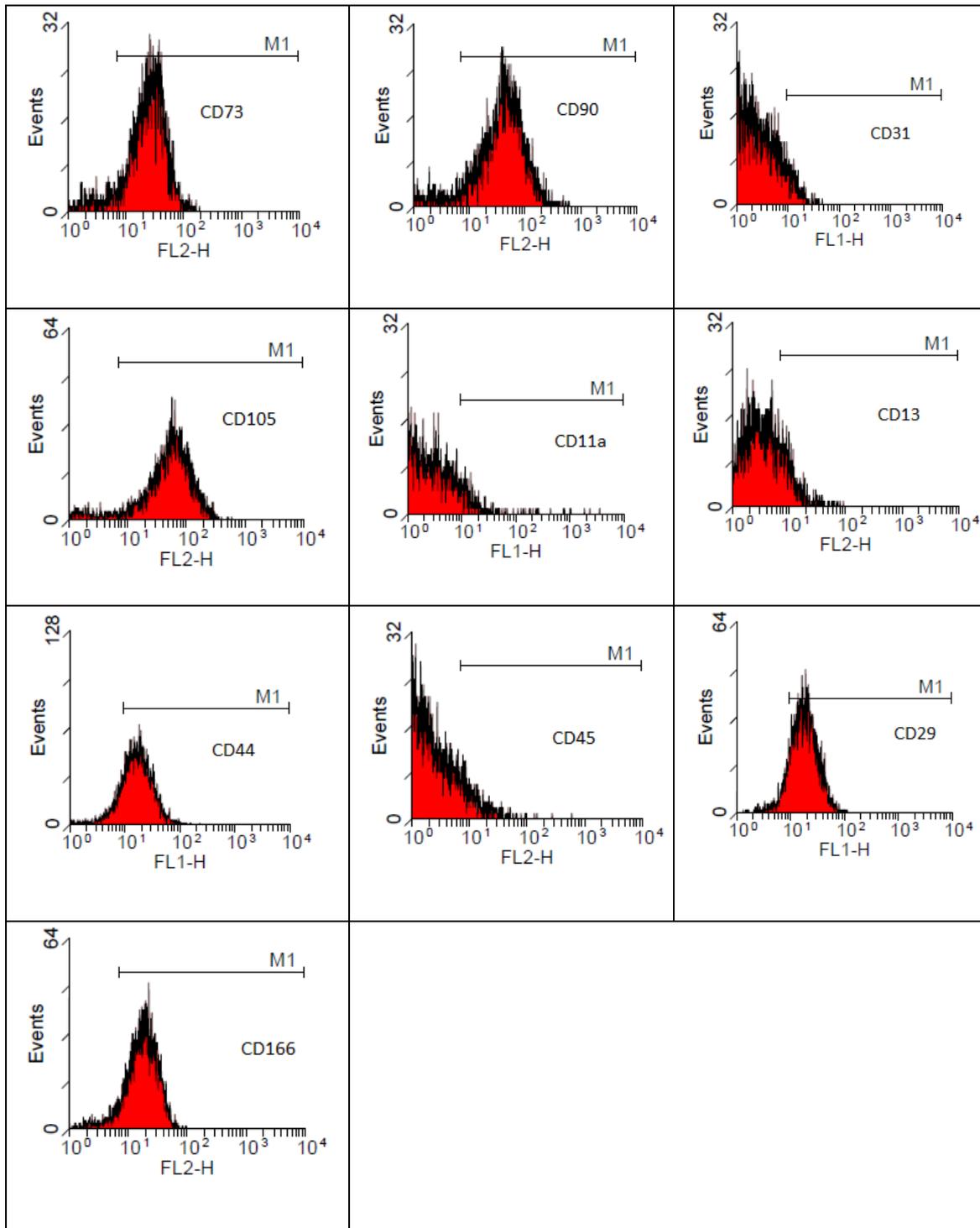


Abb. 7 Durchflusszytometrie: Charakteristische Expression der Oberflächenantigene in der Passage P1 (Marker M1 grenzt die Histogramme zur Negativkontrolle (Isotypenkontrolle) ab).

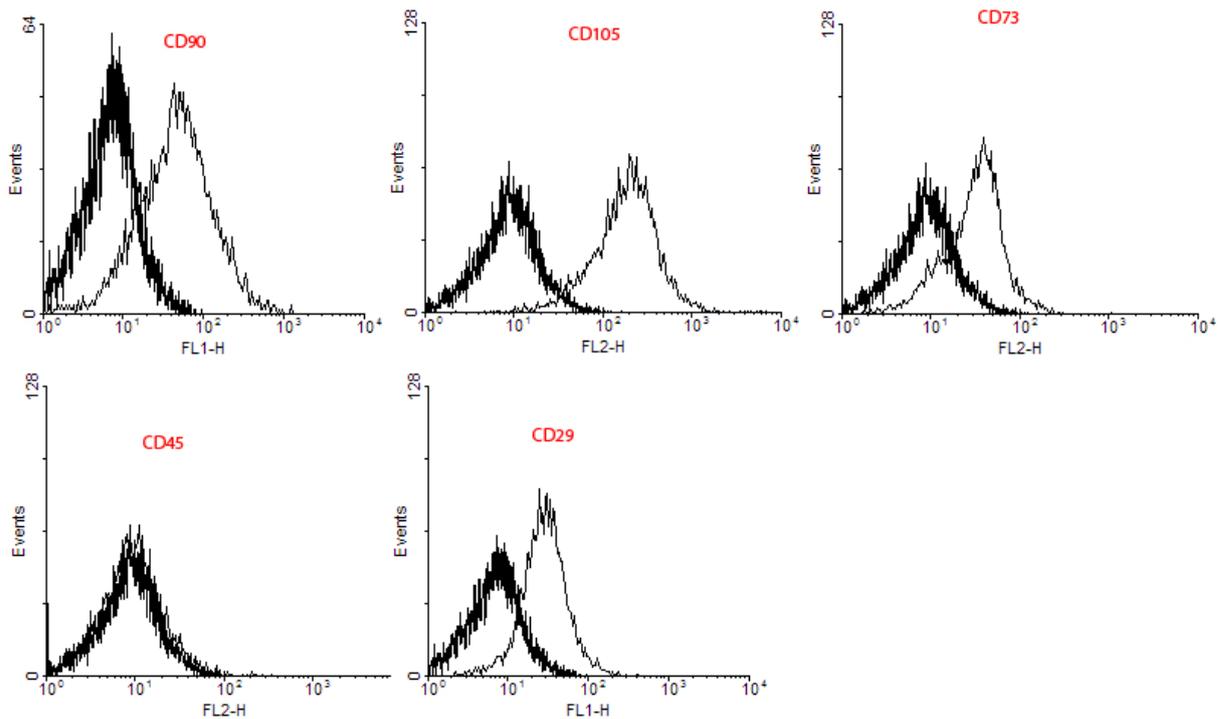


Abb. 8 Durchflusszytometrie: Charakteristische Expression der Oberflächenantigene in Passage P4 (Dargestellt sind die Histogramme im Vergleich zur Negativkontrolle (Isotypenkontrolle, dickere, schwarze Linie)).

Die obige Abbildung (Abb. 8) zeigt die Ergebnisse der Antigenexpression einer höheren Passage (P4). Eine Verschiebung der Histogramme bedeutet ein positiver Nachweis des jeweiligen Markers. Demnach sind die Zellen dieser Passage positiv für CD90, CD105, CD73 und CD29 und negativ für CD45.

4.3.2 Immunfluoreszenz

Neben der Durchflusszytometrie wurde eine weitere Methode zur Charakterisierung der isolierten und kultivierten Zellen durchgeführt. Bei der Immunfluoreszenz wurden die ausgesäten Zellen ebenfalls mit fluoreszierenden Antikörpern markiert. Diese binden an für sie spezifische Antigene. Die Verbindung aus Antigenen und fluoreszierenden Antikörpern wird unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar.

Es konnte gezeigt werden, dass vereinzelte Zellen der Primärisolation (P0) Antikörper binden, die sich gegen endotheliale Antigene richten. Blau leuchtend

ist jeweils der mit DAPI angefärbte Zellkern. DAPI färbt DNA durch Bindung an AT-Basenpaare an.

Die Zellen zeigen eine positive Reaktion mit Antikörpern gegen Pan-CK, CD31, smA und vWF.

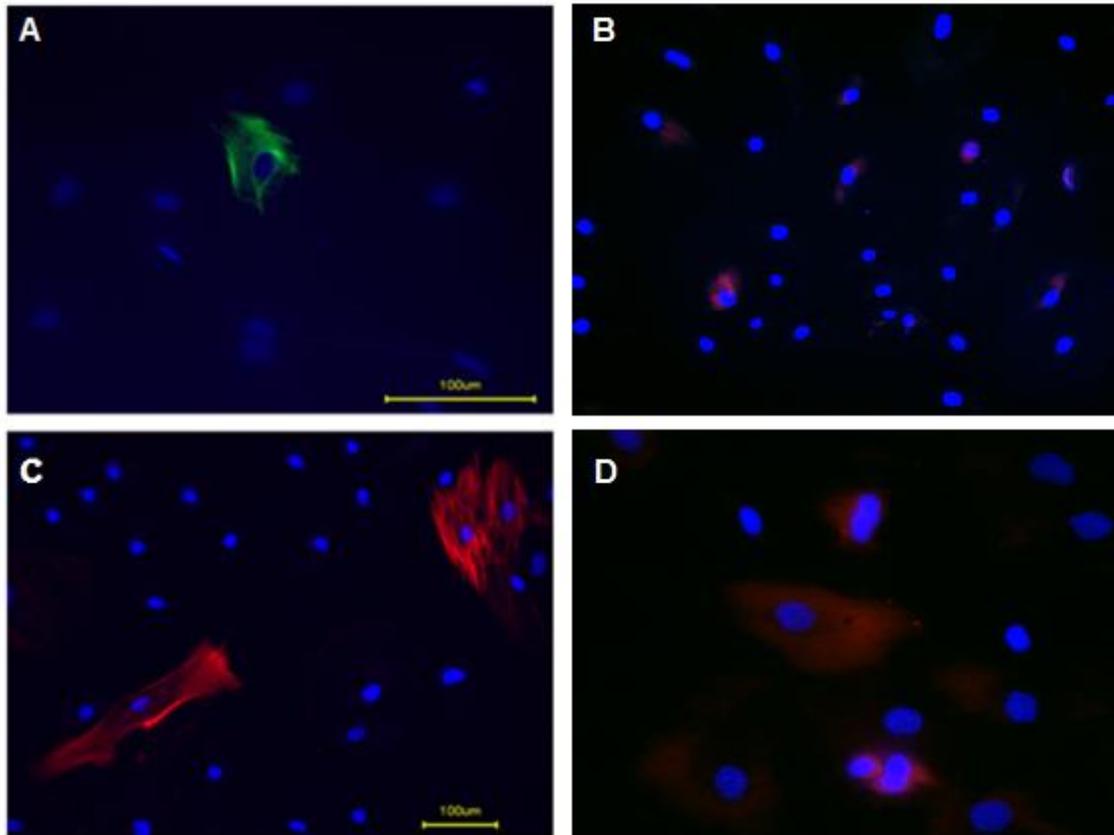


Abb. 9 Immunfluoreszenzfärbung der Passage P0; Antikörperfärbung mit Pan CK (A), CD31 (B), smA (C) und vWF (D). Zellkerne wurden mittels DAPI gegengefärbt (blau dargestellt).

4.4 Einfluss von supplementierten Medien

4.4.1 Ergebnisse der adipogenen, osteogenen und chondrogenen Differenzierung

Die Zellen wurden zwei Wochen mit supplementierten Medien inkubiert. Zur Kontrolle wurden Zellen unter sonst gleichen Bedingungen jedoch nur mit dem Basiskulturmedium (StM) inkubiert. Eine zweite Kontrollreihe wurde mit Synovialfibroblasten angelegt.

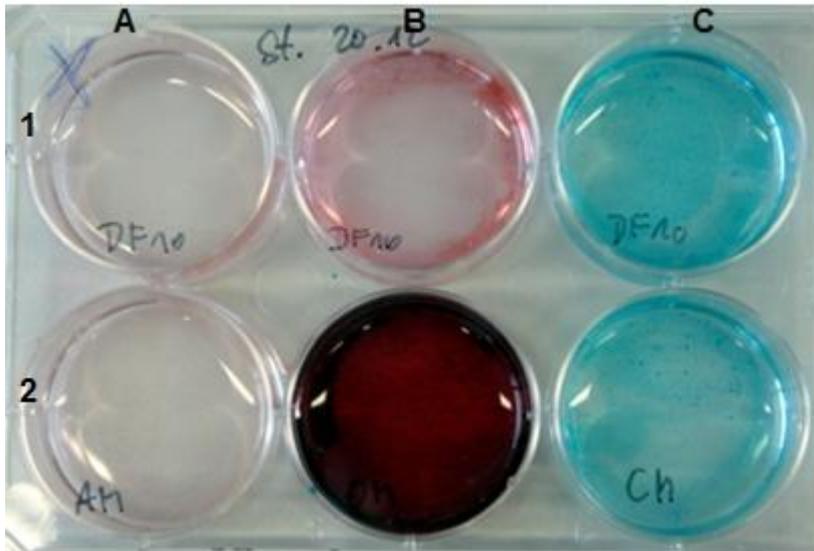


Abb. 10 6-Loch-Platte mit prASC nach der Färbung mit: Oil-Red-O (A, Nachweis adipogener Differenzierung), Alizarin Red S (B, Nachweis osteogener Differenzierung), Alcian Blue (C, Nachweis chondrogener Differenzierung), Kontrollmedium (1), Differenzierungsmedium (2)

Der Nachweis der Differenzierung erfolgte mit Färbemethoden, die für die Differenzierung spezifische Stoffwechselprodukte nachweisen.

4.4.1.1 Einfluss des adipogenen Mediums

Nach zwei Wochen Inkubation mit adipogenem Medium erfolgte zunächst die morphologische Untersuchung der Zellen. Mikroskopisch waren in den Zellen, die mit supplementiertem Medium kultiviert wurden, multiple Vakuolen sichtbar. Diese Vakuolen konnten in der Kontrollreihe nicht nachgewiesen werden. Außerdem wurden sowohl die stimulierten Zellen als auch die Kontrollzellen mit der Oil-Red-O-Färbung angefärbt. Oil-Red-O ist ein fettlöslicher Farbstoff, der lipidgefüllte Vakuolen durch eine rote Farbgebung nachweisen kann. Durch diese Färbung konnten die Ergebnisse der Phasenkontrast-Mikroskopie bestätigt werden.

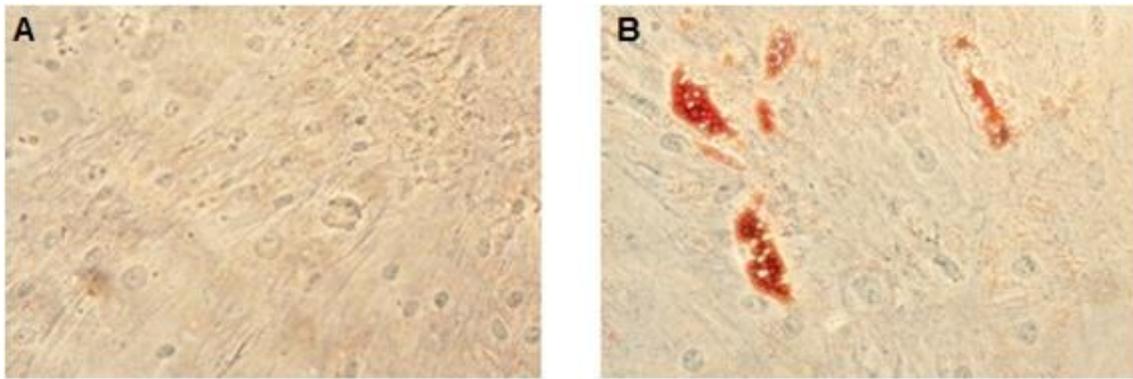


Abb. 11 Oil-Red-O-Färbung: Kontrollzellen (A) und Zellen nach adipogener Differenzierung (B)

Wie in Abbildung 11 sichtbar, sind in den stimulierten Zellen intrazelluläre Lipidvakuolen nachweisbar (Abb. 11 B). Die nicht stimulierten Kontrollkulturen bildeten diese nicht (Abb. 11 A).

4.4.1.2 Einfluss des osteogenen Mediums

Ebenfalls nach zwei Wochen Inkubation erfolgte zunächst die morphologische Untersuchung der osteogen differenzierten Zellen. Mikroskopisch waren nur feine Unterschiede sichtbar, die Kontrollzellen sahen regelmäßiger verteilt aus als die sich teilweise zentral häufenden, stimulierten Zellen. Es folgte der Nachweis durch die Färbung mit Alizarin Red S, welches Komplexe mit Calcium bildet und so die Bildung von kalzifizierter Matrix darstellt. Der Komplex wird so rot angefärbt.

In Abbildung 12 sieht man die Kontrollzellen (Abb. 12 A) im Vergleich mit den osteogen differenzierten Zellen (Abb. 12 B). Beide wurden gleichermaßen mit Alizarin Red S gefärbt, jedoch nur in der Kultur mit den stimulierten Zellen lassen sich osteogene Stoffwechselprodukte durch die deutliche Rotfärbung nachweisen.

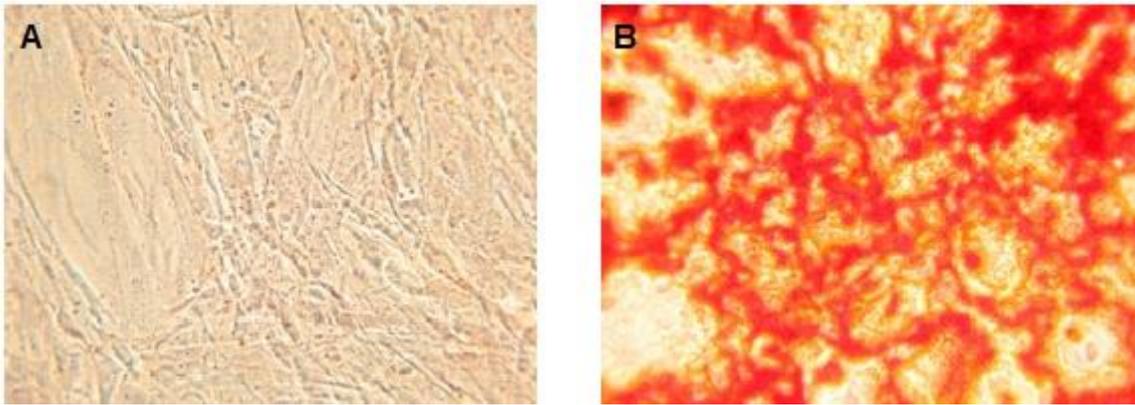


Abb. 12 Alizarin Red Färbung: Kontrollzellen (A) und Zellen nach osteogener Differenzierung (B)

4.4.1.3 Einfluss des chondrogenen Mediums

Analog zur adipogenen und osteogen Stimulation wurden auch die chondrogen stimulierten Zellen nach drei Wochen Inkubation mit supplementiertem Medium bewertet. Bei der makroskopischen Beurteilung war kein sichtbarer Unterschied zwischen den Kontrollzellen und den chondrogen stimulierten Zellen zu sehen. Der Nachweis von chondrogener Extrazellulärmatrix erfolgte mit der Alcian-Blue-Färbung. Diese kann saure Polysaccharide aus der Knorpelmatrix anfärben und somit nachweisen. Nach der Färbung wurde der Unterschied deutlicher. Es waren vereinzelt Inseln mit deutlicher Blaufärbung zu sehen, welche in der Färbung der Kontrollzellen in der gesamten Kammer nicht zu finden waren.

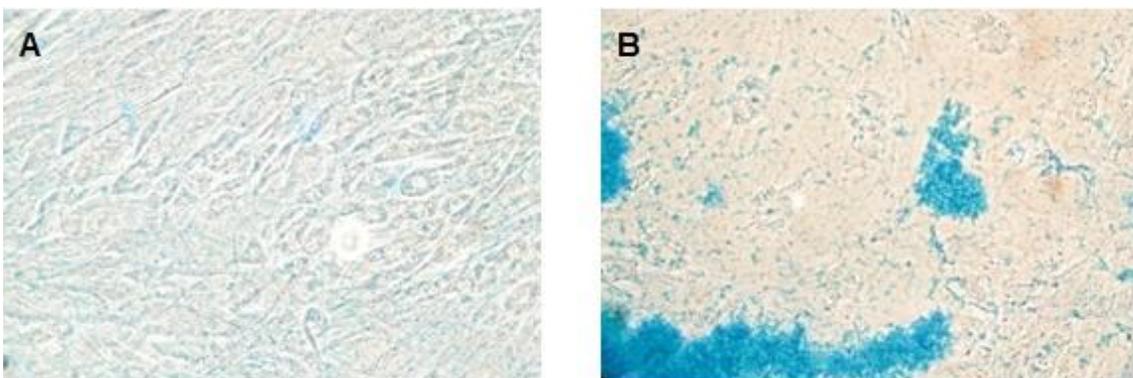


Abb. 13 Alcian Blue Färbung: Kontrollzellen (A) und Zellen nach chondrogener Differenzierung (B)

4.4.1.4 Einfluss supplementierter Medien auf Fibroblasten

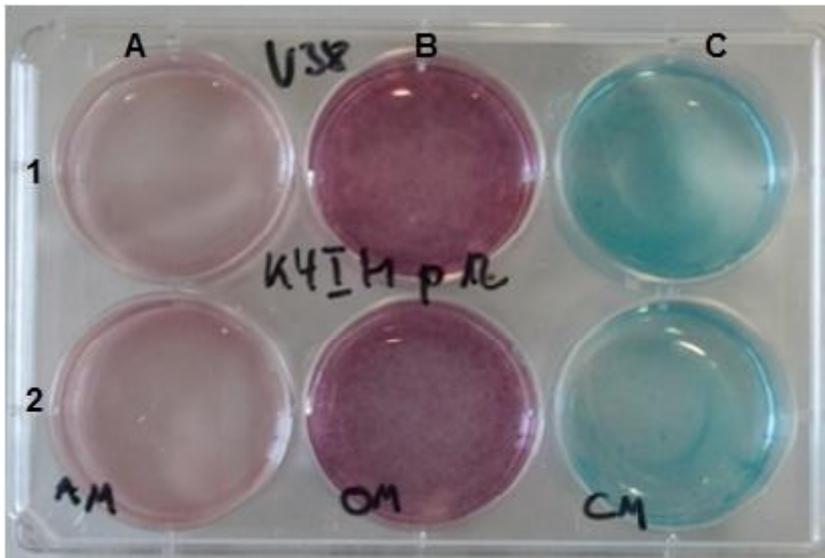


Abb. 14 6-Loch -Platte Synovialfibroblasten K4IM nach cytochemischer Färbung mit: Oil-Red-O (A, Nachweis adipogener Differenzierung), Alizarin Red S (B, Nachweis osteogener Differenzierung), Alcian Blue (C, Nachweis chondrogener Differenzierung), Kontrollmedium (1) Differenzierungsmedium (2)

Ebenso wie prASC wurden auch Fibroblasten auf einer 6-Loch-Platte ausgesät und in Kontroll- (Abb.14, 1) oder Differenzierungsmedium (Abb. 14, 2) kultiviert. Nach zwei Wochen erfolgte die Färbung analog zu prASC. Während bei prASC schon makroskopisch ein Unterschied zwischen unstimulierten und stimulierten Zellen bestand, war bei Fibroblasten kein Unterschied sichtbar. Dieses Bild änderte sich auch unter mikroskopischer Analyse nicht (s. Abb. 15). Es konnten keine für das jeweilige Medium spezifischen Stoffwechselprodukte angefärbt und somit nachgewiesen werden, wie es bei prASCs der Fall war. Nach dreiwöchiger Stimulation mit chondrogenem Medium konnten keine lebenden Fibroblasten nachgewiesen werden (Abb. 15: F). In diesem Medium starben diese Zellen ab.

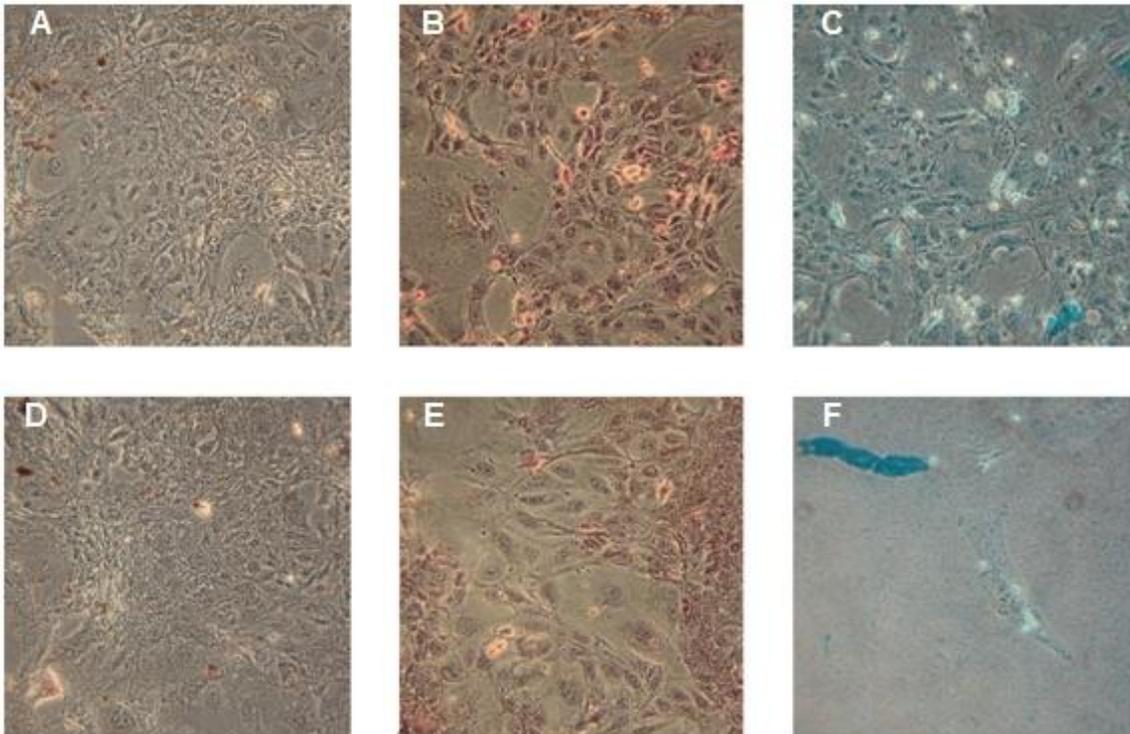


Abb. 15 Mikroskopische Ansicht der Synovialfibroblasten K4IM nach der Färbung mit: Oil-Red-O (A, D), Alizarin Red S (B, E), Alcian Blue (C, F), Inkubation in Kontrollmedium (A-C) und in Differenzierungsmedium (D-F)

4.4.2 Epitheliale Differenzierung

Um den Einfluss verschiedener Induktionsmedien auf die isolierten Zellen zu untersuchen, wurden diese für drei Wochen mit unterschiedlichen supplementierten Medien, sowie dem Kontrollmedium ohne Supplement (StM) inkubiert. Dafür wurden die Zellen zuvor in verschiedenen Zellkulturgefäßen, wie gekammerte Objektträger oder Kulturflaschen, ausgesät und kultiviert.

4.4.2.1 Ergebnisse Immunfluoreszenz

In der Immunfluoreszenz konnte als Resultat der Stimulation eine deutliche Zunahme der CK18-Expression nachgewiesen werden. Die Abbildung 16 zeigt eine Gegenüberstellung der unstimulierten und stimulierten Zellen unter dem

Immunfluoreszenzmikroskop. Die Färbe-Nachweise von ZO-1 und Pan-CK waren nicht verwertbar und werden deshalb an dieser Stelle nicht abgebildet.

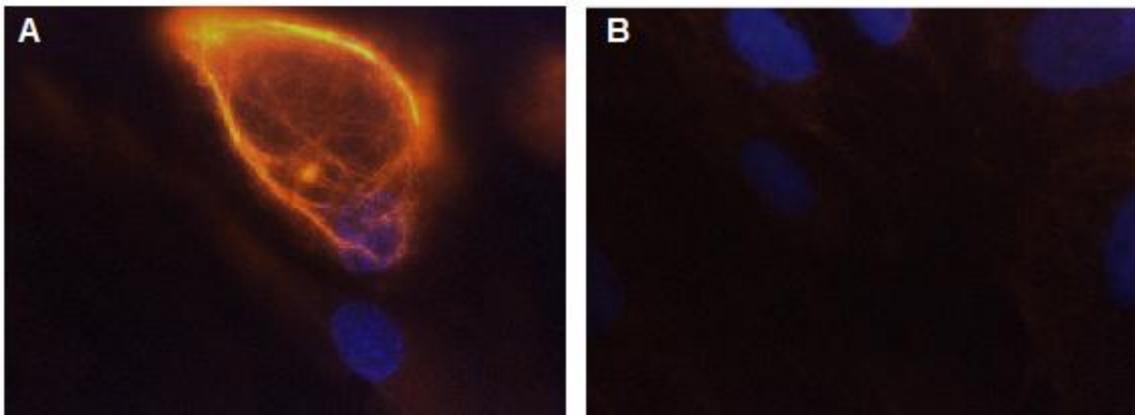


Abb. 16 CK18 positive Zelle nach Kultur in ATRA-haltigem Medium (A) und Kontrollkultur (B, Zellen der Zellkultur in StM)

4.4.2.2 Ergebnisse Western Blot

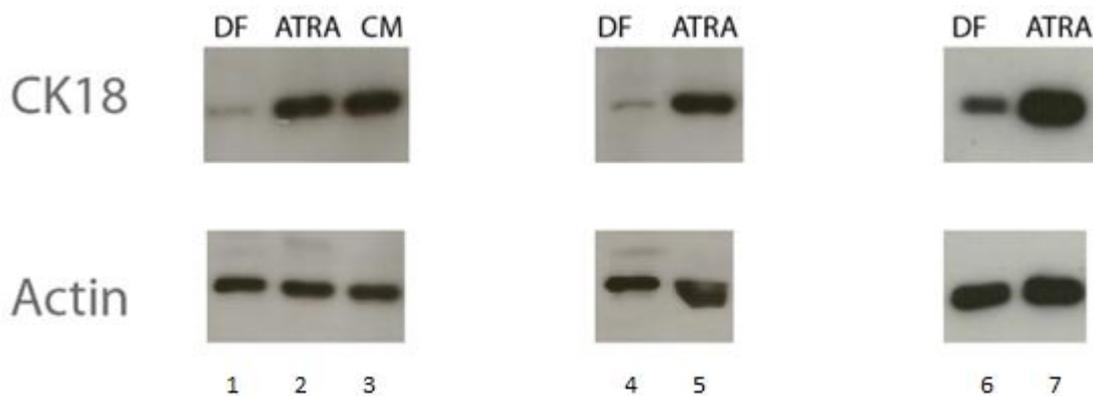


Abb. 17 Auswahl charakteristischer Western Blots nach Kultur von prASC in ATRA-haltigem Medium (3, 5, 7), CM aus TEC (3) und Kontrollmedium DF10 (1, 4, 6): CK18- und Aktin-Expression

Im Western Blot wurde der Einfluss von Differenzierungsmedien auf die Expression von CK18 untersucht. Die Abbildung 17 zeigt charakteristische Western Blots unterschiedlicher Zellisolationen mit Aktin als Kontrolle. Die Proteinanalyse zeigte, dass bei der Kultivierung von ASC in StM nur eine geringe CK18 Expression nachweisbar war. Die Kultivierung in Konditioniertem

Medium aus Tubulusepithelzellen und in ATRA-haltigem Kulturmedium induzierte eine Erhöhung der CK18-Expression.

Das optische Ergebnis wurde durch die densitometrische Auswertung mit ImageJ bestätigt. Bildet man den Quotient aus CK18 zu Aktin, wird deutlich, dass sich das Verhältnis der Proteine bei den stimulierten Zellen in Richtung CK18 verschoben hat. Die Tabelle 10 zeigt die prozentuale Erhöhung der CK18-Expression von prASC nach Inkubation in DF10 mit ATRA verglichen mit der von prASC, die in StM (DF10) kultiviert wurden.

Tab. 10 CK18-Expression von prASC in Prozent in Abhängigkeit vom Medium (DF10; ATRA-haltiges Medium)

	N157 p5	AG P6	AC p3	AG P6	AG P6
DF10	100	100	100	100	100
ATRA	279	303	460	262	130

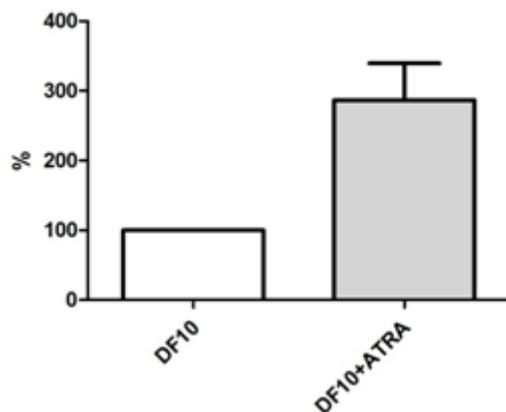


Abb. 18 Densitometrische Auswertung der Western Blots: Proteinexpression von CK18 nach Kultur mit DF10 und mit DF10 + ATRA

4.4.2.3 Ergebnisse qPCR

Mit der qPCR wurde der Einfluss unterschiedlicher Medien auf die Genexpression von CK18 und ZO-1 analysiert. Dafür wurde der relative Expressionsunterschied zwischen Aktin als Referenzgen und den zu beurteilenden Genen CK18 und ZO-1 gebildet.

Die quantitative Auswertung der qPCR ist in der Abbildung 19 dargestellt. Die CK18-Expression erhöhte sich nach der Kultivierung mit ATRA-haltigem Medium signifikant. GFmix hingegen bewirkte keine Erhöhung der CK18 Genexpression. ZO-1 wurde unter dem Einfluss von ATRA ebenfalls signifikant erhöht exprimiert. GFmix führte zwar zu einer Steigerung der Genexpression verglichen mit der Kontrolle, diese war jedoch nicht signifikant.

Der Wnt-4-Nachweis erbrachte kein statistisch eindeutiges Ergebnis, weshalb auf eine Darstellung an dieser Stelle verzichtet wurde.

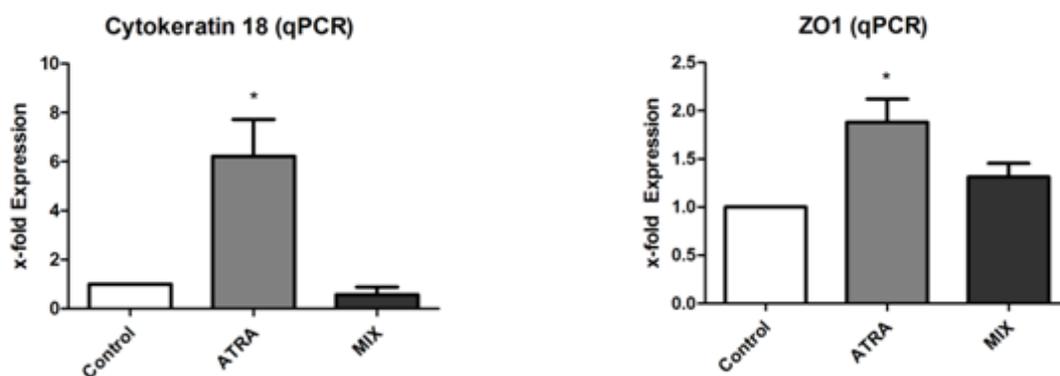


Abb. 19 Auswertung qPCR von prASC nach Kultivierung mit ATRA und GFmix (MIX), untersucht wurden die Gene CK18 und ZO-1 (n=6 für CK18; n=4 für ZO-1)(* = statistisch signifikant, p-Werte < 0,05)

5 Diskussion

MSC kommen in allen Organen und Geweben vor [54], dennoch ist das perirenale Fettgewebe als Quelle für MSC (oder im Speziellen ASC) kaum beschrieben. Ein möglicher Grund dafür ist, dass das Fettgewebe nicht ohne Weiteres gewonnen werden kann und für die Entnahme ein Eingriff im perirenalen Raum indiziert sein muss. Demnach ist Liposuktionsaspirat als Zellquelle einfacher zugänglich und folglich besser erforscht. In einem Vergleich von MSC aus unterschiedlichen Geweben konnte jedoch gezeigt werden, dass MSC aus perirenalem Fettgewebe, ebenso wie aus Herz- und Milzgewebe, die gleiche fibroblastoide Morphologie und die gleichen phänotypischen Merkmale aufweisen wie BM-MSC. Somit ist perirenales Fettgewebe eine weitere geeignete Quelle für die Isolation von ASC [55].

Die Isolierung von prASC konnte nach dem gleichen, bereits etablierten Protokoll wie ASC aus Liposuktionsaspirat erfolgen. Jedoch konnten nicht alle Isolationen erfolgreich kultiviert werden. Die Zellen stammten von morbiden Spendern, die aufgrund einer malignen Erkrankung nephrektomiert werden mussten. Variabilität in Geschlecht, Gewicht, Alter und Tumordignität könnte neben genetischen Faktoren eine Erklärung für die unzureichende Wachstumsfähigkeit mancher Isolationen sein.

5.1 Isolation, Morphologie und Charakterisierung von prASC

Die kultivierten Zellen zeigten die typische für MSC spindelförmige, fibroblastenartige Morphologie, wobei sich in frühen Passagen noch Zellnester mit einem endothel- und apipozyten-ähnlichen Erscheinungsbild zeigten. Es folgte die Analyse der Zellen, die morphologisch Endothelzellen ähneln, mittels Immunfluoreszenzfärbung. Die Darstellung der Färbung durch Immunfluoreszenzmikroskopie zeigte positive Zellen für α -smA, CD31 und vWF. α -smA ist Teil des kontraktilen Komplexes von Myofibroblasten. Diese liegen dem Kapillarendothel an und können durch ihre Kontraktionsfähigkeit den Blutfluss regulieren [56, 57]. Das Glykoprotein vWF wird ausschließlich in Endothelzellen

und Megakaryozyten synthetisiert und wird in Weibel-Palade-Körpern gespeichert. Es spielt eine wichtige Rolle in der Blutgerinnung [58]. Demnach handelt es sich hierbei um für Endothelzellen und ihnen anliegendes Gewebe klassische Marker, der mittels Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen werden konnten und lassen folgern, dass das Zellisolat Endothelzellen enthielt. Dieses zunächst heterogene Zellbild mit endothelialen und fibroblastären Anteilen wurde jedoch mit zunehmender Passage homogener.

Zur Charakterisierung der isolierten Zellen erfolgte dann die Untersuchung ihrer Oberflächenepitope mittels Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenzfärbung. Der positive Nachweis der Oberflächenantigene CD73, CD90, CD105, CD44, CD29, CD166 bei prASC und die fehlende Expression von CD31, CD11b, CD13 sowie CD45 in der Durchflusszytometrie entspricht dem Expressionsmuster von MSC, wie es bereits in der Literatur beschrieben wurde [10]. Das Glykoprotein CD31 wird von Endothelzellen, Thrombozyten und Zellen der Immunabwehr (Makrophagen, T- und B-Zellen) exprimiert und zählt zu den Endothelzellmarkern [59, 60]. CD11b gehört zu den Integrinen, die von Leukozyten (z. B. Makrophagen) exprimiert werden. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Zelladhäsion sowie zellulären Vorgängen wie Phagozytose und perizellulärer Proteolyse. CD11b kann folglich zur Identifizierung von hämatopoietischen Zellen genutzt werden [61, 62]. Bei CD13 handelt es sich um die Aminopeptidase N, einer Membran gebundenen Metalloproteinase. Sie kommt sowohl auf der Zelloberfläche von normalen und malignen myeloischen Zellen als auch auf Mikrovilli-Membranen des Dünndarms und im proximalen Tubulus der Niere vor. Je nach Lokalisation ist sie an Wachstums- und Differenzierungsprozessen von hämatopoietischen und epithelialen Zellen beteiligt. Ein Defekt im Gen von CD13 scheint außerdem kausal für Formen von Leukämie und Lymphomen zu sein [63, 64]. CD45 ist ebenfalls ein klassischer Marker, der zum Ausschluss oder Nachweis von hämatopoietischen Zellen genutzt werden kann. Bei CD45 handelt es sich um eine Protein-Tyrosin-Phosphatase. Sie wird von hämatopoietischen Zellen und Lymphozyten exprimiert und ist an Vorgängen des Zellzyklus und Zellwachstums beteiligt [39]. Die fehlende Expression von CD31, CD11b, CD13 und CD45 in der

Durchflusszytometrie zeigt folglich, dass keine Verunreinigung mit hämatopoietischen Vorläuferzellen vorlag.

Eine weitere Eigenschaft von MSC und folglich auch ASC ist ihre Fähigkeit unter Kultivierung in supplementierten Medien in Adipozyten, Chondrozyten sowie Osteozyten zu differenzieren („Tri-Lineage“ Differenzierung). Nach 14 Tagen konnte die Differenzierung der prASC in die drei verschiedenen Zelllinien nachgewiesen werden. Der positive Nachweis erfolgte cytochemisch durch charakteristische Färbungen. Die Lipidvakuolen der Adipozyten ließen sich mit dem fettlöslichen Farbstoff Oil-Red-O rot anfärben. Ebenfalls rot gefärbt war der Komplex von Alizarin Red S und calciumhaltiger Matrix der Osteozyten. Der blaue Farbnachweis von Polysacchariden in der Extrazellulärmatrix von Chondrozyten erfolgte mit der Alcian-Blue-Färbung. Mit der Darstellung dieser Differenzierungswege war ein weiteres wichtiges Charakteristikum von MSC erfüllt.

5.2 Epitheliale Differenzierung von prASC durch ATRA-haltiges Medium

Seit der erstmaligen Beschreibung von ASC und ihrem Differenzierungspotential durch Zuk et al. 2001 wurden viele weitere Möglichkeiten erforscht, in welche Zellen ASC differenzieren können und wie diese Differenzierung induziert werden kann. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass ASC zu Epithelzellen differenzieren können, wenn sie in retinoidhaltigen Medien (ATRA) oder konditioniertem Medium von Nierentubulusepithelzellen kultiviert werden [65].

ATRA ist ein aktiver Metabolit des Vitamin A und gehört zu den Retinoiden. Retinoide haben in Vertebraten wichtige Funktionen für das Wachstum und die Differenzierung von Geweben [66]. Brzoska et al. zeigten, dass nach zehntägiger Kultivierung von ASC mit 5 µM ATRA, diese Cytokeratin 18 exprimierten. Während die Synthese von CK18 anstieg, konnte eine Reduktion der Vimentin-Expression gemessen werden [67]. Dieses Resultat ist als erster

Schritt zur epithelialen Differenzierung zu werten, da das Intermediärfilament Vimentin ausschließlich in Zellen mesenchymalen Ursprungs exprimiert wird [68].

Auch in der vorliegenden Arbeit wurde ATRA-haltiges Medium zur Stimulation von prASC zur Differenzierung in Epithelzellen verwendet. Es folgte nach zwei- bis dreiwöchiger Kultur in Induktionsmedien der Nachweis von Markern, die für Epithelzellen charakteristisch sind. Der Nachweis erfolgte mittels Immunfluoreszenzfärbung, Western Blot und qPCR, mit dieser wurden die Zellen auf die Expression von beta-Aktin, CK18, ZO-1 und wnt-4 untersucht.

Aktine, hier das nicht-muskuloskelettales beta-Aktin, gehören zu den hoch konservierten Proteinen. Sie sind beteiligt an der Zellbeweglichkeit sowie der Struktur und Integrität der Zelle. Zudem sind sie ein Hauptbestandteil des kontraktiven Apparates [69]. Ihr ubiquitäres Vorkommen erlaubt die Verwendung von Aktinen als Haushalts-Gen (housekeeping gene). Diese Gene werden in Zellen aller Gewebe exprimiert und bilden das basale Transkriptom für die Aufrechterhaltung der grundlegenden zellulären Funktionen [70]. Folglich konnte Aktin für die Auswertung der Western Blots und zur Normalisierung der Werte in der qPCR genutzt werden.

Bei CK18 handelt es sich um ein Typ I Intermediärfilament. CK18 ist charakteristisch für Zellen von einschichtigen Epithelien und essenziell für eine normale Gewebestruktur und -funktion. Somit bildet CK18 einen wichtigen Marker zur Identifizierung von Epithelzellen [71]. Während CK18 als Intermediärfilament der Zellstabilität dient, kommt ZO-1 eine wichtige Bedeutung in der Barrierefunktion von Epithelien zu. ZO-1 ist ein weiterer wichtiger Epithelzellmarker. Das Molekül ist ein Polypeptid und Bestandteil der durch Tight junctions gebildeten Verschlusskontakte. Auf der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran gelegen, ist seine wichtigste Funktion die Regulation der Claudinpolymerisation in Epithelzellen [72].

Bei Wnt-4 handelt es sich um ein Signalmolekül, welches in den Nephronen der sich entwickelnden kortikalen Zone exprimiert wird und für seine Funktion bei der Nephrogenese bekannt ist. Es wird in mesenchymalen Aggregaten exprimiert und ist bei der epithelialen Konversion des metanephrischen Mesenchyms ein essentieller Faktor für die renale Tubulibildung. Darüber hinaus wird das Wnt-4-Gen auch im sich differenzierenden periureteralem

Stroma in der Medullarregion der embryonalen Niere exprimiert. Das legt nahe, dass Wnt-4 ein Signalgeber für die Steuerung der Differenzierung des periureteralen medullären Stromas ist [73]. Die Analyse der Wnt-4-Expression mittels qPCR erbrachte keine eindeutigen Ergebnisse, dennoch soll Wnt-4 aus den oben genannten Gründen in der vorliegenden Arbeit erörtert werden.

Der Nachweis mittels Immunfluoreszenzfärbungen zeigte CK18 positive Zellen, welche in der Kontrollkultur nicht dargestellt werden konnten. Es konnte somit, ebenso wie von Brzoska et al. [67], gezeigt werden, dass die Expression von CK18 unter dem Einfluss von ATRA deutlich ansteigt. CM führte ebenfalls zu einer Erhöhung von CK18. Der Einfluss von CM aus proximalen Tubulusepithelzellen auf ASC wurde von Baer et al. untersucht [65]. Es konnte gezeigt werden, dass CM die CK18-Expression induziert, gleichzeitig kam es zu einer Abnahme der Expression des positiven Stammzellmarkers CD49a.

Ein ebenfalls positiver Nachweis für die Expression von CK18 erfolgte mithilfe des Western Blots. Die densitometrische Auswertung des Western Blots zeigte einen Anstieg von CK18 auf das bis zu 4,6-fache unter dem Einfluss von ATRA verglichen mit der Kultivierung im StM und zu einer durchschnittlichen Erhöhung der CK18-Expression um 287 %. Zu einem damit übereinstimmenden Ergebnis führte die qPCR. Die Ergebnisse zeigten einen signifikanten Anstieg der Genexpression für CK18 unter dem Einfluss von ATRA in einer Konzentration von 5 μ M. Des Weiteren konnte ein signifikanter Anstieg der Expression von ZO-1 nachgewiesen werden. Die Kultivierung der Zellen in GFmix führte zu keiner Erhöhung der CK18-RNA, jedoch zu einem Anstieg der ZO-1 Genexpression. Diese Ergebnisse beweisen eindeutig eine Differenzierung von prASC in die epitheliale Linie.

Eine aktuelle Studie kam zu ähnlichen Ergebnissen. Sie zeigt ebenfalls, dass ASC unter dem Einfluss von ATRA zu Epithel-ähnlichen Zellen differenzieren können [74]. Als Beweis für die Differenzierung erfolgte der Nachweis von CK19, einem weiteren Marker für Epithelien. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass diese Epithelzellen einige Charakteristika von Stammzellen beibehielten und in osteogener Richtung transdifferenzieren konnten. Weitere Studien zeigten außerdem, dass der Zusatz von Aktivin A und BMP-7 [75], oder die

Kultivierung von MSC auf einem Gel aus Kollagen Typ I [76], den Effekt von ATRA auf die CK18-Expression synergistisch beeinflussen können.

In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass die untersuchten humanen prASC in vitro eindeutig in epithelialer Richtung differenzieren können. Unter dem Einfluss von ATRA-supplementierten Medien exprimieren die kultivierten Zellen Genprodukte, die Epithelzellen eindeutig zuzuordnen sind.

6 Zusammenfassung

Die Relevanz von MSC aus Fettgewebe (ASC) in der regenerativen Medizin überrascht in Anbetracht ihrer breit gefächerten Eigenschaften nicht. Neben antiinflammatorischen Eigenschaften und Hypoxieresistenz können sie in eine Vielzahl von Geweben differenzieren und in geschädigtes Gewebe migrieren, wo sie an Reperaturvorgängen beteiligt sind. Dabei stehen unterschiedliche Quellen zur Isolierung von MSC (und ASC) zur Verfügung. Um ASC therapeutisch einsetzen zu können, ist es essentiell ihre Quellen und ihr Potenzial zu erforschen.

Es konnte gezeigt werden, dass perirenales Fettgewebe eine geeignete Quelle für ASC (prASC) darstellt. Der Nachweis der Oberflächenantigene CD73, CD90 und CD105 mittels Durchflusszytometrie sowie die Fähigkeit der prASC an Zellkulturplastik zu adhären, erlauben die Schlussfolgerung, dass es sich bei den nach einem bereits etablierten Verfahren isolierten Zellen um MSC handelt. Außerdem konnte durch eine zweiwöchige Kultivierung der prASC in supplementierten Medien die Differenzierung in Adipozyten, Chondrozyten sowie Osteozyten induziert werden. Der Nachweis erfolgte durch cytochemische Färbemethoden.

In dieser Arbeit wurde die Differenzierung von prASC in Epithelzellen untersucht. Dafür wurden die Zellen in unterschiedlichen ATRA-haltigen Kulturmedien und konditioniertem Medium aus Tubulusepithelzellen kultiviert. Der Einfluss der Medien wurde mittels Western Blot, qPCR und Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen. Die Kultivierung mit ATRA führte zu einer signifikanten Erhöhung der Expression von CK18 und ZO-1. Dabei handelt es sich um Marker, die charakteristisch für Epithelzellen sind. Es konnte folglich gezeigt werden, dass humane prASC in vitro eindeutig in epithelialer Richtung differenzieren können. Unter dem Einfluss von ATRA-supplementierten Medien exprimierten die kultivierten Zellen Genprodukte, die Epithelzellen zuzuordnen sind.

Welche Bedeutung diese Erkenntnis hat ist noch unklar. Möglicherweise sind prASC, als Stammzellen aus Nischen mit anatomischer Nähe zu den Nieren, potente Kandidaten, um untergegangenes Nierengewebe, wie beispielsweise Tubulusepithelzellen, zu ersetzen.

7 Abstract

The relevance of MSC from adipose tissue (ASC) in regenerative medicine is not surprising in view of its wide-ranging properties. In addition to anti-inflammatory effects and their resistance to hypoxic conditions, they can differentiate into a variety of tissues and migrate to damaged tissue, where they are involved in repair processes. Different sources for the isolation of MSC and ASC are available. To use ASC therapeutically, it is essential to investigate their sources and their potential.

In this study it was shown that perirenal adipose tissue is a suitable source of ASC (prASC). The detection of surface antigens CD73, CD90 and CD105 by flow cytometry and the ability of prASC to adhere to plastic, allows the conclusion that the cells, isolated according to established procedures, are indeed MSC. In addition, the differentiation in adipocytes, chondrocytes and osteocytes could be induced by a two-week cultivation of prASC in supplemented media. Detection was by cytochemical stainings.

The differentiation of prASC in epithelial cells was tested. For the tests, the cells were cultured in different ATRA-containing culture media and conditioned medium from renal tubular epithelial cells. The influence of the media was shown by western blotting, qPCR and immunofluorescence staining. The cultivation with ATRA led to a significant increase in the expression of CK18, and ZO-1. These are markers which are characteristic of epithelial cells. It could therefore be shown that human prASC can differentiate into epithelial cells in vitro. Under the influence of ATRA-supplemented media, the cultured cells expressed genes that can definitely be assigned epithelial cells.

The impact of this knowledge is still unclear. PrASC, as mesenchymal stem cells of a niche with anatomical proximity to the kidneys, may be potent candidates to replace damaged kidney tissue such as tubular epithelial cells.

Literaturverzeichnis

- [1]. Gstraunthaler G et al. Stammzellen und Tissue Engineering in *Zell- und Gewebekultur*. Springer Berlin Heidelberg; 2013:243-244.
- [2]. Greber B, Schöler H. Durchbruch in der Stammzellforschung? in *Bundesgesundheitsblatt Forschung mit humanen embryonalen Stammzellen*, Springer Medizin; .2008/09:1005-1013
- [3]. Thomson JA, Eldor JI, Shapiro SS, et al. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science* 1998; 282:1145-1147.
- [4]. Löser P, Mertens G, Felberbaum R. Forschung mit humanen embryonalen Stammzellen in Deutschland. in *Gynäkologische Endokrinologie*. Springer Berlin Heidelberg; 2012:227-237.
- [5]. <http://www.drze.de/im-blickpunkt/stammzellen/ethische-diskussion>. *Deutsches Referenzzentrum für Ethik in den Biowissenschaften*. Zitat vom: 22. November 2015.
- [6]. Nae S, Bordeianu I, Stancioiu AT, Antohi N. Human adipose-derived stem cells: definition, isolation, tissue-engineering applications. *Rom J Morphol Embryol*. 2013;54(4):919-24.
- [7]. <http://stemcells.nih.gov/info/basics/pages/basics5.aspx>. *National Institutes of Health*. Zitat vom: 22. November 2015.
- [8]. Wei X, Yang X, Han ZP, Qu FF, Shao L, Shi YF. Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacol Sin*. 2013 Jun;34(6):747-54.
- [9]. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*. 1970 Oct;3(4):393-403.
- [10]. 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. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
- [11]. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Mol Biol Cell*. 2002 Dec;13(12):4279-95.
- [12]. Schulze S. *Kurzlehrbuch Embryologie*. 1st ed. München: Urban und Fischer; 2006:50

- [13]. Hass R, Kasper C, Böhm S, Jacobs R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal*. 2011 May 14;9:12.
- [14]. Jeon ES, Park WS, Lee MJ, Kim YM, Han J. A Rho kinase/myocardin-related transcription factor-A-dependent mechanism underlies the sphingosylphosphorylcholine-induced differentiation of mesenchymal stem cells into contractile smooth muscle cells. *Circ Res*. 2008 Sep 12;103(6):635-42.
- [15]. Lee JH, Kemp DM. Human adipose-derived stem cells display myogenic potential and perturbed function in hypoxic conditions. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Mar 17;341(3):882-8.
- [16]. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest*. 1999 Mar;103(5):697-705.
- [17]. Staudinger U, Häfner H. *Was ist Alter(n)?: Neue Antworten auf eine scheinbar einfache Frage*. 1st ed. Berlin Heidelberg: Springer Verlag; 2008. (S. 39).
- [18]. Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, et al. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest*. 2002 May;109(10):1291-302.
- [19]. Aurich I, Mueller LP, Aurich H, et al. Functional integration of hepatocytes derived from human mesenchymal stem cells into mouse liver. *Gut*. 2007 Mar;56(3):405-15.
- [20]. Suzukia H, Taguchia T, Tanakaa H, et al. Neurospheres induced from bone marrow stromal cells are multipotent for differentiation into neuron, astrocyte, and oligodendrocyte phenotypes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Sep 24;322(3):918-22.
- [21]. Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, et al. Adult Bone Marrow Stromal Cells Differentiate into Neural Cells in Vitro. *Exp Neurol*. 2000 Aug;164(2):247-56.
- [22]. 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 Mar 24;341(4):1135-40.
- [23]. Ikhapoh IA, Pelham CJ, Agrawal DK. Sry-type HMG box 18 contributes to the differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to endothelial cells. *Differentiation*. 2015 Mar-Apr;89(3-4):87-96.
- [24]. Oswald J, Boxberger S, Jørgensen B, et al. Mesenchymal Stem Cells Can Be Differentiated Into Endothelial Cells In Vitro. *Stem Cells*. 2004;22(3):377-84.

- [25]. Baer PC. Adipose-Derived Stem Cells and Their Potential to Differentiate into the Epithelial Lineage. *Stem Cells Dev.* 2011 Oct;20(10):1805-16.
- [26]. Kim N, Cho SG. Clinical applications of mesenchymal stem cells. *Korean J Intern Med.* 2013 Jul; 28(4): 387–402.
- [27]. Maccario R, Podestà M, Moretta A, et al. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica.* 2005 Apr;90(4):516-25.
- [28]. Barbet R, Peiffer I, Hutchins JR, Hatzfeld A, Garrido E, Hatzfeld JA. Expression of the 49 human ATP binding cassette (ABC) genes in pluripotent embryonic stem cells and in early and late-stage multipotent mesenchymal stem cells. *Cell Cycle.* 2012 Apr 15;11(8):1611-20.
- [29]. Vasiliou V, Vasiliou K, Nebert DW Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Hum Genomics.* 2009 Apr;3(3):281-90.
- [30]. Lee JS, Park JC, Kim TW, et al. Human bone marrow stem cells cultured under hypoxic conditions present altered characteristics and enhanced in vivo tissue regeneration. *Bone.* 2015 Sep;78:34-45.
- [31]. Balkwill F. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer.* 2004 Jul;4(7):540-50.
- [32]. Chen DR, Lu DY, Lin HY, Yeh WL. Mesenchymal Stem Cell-Induced Doxorubicin Resistance in Triple Negative Breast Cancer. *Biomed Res Int.* 2014;2014:532161.
- [33]. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001 Apr;7(2):211-28.
- [34]. Zilles K, Tillmann BN. *Anatomie.* Heidelberg: Springer; 2010.
- [35]. Kuhbier JW, Weyand B, Radtke C, Vogt PM, Kasper C, Reimers K. Isolation, Characterization, Differentiation, and Application of Adipose-Derived Stem Cells. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2010;123:55-105.
- [36]. Schäffler A, Büchler C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells—basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells.* 2007 Apr;25(4):818-27.
- [37]. Strioga M, Viswanathan S, Darinskas A, Slaby O, Michalek J. Same or Not the Same? Comparison of Adipose Tissue-Derived Versus Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem and Stromal Cells. *Stem Cells Dev.* 2012 Sep 20;21(14):2724-52.

- [38]. Mohammadi Z, Afshari JT, Keramati MR, et al. Differentiation of adipocytes and osteocytes from human adipose and placental mesenchymal stem cells. *Iran J Basic Med Sci.* 2015 Mar;18(3):259-66.
- [39]. Altin JG, Sloan EK. The role of CD45 and CD45-associated molecules in T cell activation. *Immunol Cell Biol.* 1997 Oct;75(5):430-45.
- [40]. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res.* 2007 May 11;100(9):1249-60.
- [41]. Schofield, R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells.* 1978;4(1-2):7-25.
- [42]. Jones DL, Wagers AJ. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 Jan;9(1):11-21.
- [43]. Eliasson P, Jönsson JI. The Hematopoietic Stem Cell Niche: Low in Oxygen but a Nice Place to be. *J Cell Physiol.* 2010 Jan;222(1):17-22.
- [44]. Borovski T, De Sousa E Melo F, Vermeulen L, Medema JP. Cancer Stem Cell Niche: The Place to Be. *Cancer Res.* 2011 Feb 1;71(3):634-9..
- [45]. Feng Y, Zhu M, Dangelmajer S, et al. Hypoxia-cultured human adipose-derived mesenchymal stem cells are non-oncogenic and have enhanced viability, motility, and tropism to brain cancer. *Cell Death Dis.* 2015 Jun 25;6:e1797.
- [46]. Karp JM, Leng Teo GS. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell Stem Cell.* 2009 Mar 6;4(3):206-16.
- [47]. Renz-Polster H, Kautzig S. *Basislehrbuch Innere Medizin.* 4th ed. München: Urban und Fischer. 2008:994-1000.
- [48]. Peng L, Xie DY, Lin BL, et al. Autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in liver failure patients caused by hepatitis B: short-term and long-term outcomes. *Hepatology.* 2011 Sep 2;54(3):820-8.
- [49]. Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, et al. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell Stem Cell.* 2009 Jul 2;5(1):54-63.
- [50]. 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 Jul;15(7):1794-804.

- [51]. Chen YT, Sun CK, Lin YC, et al. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell Protects Kidneys against Ischemia-Reperfusion Injury through Suppressing Oxidative Stress and Inflammatory Reaction. *J Transl Med.* 2011 May 5;9:51.
- [52]. Zhang W, Liu L, Huo Y, Yang Y, Wang Y. Hypoxia-Pretreated Human MSCs Attenuate Acute Kidney Injury through Enhanced Angiogenic and Antioxidative Capacities. *Biomed Res Int.* 2014;2014:462472.
- [53]. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001 May 1; 29(9): e45.
- [54]. da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci.* 2006 Jun 1;119(Pt 11):2204-13.
- [55]. Hoogduijn MJ, Crop MJ, Peeters AM, et al. Human Heart, Spleen, and Perirenal Fat-Derived Mesenchymal Stem Cells Have Immunomodulatory Capacities. *Stem Cells Dev.* 2007 Aug;16(4):597-604.
- [56]. Hinz B, Celetta G, Tomasek JJ, Gabbiani G, Chaponnier C. Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Mol Biol Cell.* 2001 Sep;12(9):2730-41.
- [57]. Jester JV, Petroll WM, Barry PA, Cavanagh HD. Expression of alpha-Smooth Muscle (α -SM) Actin During Corneal Stromal Wound Healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995 Apr;36(5):809-19.
- [58]. Müller AM, Hermanns MI, Skrzynski C, Nesslinger M, Müller KM, Kirkpatrick CJ. Expression of the Endothelial Markers PECAM-1, vWf, and CD34 in Vivo and in Vitro. *Exp Mol Pathol.* 2002 Jun;72(3):221-9.
- [59]. Pusztaszeri MP, Seelentag W, Bosman FT. Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues. *J Histochem Cytochem.* 2006 Apr;54(4):385-95. 2006.
- [60]. Newman PJ, Berndt MC, Gorski J, et al. PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science.* 1990 Mar 9;247(4947):1219-22.
- [61]. Zhang QQ, Hu XW, Liu YL, et al. CD11b deficiency suppresses intestinal tumor growth by reducing myeloid cell recruitment. *Sci Rep.* 2015 Nov 3;5:15948.
- [62]. Kanse SM, Matz RL, Preissner KT, Peter K. Promotion of Leukocyte Adhesion by a Novel Interaction Between Vitronectin and the beta 2 Integrin Mac-1 (α M β 2, CD11b/CD18). *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004 Dec;24(12):2251-6.

- [63]. Shapiro LH, Ashmun RA, Roberts WM, Look AT. Separate promoters control transcription of the human aminopeptidase N gene in myeloid and intestinal epithelial cells. *J Biol Chem*. 1991 Jun 25;266(18):11999-2007.
- [64]. Kraguljac N, Marisavljevic D, Jankovic G. Characterization of CD13 and CD33 surface antigen-negative acute myeloid leukemia. *Am J Clin Pathol*. 2000 Jul;114(1):29-34.
- [65]. Baer PC, Bereiter-Hahn J, Missler C, et al. Conditioned medium from renal tubular epithelial cells initiates differentiation of human mesenchymal stem cells. *Cell Prolif*. 2009 Feb;42(1):29-37.
- [66]. Doenecke D, Koolman J, Fuchs G, Gerok W. *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie*. 15th ed. Stuttgart: GeorgThieme Verlag. 2005:338.
- [67]. Brzoska M, Geiger H, Gauer S, Baer P. Epithelial differentiation of human adipose tissue-derived adult stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Apr 29;330(1):142-50.
- [68]. Colucci-Guyon E, Portier MM, Dunia I, Paulin D, Pournin S, Babinet C. Mice lacking vimentin develop and reproduce without an obvious phenotype. *Cell*. 1994 Nov 18;79(4):679-94.
- [69]. Lin J, Redies C. Histological evidence: housekeeping genes beta-actin and GAPDH are of limited value for normalization of gene expression. *Dev Genes Evol*. 2012 Nov;222(6):369-76.
- [70]. Zhu J, He F, Hu S, Yu J. On the nature of human housekeeping genes. *Trends Genet*. 2008 Oct;24(10):481-4.
- [71]. Schweizer J, Bowden PE, Coulombe PA, et al. New consensus nomenclature for mammalian keratins. *J Cell Biol*. 2006 Jul 17;174(2):169-74.
- [72]. Bauer H, Zweimueller-Mayer J, Steinbacher P, Lametschwandtner A, Bauer HC. The Dual Role of Zonula Occludens (ZO) Proteins. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:402593.
- [73]. Itäranta P, Chi L, Seppänen T, et al. Wnt-4 signaling is involved in the control of smooth muscle cell fate via Bmp-4 in the medullary stroma of the developing kidney. *Dev Biol*. 2006 May 15;293(2):473-83.
- [74]. Yan Y, Liu Y, Liu D, et al. Differentiation of adipose-derived adult stem cells into epithelial-like stem cells. *Ann Anat*. 2013 May;195(3):212-8.

[75]. Griesche N, Bereiter-Hahn J, Geiger H, Schubert R, Baer PC. During epithelial differentiation of human adipose-derived stromal/stem cells, expression of zonula occludens protein-1 is induced by a combination of retinoic acid, activin-A and bone morphogenetic protein-7. *Cytotherapy*. 2012 Jan;14(1):61-9.

[76]. Takebayashi T, Horii T, Denno H, et al. Human mesenchymal stem cells differentiate to epithelial cells when cultured on thick collagen gel. *Biomed Mater Eng*. 2013;23(1-2):143-53.

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

Epitheliale Differenzierung mesenchymaler Stammzellen aus humanem perirenal Fettgewebe

in dem Zentrum der Inneren Medizin, Klinik für Innere Medizin III – Funktionsbereich Nephrologie unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. Helmut Geiger mit Unterstützung durch Prof. Dr. Patrick Baer ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt 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.

(Ort, Datum)

(Unterschrift)