

# Spontane Endotheliale Differenzierung von humanen fettabgeleiteten Stammzellen

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereiches Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von  
Paul Christian Steffen  
geboren in Münster (Westfalen)

Gießen 2008

Die Durchführung der experimentellen Arbeiten fand in der Zeit vom Februar 2005 bis August 2007 am Physiologischen Institut des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität in Gießen unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. H. Michael Piper statt.

Gutachter                      Prof. Dr. H. Sauer

Gutachter                      Prof. Dr. T. Linn

Tag der Disputation

31.03.2009

Ich erkläre: „Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Paul Christian Steffen

meinen Eltern

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungen .....	IV
1. Einleitung .....	1
1.1 Stammzellen.....	1
1.2 Embryonale vs. adulte Stammzellen .....	1
1.3 Stammzellen aus Fettgewebe .....	4
1.4 Stammzellmarker .....	5
1.4.1 Endoglin / CD105.....	6
1.4.2 Aminopeptidase N / CD 13 .....	6
1.4.3 Stromal-Antigen-1 / Stro-1.....	7
1.4.4 Octamer-4 / Oct-4.....	7
1.5 Endothelzellen.....	8
1.6 Endothelmarker .....	8
1.6.1 Von-Willebrandt-Faktor (vWF).....	9
1.6.2 Vasculär-Endotheliales-Cadherin / VE-Cadherin .....	9
1.6.3 TIE-2 .....	10
1.6.4 FLK-1 / VEGF-Rezeptor 2.....	10
1.6.5 FLT-1 / VEGF Rezeptor 1 .....	10
1.7 Nabelschnurvenen-Endothelzellen.....	11
1.8 Prostata-Karzinom-Zellen (DU-145) .....	11
1.9 Calcium Oszillationen.....	11
2. Zielsetzung der Arbeit.....	15
3. Material .....	16
3.1 Firmen .....	16
3.2 Geräte und Laborbedarf .....	17
3.3 Medien und Chemikalien .....	18
3.4 Antikörper .....	19
3.5 Fluoreszenz-Farbstoffe.....	19
3.6 Medien, Puffer, Substanzen .....	20
3.6.1 Medium .....	20
3.6.2 Puffer.....	21

## Inhaltsverzeichnis

---

3.6.3	Substanzen.....	22
4.	Methoden.....	24
4.1	Isolation humaner fettabgeleiteter Stammzellen.....	24
4.2.1	Vorbereitungen.....	24
4.2.2	Bearbeitung des Fettgewebes.....	25
4.2.3	Waschvorgänge.....	26
4.2.4	Verdauung.....	27
4.2	Zellkultur humaner adulter Stammzellen.....	29
4.2.1	Passagieren der adulten Stammzellen.....	29
4.2.2	Einfrieren der adulten Stammzellen.....	29
4.2.3	Auftauen der adulten Stammzellen.....	30
4.3	Zellkultur DU-145 Zellen, Züchtung von Tumorsphäroiden.....	30
4.4	Konfrontationskulturen.....	31
4.5	Immunzytochemische Färbungen.....	32
4.6	Konfokale Lasermikroskopie.....	34
4.7	Durchflusszytometrie.....	37
4.8	Calcium Messungen.....	39
5.	Ergebnisse.....	41
5.1	Isolation humaner fettabgeleiteter Stammzellen.....	41
5.2	Wachstumsmessungen.....	42
5.3	Differenzierungsvorgang.....	46
5.4	Untersuchung des Zellverhaltens auf Matrigel.....	47
5.5	Charakterisierung der Stammzellen durch Immunfluoreszenz.....	48
5.6	Charakterisierung der Stammzellen durch FACS-Analyse.....	51
5.7	Charakterisierung der differenzierten Zellen durch Immunfluoreszenz.....	52
5.8	Charakterisierung der differenzierten Zellen durch FACS-Analyse.....	55
5.9	Wachstumsbeobachtungen und Differenzierung der Stammzellen in Konfrontations-Kulturen mit Tumorsphäroiden.....	57
5.10	Spontane Calcium – Oszillationen.....	62
5.11	Inhibition der Calcium-Oszillationen.....	67
6.	Diskussion.....	70
6.1	Die Gewinnung und Charakterisierung der Stammzellen.....	70
6.2	Die spontane und induzierte Differenzierung.....	73
6.3	Calcium Oszillationen und deren Einflüsse.....	75

## Inhaltsverzeichnis

---

6.4	Abschließende Betrachtungen.....	78
7.	Zusammenfassung.....	81
8.	Summary .....	82
9.	Literaturübersicht .....	83
10.	Publikationen.....	94
11.	Danksagung.....	95

# Abkürzungen

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ADAS	adipose tissue-derived adult stem cells
AK	Antikörper
APN (CD13)	Aminopeptidase N
BAPTA/AM	1,2-bis( <i>o</i> -Aminophenoxy)Ethan-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
BrdU	5-Bromo-2-Deoxyuridin (Proliferationsmarker)
ca.	circa
Ca <sup>2+</sup>	Calcium-Ion
Ca <sub>cyt</sub>	zytosolisches Calcium-Ionen
Ca <sub>er</sub>	endoplasmatische Calcium-Ionen
Ca <sub>am</sub>	mitochondriale Calcium-Ionen
CD29	Integrin $\beta$ -1
CD31	PECAM-1 (Platelet endothelial cell adhesion molecule 1)
CD105	Endoglin
CLSM	Confocal laser-scanning-microscope
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Cy 3	Indocarbocyanin
Cy 5	Indodicarbocyanin
DAG	Diaacylglycerol
DCF	2',7'-Dichlorofluorescein
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ES Zellen	embryonale Stammzellen
FACS	Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting)
FBS	fetales Kälberserum (fetal bovine serum)
FGF	fibroblast growth factor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLK-1 (VEGFR-2)	Fetal Liver kinase (Vascular endothelial growth factor receptor 2)
FLT-1 (VEGFR-1)	vascular endothelial growth factor receptor-1)
g	relative Zentrifugationsbeschleunigung (RZB)
Gd <sup>3+</sup>	Gadolinium-Ion
GdCl <sub>3</sub>	Gadoliniumchlorid
h	Stunden
H <sup>+</sup>	Wasserstoff-Ion
HCl	Salzsäure
H <sub>2</sub> O	Wasser

## Abkürzungen

---

HUVEC	human umbilical vein endothelial cells (Nabelschnurvenen-Endothelzellen)
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IP3	Inositol-1,4,5-triphosphat
IP3-R	Inositol-1,4,5-triphosphat Rezeptor
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumhydrogenphosphat
La <sup>3+</sup>	Lanthan-Ion
LaCl <sub>3</sub>	Lanthanchlorid
MEM	essentielle Aminosäurelösung (minimal essential aminoacids)
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium-Ion
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar ( $10^{-3} \text{ mol/l}$ )
mmol	Millimol
MP	Milchpulver
Na <sup>+</sup>	Natrium-Ion
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	Dinatriumhydrogenphosphat
NEA	nicht essentielle Aminosäuren
nm	Nanometer
nM	nanomolar ( $10^{-9} \text{ mol/l}$ )
NO	Stickstoffmonoxid
O <sub>2</sub>	molekularer Sauerstoff
Okt-4	Oktamer-4 (Stammzellmarker)
PBS(T)	Phosphat gepufferte Salzlösung (mit Triton)
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> - Ionenkonzentration ( $\lg c(\text{H}_3\text{O}^+)/\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ )
PIP	Phosphoinositolphosphat
PIP2	Phosphoinositol-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLA	processed lipoaspirate cells
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>
PLC	Phospholipase C
rpm	Umdrehungen pro Minute (round per minute)
s / sec	Sekunden
SD	Standardabweichung
SH-3	SRC-Homology-3 (Stammzellmarker)
Stro-1	Stromal Antigen-1 (Stammzellmarker)

## Abkürzungen

---

TGF	Tumor growth factor
TSCD	Thermo sterile tubing Welder
usw.	und so weiter
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar ( $10^{-6} \text{ mol/l}$ )
µm	Mikrometer
V	Volumen
VECAD	vascular-endothelial Cadherine
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor)
vWF	von Willebrandt Faktor
z.B.	zum Beispiel

# 1. Einleitung

## **1.1 Stammzellen**

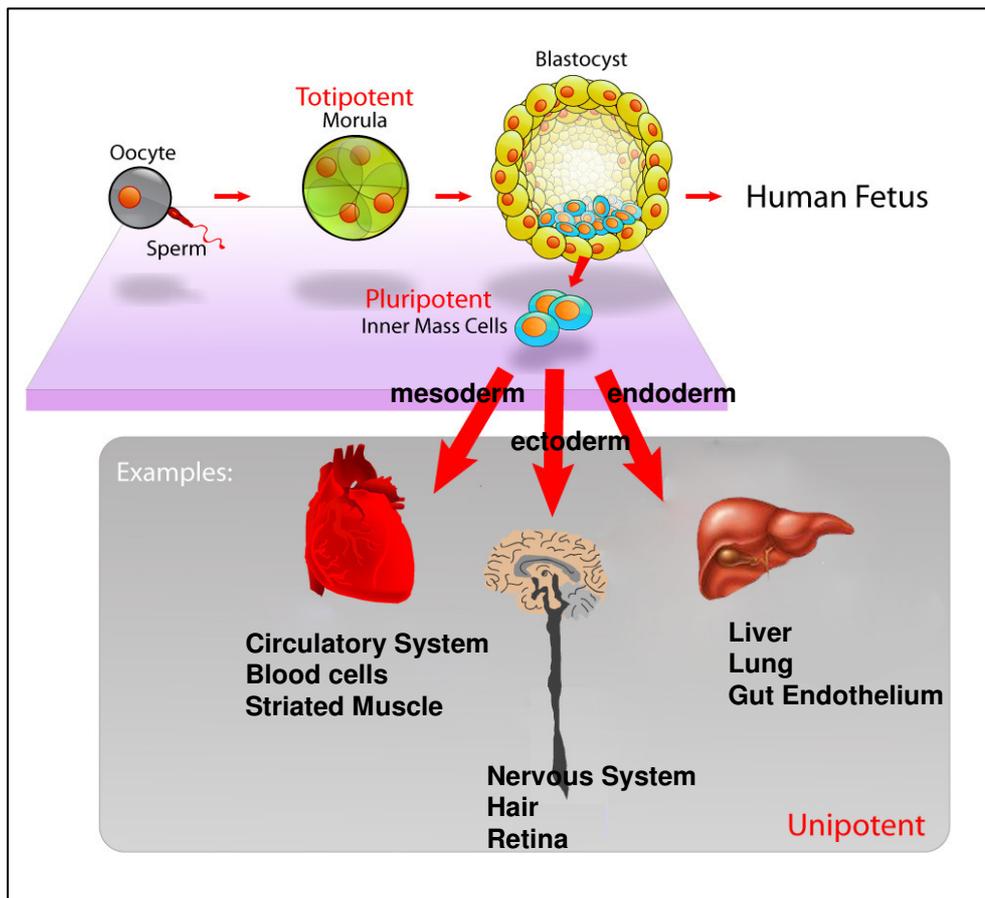
Stammzellen als Ursprung sämtlicher Zellen haben im Gegensatz zu anderen Zellen das Potential, sich vielfach mitotisch teilen zu können und zu vielen spezialisierten Zelltypen mit unterschiedlichen Funktionen zu differenzieren (Wislet-Gendebien 2005). Die Stammzellen bleiben solange undifferenziert, bis sie durch physiologische oder experimentelle exogene Signale zur Differenzierung angeregt werden. Die beiden elementaren Eigenschaften der Proliferation und Differenzierung haben den Stammzellen hohes wissenschaftliches Interesse eingebracht. Besonders in den Bereichen der regenerativen Medizin und des Tissue Engineering, also des autologen Gewebeersatzes, ist die experimentelle Arbeit mit Stammzellen essentiell geworden. So wird heute versucht, durch Implantation von Stammzellen z.B. ischämisches Myokard nach einem Myokardinfarkt (Küstermann and Hescheler 2005) oder zugrunde gegangene Inselzellen des Pankreas im Rahmen der Diabetes-Erkrankung zu ersetzen (Lumelsky 2001).

## **1.2 Embryonale vs. adulte Stammzellen**

Es wird je nach Herkunft der Stammzellen zwischen embryonalen und adulten Stammzellen unterschieden. Embryonale Stammzellen werden aus dem frühen Embryoblast entnommen, der die innere Zellmasse der Blastozyste repräsentiert. Während der frühen Embryogenese entsteht zuerst aus der haploiden Oozyte durch Verschmelzung mit dem ebenfalls haploiden Spermium eine diploide Zygote, die sich in mehreren Teilungsschritten zur mehrzelligen totipotenten Morula entwickelt. Unter dem Begriff Totipotenz versteht man in der Zellbiologie die Fähigkeit, in geeigneter Umgebung (Uterus) ein gesamtes Individuum zu bilden. Es wird allgemein davon ausgegangen, dass die Totipotenz bis zum 8-Zell-Stadium der Morula erhalten bleibt. In der weiteren embryonalen Entwicklung bildet sich aus dieser Morula durch Epithelialisierung eine äußere Blastomere (Trophoblast) und die innere Zellmasse (Embryoblast), aus der sich schließlich der gesamte Organismus entwickelt. Somit haben die aus der inneren Zellmasse isolierten frühen embryonalen Stammzellen noch die Potenz, sich in alle drei Keimblätter (Ektoderm, Mesoderm und Endoderm) zu differenzieren

# 1. Einleitung

(Wislet-Gendebien 2005). Die Fähigkeit zur Bildung eines gesamten Individuums ist ihnen aber bereits verloren gegangen. Sie werden daher als pluripotent bezeichnet. Die Entdeckung dieser pluripotenten Stammzellen geschah eher zufällig im Rahmen der Erforschung des Teratocarcinoms in der Mitte der 70iger Jahre. Dieser in der Maus und im Menschen vorkommende maligne Keimzelltumor entwickelt ausdifferenzierte Gewebe wie Haare, Muskeln, Knochen oder komplette Zähne, die keine malignen Eigenschaften mehr zeigten (Passier and Mummery 2003). Eine erste angewandte Therapie des Teratokarzinoms bestand somit in der induzierten Differenzierung dieser maligne entarteten Keimzellen.



**Abb. 1.2** Ursprung und Differenzierungspotential embryonaler Stammzellen

Modifiziert nach: <http://www.molecularstation.com/molecular-biology-images/data/504/655px-StemCellsDia.png> (07.08.07)

Bis heute gibt es eine Reihe von Publikationen, in denen eine Differenzierung der embryonalen Stammzellen zu verschiedenen Zelltypen durch eine Behandlung mit Cytokinen, Hormonen oder Wachstumsfaktoren beschrieben wird. So konnten Differenzierungen zu neuronalen Zellen (Neuronen, Gliazellen und Oligodendrozyten), insulinproduzierenden Inselzellen des Pankreas, Knorpel- und Knochenzellen, Kardiomyozyten, hepatischen und

## 1. Einleitung

---

endothelialen Zellen erzielt werden. Die Motivation der Forschung bestand anfangs in dem Verständnis der frühen embryonalen Entwicklung und erlangte erst später durch die Perspektiven einer Stammzellen-Transplantationstherapie große Bedeutung.

Die Gewinnung und wissenschaftliche Nutzung ist besonders bei humanen embryonalen Stammzellen durch politische, rechtliche und ethnische Aspekte stark eingeschränkt.

Den embryonalen Stammzellen stehen die adulten Stammzellen gegenüber, die im Organismus auch noch postnatal vorhanden sind. Diese auch als residente Stammzellen bezeichneten Zellen befinden sich im Gewebeverband der verschiedenen Organe. Aus diesen Zellen differenzieren während der gesamten Lebensdauer des Organismus neue spezialisierte Zellen zur Reparatur und zum Ersatz der vorhandenen Zellen (Passier and Mummery 2003). Im Gegensatz zu den embryonalen Stammzellen werden die adulten Stammzellen meist als multipotent bezeichnet. Aus ihnen können zwar noch verschiedene ausdifferenzierte Zellen entstehen, allerdings haben sie nicht mehr die Potenz, sämtliche Zellen des Organismus zu bilden.

Die Konzentration der residenten Stammzellen in den Organen ist sehr gering. So wird geschätzt, dass im Knochenmark nur etwa eine hämatopoetische Stammzelle auf 10.000 bis 15.000 andere Zellen trifft (Weissmann 2000). Das Vorkommen dieser adulten Stammzellen ist bis jetzt in ca. 20 adulten Organen nachgewiesen worden. Seit längerem ist die Existenz von hämatopoetischen adulten Stammzellen im Blut und Knochenmark bekannt, die bereits nach einer suppressiven Chemotherapie im Rahmen einer therapeutischen Stammzelltransplantation eingesetzt werden. In den letzten Jahren konnten zudem adulte Stammzellen im Fettgewebe (Zuk 2002), in der Leber, im Gehirn, Pankreas (Passier 2002), Skelettmuskel (Cao 2003), Knochen, Knorpel, Zahnpulpa, Kornea, Retina (Winslow 2001) und anderen Organen nachgewiesen werden. Der große Vorteil der adulten Stammzellen besteht in der relativ problemlosen Entnahme am lebenden Organismus und deren autologer Reimplantation nach einer experimentell induzierten Differenzierung in den gewünschten Zelltyp. Die Gefahr der Entstehung einer Abstoßungsreaktion im Rahmen einer Host-versus-Graft-Erkrankung ist somit durch die Verwendung von körpereigenem Material nicht gegeben. Die bei Transplantationen sonst übliche medikamentöse Immunsuppression ist dementsprechend nicht notwendig.

Adulte Stammzellen bilden in Analogie zu den embryonalen Stammzellen meist Vorläuferzellen, so genannte „progenitor cells“, bevor sie endgültig ausdifferenzieren. Diese

## 1. Einleitung

---

Progenitor-Zellen besitzen zwar noch Differenzierungspotential, aber die Entwicklung zu spezialisierten Zellen ist bereits stark eingeschränkt. So können sich aus hämatopoetischen Progenitor-Zellen nur noch spezialisierte Hämatozyten entwickeln.

Im Gegensatz zu den embryonalen Stammzellen, deren Herkunft aus der inneren Zellmasse der Blastozyste eindeutig ist, kann für die adulten Stammzellen die Herkunft in den verschiedenen Organen bis jetzt nicht angegeben werden (Winslow 2001). Folglich gestaltet sich die Identifizierung von adulten Stammzellen wesentlich schwieriger. Heute werden diese Zellen meist über deren Morphologie und Bestimmung der Oberflächenantigene charakterisiert.

Die adulten Stammzellen befinden sich in den verschiedenen Organen, die ontogenetisch einem bestimmten Keimblatt zu zuordnen sind. Die Differenzierung der Stammzellen zu spezialisierten Zellen außerhalb des ursprünglichen Gewebes aber innerhalb desselben Keimblattes wird in der Literatur häufig beschrieben. So konnte gezeigt werden, dass z.B. hämatopoetische Stammzellen aus dem Knochenmark (Mesoderm) zu Skelettmuskelzellen (Ferrari 1998, Gussoni 1999) oder Herzmuskelzellen (Mesoderm) (Kocher 2001; Orlic 2001) differenzieren können. Die Fähigkeit der Stammzellen zur Ausreifung in verschiedene Zelllinien des Meso-, Endo- oder Ektoderm wird im Allgemeinen als Plastizität bezeichnet. Eine Keimblatt-überschreitende Differenzierung konnte bereits ebenfalls experimentell gezeigt werden. So wurde nachgewiesen, dass hämatopoetische Stammzellen aus dem Knochenmark zu neuronalen Zellen differenzieren, die sich ontogenetisch aus dem Ektoderm ableiten (Brazelton 2000, Mezey 2000). Diese als Transdifferenzierung bezeichnete Eigenschaft der adulten Stammzellen ist zwar an Beispielen belegt, aber deren Reichweite nach wie vor nicht ganz geklärt.

Für die derzeitige Forschung stellen die adulten Stammzellen und deren Differenzierungseigenschaften eine interessante und viel versprechende Alternative zu den embryonalen Stammzellen dar. Die Arbeiten mit diesen Zellen sind rechtlich und ethisch wenig eingeschränkt und durch deren leichte Zugänglichkeit vor allem aus dem Bindegewebe für die wissenschaftliche Nutzung sehr gut geeignet.

### **1.3 Stammzellen aus Fettgewebe**

Die Isolation der Stammzellen aus mesenchymalen Gewebe (z.B. Fett-, Knochen- und Knorpelgewebe) erweist sich als eine relativ einfache Methode zur Gewinnung von adulten

Stammzellen, da die Entnahme von Fettgewebe relativ problemlos z.B. während einer Routine-Operation durchzuführen ist. Die experimentellen Arbeiten mit dem Ziel der kurativen Anwendung am Menschen lassen sich somit direkt an humanen Zellen durchführen. Der zeitintensive Umweg durch die Verwendung eines Tiermodells und deren Übertragung auf den Menschen erübrigt sich damit.

In den letzten Jahren nahm die Bedeutung der Stammzell-Isolation aus mesenchymalen Fettgewebe deutlich zu, seitdem bekannt ist, dass adipogene Stammzellen neben den hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark ebenfalls ein hohes Maß an Plastizität aufweisen. Es konnte experimentell gezeigt werden, dass diese Zellen Differenzierungen in Richtung Adipozyten, Chondrozyten, Osteoblasten und Myoblasten zeigen (Zuk 2002). In neueren Untersuchungen konnten zudem Differenzierungen zu Kardiomyozyten (Planat-Bénard 2004) und neuronalen Vorläufer-Zellen (Peter H. Ashjian et al. 2003) belegt werden. Dieses ist insofern von Bedeutung, da neuronales Gewebe ektodermalen Ursprungs ist und eine Differenzierung aus Stammzellen mesodermalen Ursprungs mit einer Keimblatt-Überschreitung einhergeht.

Die Stammzellen aus adipogenem Gewebe (auch als processed lipoaspirates cells bezeichnet, PLA-cells) können bei kosmetischen Operationen aus Liposuktionsflüssigkeit oder bei Routine-Operationen aus nativen Fettgewebe isoliert werden und dem Patienten autolog reimplantiert werden. Eine vorherige Ausdifferenzierung *in vitro* könnte das Anwendungsspektrum eventuell verbreitern.

Morphologisch ähneln die adipogenen Stammzellen den Fibroblasten, exprimieren aber analog zu den Knochenmark-Stammzellen eine Reihe von Stammzell-typischen Oberflächenmarkern. So konnten unter anderem die Expression folgender Marker nachgewiesen werden: CD13, CD29, CD44, CD90, CD105, SH-3 und STRO-1 (De Ugarte 2003). Hämatopoetische Marker (CD14, CD31 oder CD45), die typisch für Knochenmarksstammzellen sind, konnten hingegen auf den adipogenen Stammzellen nicht nachgewiesen werden (Gimble 2003).

### **1.4 Stammzellmarker**

Die eindeutige Identifikation von adulten mesenchymalen Stammzellen gestaltet sich nach wie vor sehr schwierig, da bis heute kein einheitliches Markerprofil gefunden wurde, das die eindeutige Unterscheidung von Stammzellen und bereits vollständig differenzierten Zellen

zulässt. Die Charakterisierung von Stammzellen kann heute somit nicht über den Nachweis eines allgemeinen Markers stattfinden. Es ist vielmehr notwendig, über eine Kombination von verschiedenen Markern die unterschiedlichen Arten von Stammzellen zu identifizieren. Zu dem werden die Differenzierungs- und Proliferationsfähigkeit der Zellen als weiteres Merkmal herangezogen. Die Morphologie der Zellen kann als eindeutiges Charakteristikum zur Identifikation nicht genutzt werden, da sich die adipogenen Stammzellen von den Fibroblasten aus der Isolierung kaum unterscheiden lassen. Sie kann allerdings als Anhaltspunkt dienen. Für Stammzellen eines gewissen Ursprungs lässt sich folglich eine Liste von Markern aufstellen, mit deren Hilfe die Identifikation als Stammzellen geführt werden kann. In dieser Arbeit wurden für die Identifikation die im Folgenden genannten Marker verwendet.

### **1.4.1 Endoglin / CD105**

Endoglin (CD105) ist ein transmembranes Glykoprotein, welches als Rezeptor für die Wachstumsfaktoren TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 3 dient. In Interaktion mit den TGF- $\beta$ -Rezeptoren I und II moduliert CD105 zusätzlich die Signalkaskade des TGF- $\beta$  (Duff et al. 2003). Die Expression von CD105 konnte zum einen auf Endothelzellen und einer Subpopulation von Knochenmarkszellen nachgewiesen werden (Barbara 1999). Zum anderen zeigten mehrere Arbeiten die Expression von CD105 auf Stammzellen adipogenen Ursprungs (Gronthos 2001; Zuk 2002; De Ugarte 2003).

### **1.4.2 Aminopeptidase N / CD 13**

Die Aminopeptidase N ist ein Zink-abhängiges Metalloenzym mit ubiquitärem Vorkommen und vielfältigen Funktionen (Lendeckel et al. 1999, Riemann et al. 1997). Die Aufgabe der Aminopeptidase N (APN) besteht vor allem in der Abspaltung von vorwiegend neutralen Aminosäuren vom nicht substituierten Aminoterminus von Oligopeptiden, Amiden oder Arylamiden. Eine besondere Rolle spielt die APN zudem als myeloisches Markermolekül in der Leukämietypisierung (Drexler et al. 1991).

Die Expression von APN konnte unter anderem auf Granulozyten, Monozyten aber auch auf Fibroblasten, Perizyten und Epithelzellen nachgewiesen werden (Lendeckel et al. 1999, Riemann et al. 1999, Riemann et al. 1997).

## 1. Einleitung

---

Desweiteren konnte gezeigt werden, dass Aminopeptidase N auch auf Stammzellen adipogenen Ursprung exprimiert wird (De Ugarte 2003, Zuk 2002). Zwar exprimieren Fibroblasten APN, dennoch wird der Marker in Kombination mit weiteren Markern für die Identifizierung von adipogenen Stammzellen herangezogen.

### **1.4.3 Stromal-Antigen-1 / Stro-1**

Das Antigen Stro-1 wurde erstmals 1991 von Simmons and Torok-Storb (Simmons 1991) beschrieben und zur Identifikation von Knochenmark-Vorläuferzellen genutzt. (Simmons 1994). Später konnte Stro-1 auch auf Stammzellen aus Fettgewebe (Strem et al. 2005, Zuk 2002) und anderen Stammzellen nachgewiesen werden (Seo 2004). Stro-1 wurde anfangs als sehr vielversprechender mesenchymaler Stammzellmarker diskutiert. Die Bedeutung wurde aber bereits von anderen Arbeitsgruppen wieder relativiert (Dennis et al. 2002). In Kombination mit anderen Markern eignet sich Stro-1 nach wie vor zur Charakterisierung.

### **1.4.4 Octamer-4 / Oct-4**

Das Oktamer-4 (Oct-4) gehört zur Gruppe der PUO Transkriptionsfaktoren. Es spielt eine Rolle in der Selbsterneuerung von multipotenten embryonalen Stammzellen und wird deshalb häufig als embryonaler Stammzellmarker verwendet. Wenn es in der frühen Embryogenese zu einem Mangel an Octamer-4 kommt, ist die Ausbildung der inneren Zellmasse gestört und es resultiert ein Verlust der Pluripotenz mit Ausbildung eines Trophoektoderm. Ein lebensfähiger Organismus kann daraus nicht entstehen.

Octamer-4 als charakteristischer embryonaler Stammzellmarker konnte in einigen Arbeiten auch auf mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks nachgewiesen werden (Lamoury et al. 2006, Pochampally et al. 2004, Roche et al. 2007). Die Expression auf diesen Zellen wird als Zeichen einer pluripotenten Eigenschaft der entsprechenden Zellen interpretiert. Auf adipogenen Stammzellen ist die Expression von Octamer-4 zwar in einer Arbeit beschrieben (Izadpanah et al. 2006), im Allgemeinen aber nicht bestätigt. Die Verwendung als Marker für adipogene Stammzellen ist somit nur gering aussagekräftig. Der Versuch eines Nachweises des embryonalen Stammzellmarkers Oct-4 erwies sich somit als lohnenswert.

### **1.5 Endothelzellen**

Endothelzellen bilden die innerste zum Gefäßlumen hin gerichtete Wandschicht aller Gefäße des Herz-Kreislaufsystems. Als Barriere zwischen Blut und Gewebe spielt das Endothel somit eine große Rolle in der Regulation des Stofftransportes vom Blut ins Gewebe und der Leukozytendiapedese im Rahmen von Entzündungsreaktionen. Die Barriere wird von verschiedenen Adhäsionsmechanismen der Endothelzellen gebildet, von denen das endothelspezifische Mitglied der Familie der Cadherine, Vascular endothelial-Cadherin (VE-Cadherin), die größte Bedeutung besitzt.

Eine weitere Aufgabe des Endothels besteht in der Regulation des Blutdruckes durch Produktion von vasoaktiven Substanzen, z.B.: Stickstoffmonoxid (NO), die den Tonus der Gefäßmuskulatur regulieren.

Desweiteren können Endothelzellen das Gerinnungssystem aktivieren oder hemmen und somit die Viskositätseigenschaften des Blutes beeinflussen. Bei Gewebe- oder Endothelschäden werden gerinnungsaktivierende Substanzen, z.B. vWF, freigesetzt, die rasch zu einer Hämostase und Abdichtung des Gefäßlumen führen.

Zudem besitzt das Endothel die Funktion der Angio- und Vaskulogenese. Die Forschung an diesen komplexen Prozessen hat an biologischer und medizinischer Bedeutung gewonnen. Zum einem wird versucht, über eine Hemmung der Angiogenese die Gefäßbildung in einem Tumor zu inhibieren und damit das Tumorwachstum zu reduzieren und zum anderen versucht man, in nekrotischem oder bradytrophem Gewebe die Angiogenese zu induzieren, um eine Gewebereparation zu fördern. Antikörper u.a. gegen VEGF (Bevacizumab) zur Hemmung der Angiogenese in der Tumorthherapie sind bereits in klinischer Erprobung (Zulassungsstudien F. F. Kabbinavar 2004, Hurwitz et al. 2004). Eine differenzierte Bewertung für den Einsatz bei den verschiedenen Tumoren wird nach Abschluss und Auswertung der unterschiedlichen Studien möglich sein (Aragon-Ching and Dahut 2008, McCormack and Keam 2008).

### **1.6 Endothelmarker**

Für die Charakterisierung von Endothelzellen stehen auf Grund ihrer besonderen Funktion einige Marker zur Verfügung. Der Nachweis eines endothelialen Charakters von

differenzierten Stammzellen kann somit sehr spezifisch unter Verwendung folgender Marker geführt werden.

### **1.6.1 Von-Willebrandt-Faktor (vWF)**

Der von-Willebrandt-Faktor ist ein großes multimeres Glykoprotein, welches von Endothelzellen, Megakaryozyten und subendotheliale Bindegewebe synthetisiert wird. Zusätzlich kann vWF als gelöster Gerinnungsfaktor im Blutplasma nachgewiesen werden.

Der von-Willebrandt-Faktor ist kein Enzym und besitzt somit auch keine katalytischen Funktionen. Seine primäre Funktion besteht in der Bindung von anderen Proteinen im Verlauf der Hämostase. Sehr bedeutend für die Gerinnungskaskade ist die Bildung eines Komplexes von vWF und Gerinnungsfaktor VIII. Dieser Faktor wird an vWF gebunden im Blut transportiert und ist somit inaktiv. Nach Ablösung erfolgt eine direkte Aktivierung von Faktor VIII, der in der Blutgerinnungskaskade die Aktivierung von Thrombin bewirkt.

Eine sehr wichtige Rolle spielt vWF auch bei der Thrombozyten-Adhäsion im verletzten Gewebe. (Sadler 1998)

Durch sein sehr spezifisches Vorkommen in Endothelzellen, eignet sich der Nachweis dieses Proteins besonders zur Charakterisierung von Endothelzellen.

### **1.6.2 Vasculär-Endotheliales-Cadherin / VE-Cadherin**

VE-Cadherin, in einigen Arbeiten noch als 7B4 bezeichnet, gehört zur Gruppe der Cadherine, die als Adhäsionsmoleküle eine Rolle in der endothelialen Zell-Zell-Adhäsion und in der Kontrolle der endothelialen Permeabilität spielen (Lampugnani et al. 1992). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass das transmembrane Protein VE-Cadherin die Proliferation von Endothelzellen inhibiert (Caveda et al. 1996).

Cadherine kommen somit sehr spezifisch in Endothelzellen vor. Neben VE-Cadherin exprimieren Endothelzellen noch N- und P-Cadherine. Für den spezifischen Nachweis eines endothelialen Charakters differenzierter Stammzellen kann das Protein VE-Cadherin verwendet werden.

### **1.6.3 TIE-2**

TIE-2 (tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor homology domain 2) gehört zur Gruppe der Tyrosin-Kinasen und wird auf Endothelzellen und frühen hämatopoetischen Stammzellen exprimiert. Dieser Rezeptor bindet mit hoher Affinität Angiopoietin 1 und Angiopoietin-2 und ist an den Prozessen der Angiogenese beteiligt (Davis et al. 1996). Embryonen mit einem homozygoten Nullallel im Gen des TIE-2 Rezeptors sterben bereits pränatal an Hämorrhagien durch eine Störung der Integrität des Endothels. (Dumont et al. 1994, Mustonen and Alitalo 1995)

### **1.6.4 FLK-1 / VEGF-Rezeptor 2**

FLK-1 (Fetal liver kinase) ist ein zellmembranständiger Rezeptor für VEGF (vascular endothelial growth factor). Er gehört zur Gruppe der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und ist an der frühen Vaskulogenese und Angiogenese beteiligt (Yang and Cepko 1996). FLK-1 wird von Endothelzellen in allen Entwicklungsstufen exprimiert und ist somit einer der frühesten Marker einer endothelialen Zelldifferenzierung (Millauer et al. 1993).

Die Bedeutung dieses Rezeptors für die Angiogenese konnte in folgenden Arbeiten gezeigt werden. Maus-Embryonen mit einer homozygoten Mutation im FLK-1-Gen sterben bereits in der frühen Embryogenese wegen schweren Entwicklungsstörungen von hämatopoetischen Vorläuferzellen und endothelialen Zellen (Shalaby et al. 1995). Des Weiteren kann die Angiogenese in einem Glioblastom durch retroviral kodierte dominant negative Mutationen des Gens gehemmt werden (Millauer et al. 1994).

### **1.6.5 FLT-1 / VEGF Rezeptor 1**

FLT-1 (FMS-like Tyrosine Kinase 1) ist ein Transmembran-Rezeptor, dessen zytoplasmatische Domäne die Funktionsweise einer Tyrosin-Kinase besitzt. Durch die homologe Funktionsweise wird der Flt-1 Rezeptor in die Familie der Tyrosin-Kinasen eingeordnet. In einer Arbeit von de Vries et al. konnte gezeigt werden, dass VEGF ebenfalls als Ligand für diesen Rezeptor fungiert (de Vries et al. 1992). FLT-1 wird deshalb auch als

Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 (VEGFR-1) bezeichnet und wird vor allem auf Endothelzellen exprimiert.

In der Vaskulo- und Angiogenese hat FLT-1 als VEGF-Rezeptor eine ähnlich wichtige Funktion wie FLK-1 (Ferrara and Davis-Smyth 1997, Shibuya et al. 1999).

### **1.7 Nabelschnurvenen-Endothelzellen**

Für experimentelle Arbeiten an Endothelzellen werden heute meist Nabelschnurvenen-Endothelzellen bevorzugt. Die auch als human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) bezeichneten Zellen werden bereits seit mehr als 30 Jahren aus Nabelschnurvenen isoliert und in Kultur gebracht. Durch das postnatal zur Verfügung stehende und nicht anders benötigte Nabelschnurgewebe in den Geburtszentren steht somit für die Gewinnung ein ethisch unbedenklicher Zellpool zur Verfügung. In dieser Arbeit wurden HUVECs als Kontrollzellen verwendet, um die Eigenschaften zwischen adulten Endothelzellen und den endothelial differenzierten Stammzellen zu vergleichen.

### **1.8 Prostata-Karzinom-Zellen (DU-145)**

Für das Ansetzen von Konfrontationskulturen (Co-Kulturen) zwischen Stammzellen und Tumorgewebe wurden multizelluläre Tumor-Sphäroide benötigt. Die Sphäroide konnten aus Tumorzellen der Zelllinie DU-145 erfolgreich im Spinnerflaschen-System gezüchtet werden. Diese Tumorzellen stammen ursprünglich aus einem Adenokarzinom der Prostata. Die Erstisolation erfolgte aus einer cerebralen Metastase eines an Prostata-Karzinom erkrankten 68-jährigen Patienten. Diese Tumorzellen konnten nach der Isolation über einen längeren Zeitraum für experimentelle Untersuchungen kultiviert werden. Eine klinische Relevanz besteht in der epithelialen Herkunft und in einem androgen-unabhängigen Wachstum dieser Zelllinie (Stone 1978).

### **1.9 Calcium Oszillationen**

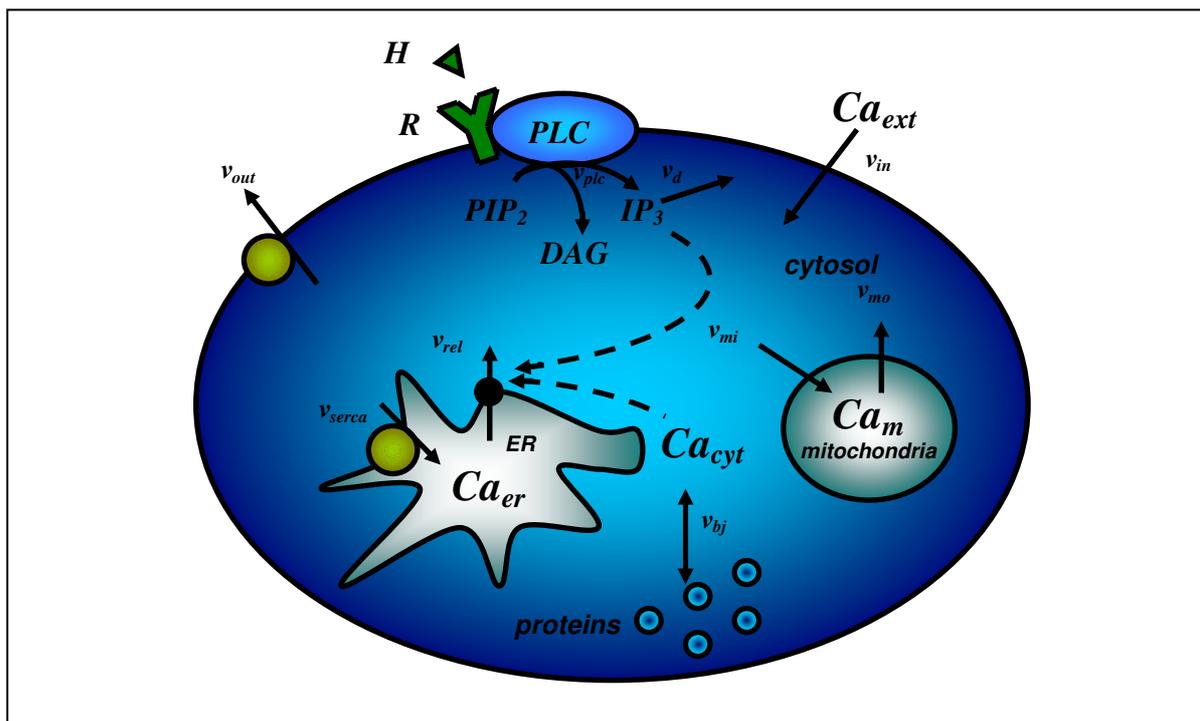
In den undifferenzierten adipogenen Stammzellen konnten intrazelluläre Calcium-Oszillationen nachgewiesen werden, die im Laufe des Differenzierungsprozess verloren

# 1. Einleitung

gingen. Diese Beobachtung war Anlass für die weitere experimentelle Untersuchung, welche Bedeutung die Calcium-Oszillationen bei Stammzellen haben. Im Folgenden sollen einleitend die Oszillationen und deren Hintergründe näher dargestellt werden.

Calcium-Oszillationen sind in periodisch kontrahierenden Herzmuskelzellen und Nervenzellen seit längerem bekannt (Morita et al. 1980). In nicht erregbaren Zellen wurden diese Calcium-Oszillationen erstmals in der Mitte der 80er Jahre bei Oozyten beschrieben (Cuthbertson and Cobbold 1985). Später konnten diese Oszillationen in weiteren Zellen nachgewiesen werden, ohne dass ihre biologische Bedeutung exakt erklärt werden konnte (Schuster et al. 2002).

Zur Funktionsweise der Calcium-Oszillationen und denen daran beteiligten Prozesse wurden mehrere Modelle entwickelt. Hierbei basieren die Modelle auf der Beschreibung der zur Erhaltung der Oszillationen erforderlichen Calcium-Flüsse über die verschiedenen Kompartimente der Zelle. Die Abbildung 1.9 stellt einen schematischen Überblick über die



**Abb. 1.9** Schema zur Darstellung der beteiligten Prozesse in Calcium-Oszillationen.

$v_{bj}$ : Gleichgewicht zw. zytosol. freiem und an Protein gebundenen  $Ca^{2+}$ ;  $v_d$ : Abbau von  $IP_3$ ;  $v_{in}$   $Ca^{2+}$ -Einstrom über Zellmembran-Kanäle;  $v_{mi}$ :  $Ca^{2+}$ -Aufnahme in die Mitochondrien;  $v_{mo}$ :  $Ca^{2+}$ -Ausstrom aus Mitochondrien;  $v_{out}$ :  $Ca^{2+}$ -Transport nach extrazellulär über ATPase;  $v_{plc}$ : Bildung von  $IP_3$  und DAG durch Phospholipase C (PLC);  $v_{rel}$ :  $Ca^{2+}$ -Ausstrom aus ER über Kanäle oder Wand-Defekte;  $v_{serca}$ :  $Ca^{2+}$  Transport in das ER durch sarco-/endoplasmatic reticulum  $Ca^{2+}$  ATPase (SERCA).

Modifiziert nach: (Schuster et al. 2002)

## 1. Einleitung

---

hauptsächlichen Prozesse dar, die bei den intrazellulären Calcium-Oszillationen beteiligt sind.

Ein zentraler Prozess bei Calcium-Oszillationen ist die Freisetzung von Calcium-Ionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ) aus den Speichern des Endoplasmatischen Retikulums über Inositol-1,4,5-Triphosphat ( $\text{IP}_3$ ) sensitive Kanäle ( $\text{IP}_3$ -Rezeptor).  $\text{IP}_3$  und Diacylglycerol (DAG) werden durch Spaltung von Phosphatidyl-Inositol 4,5-bisphosphat ( $\text{PIP}_2$ ) durch die membranständige Phospholipase C (PLC) gebildet. Die Aktivierung der bisher bekannten Isoformen der PLC verläuft unterschiedlich. Während die Isoform  $\text{PLC}\beta$  durch ein Hormon-Rezeptor gekoppeltes G-Protein aktiviert wird, werden die Isoformen  $\text{PLC}\gamma$  durch Proteinkinasen und  $\text{PLC}\delta$  durch Calcium selbst aktiviert (Schuster et al. 2002).

Die Aktivität des  $\text{IP}_3$ -Rezeptor gekoppelten Calciumkanals kann in Anwesenheit von  $\text{IP}_3$  sowohl über intrazelluläres Calcium stimuliert (Calcium-induzierte Calcium-Freisetzung) (Berridge 1993, Bezprozvanny and Ehrlich 1995) als auch durch hohe Calcium-Konzentrationen inhibiert werden (Bezprozvanny and Ehrlich 1995). Zudem wird angenommen, dass weitere Prozesse in der Signalkaskade eine Rolle spielen, wie z.B. die Aktivierung der Protein-Kinase-C (PKC) durch DAG und Calcium oder die Phosphorylierung der  $\text{IP}_3$ -Rezeptors durch die PKC (Schuster et al. 2002).

Wie in der Abbildung 1.9 dargestellt, ergeben sich folgende sechs Faktoren (Konzentration von  $\text{IP}_3$  ( $\text{IP}_3$ ), zytosolisches Calcium ( $\text{Ca}_{\text{cyt}}$ ), endoplasmatisches Calcium ( $\text{Ca}_{\text{er}}$ ), mitochondriales Calcium ( $\text{C}_{\text{ma}}$ ), zytosolisches Calcium gebunden an Pufferprotein( $\text{B}_j$ ),  $\text{IP}_3$ -Rezeptorstatus ( $\text{R}_a$ )), die für die Erklärung der Calcium-Oszillationen herangezogen werden können. In manchen Modellen wird das Membranpotential ebenfalls als zusätzlicher Faktor angesehen. Das Membranpotential hat vor allem eine Bedeutung in Zellen mit einer Interaktion von Calcium-Oszillationen und Aktionspotentialen. Desweiteren wird diskutiert, inwieweit die extrazelluläre Calcium-Konzentration Einfluss auf die intrazellulären Calcium-Oszillationen hat (Schuster et al. 2002). In verschiedenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Entfernung extrazellulären Calciums zu einem Verlust der Oszillationen in endodermalen Zellen (Sauer et al. 1998) und HeLa-Zellen führt (Bootman et al. 1996, Sauer et al. 1998). Dagegen ist z.B. in Speicheldrüsenzellen extrazelluläres Calcium für den Erhalt der Oszillationen nicht notwendig (Zimmermann and Walz 1997).

In keinem der veröffentlichten Modelle werden alle sechs Faktoren zur Beschreibung herangezogen. Vielmehr unterscheiden sich die Modelle durch die verschiedenen

## 1. Einleitung

---

Kombinationen von weniger als sechs Faktoren. In den beschriebenen Modellen mit der kleinsten Dimension werden nur zwei Faktoren verwendet.

In der Literatur findet sich vermehrt die Annahme, dass die Informationen der Calcium-Oszillationen durch deren Frequenz und weniger durch deren Amplitude kodiert wird (Dupont and Goldbeter 1998, Goldbeter 1996, Kummer et al. 2000, Meyer and Stryer 1988). Die Argumentation führt zu der Frage, wie das Signal des oszillierenden Calciums in ein stationäres Signal transformiert wird, welches für einen Effekt in der Zelle notwendig ist, und wie die Zielproteine Frequenzunterschiede detektieren können. Ein Ansatzpunkt ist das Protein CaM Kinase II, bei dem De Koninck & Schulmann (De Koninck and Schulman 1998) zeigen konnten, dass es oszillatorische Signale decodieren und als Enzym in der Signalkaskade weitere Enzyme phosphorylieren kann. Somit kann das durch die Oszillation codierte Signal an verschiedenen Zielen differenzierte Effekte hervorrufen. Die kompletten Zusammenhänge sind zum gegenwertigen Zeitpunkt bei weitem noch nicht verstanden.

In der Literatur sind experimentelle Beobachtungen beschrieben, in denen die Synchronisation von Calcium-Oszillationen durch Kopplung der oszillierenden Zellen stattfindet. Es wird angenommen, dass dieses sehr wahrscheinlich als interzelluläre Kommunikation zu deutendes Phänomen durch zwei Mechanismen stattfindet. Zum einem stehen die Zellen über zytoplasmatische Botenstoffe über Gap junctions in Verbindung (Toyofuku et al. 1998) und zum anderen können die Zellen über einen sezernierten Botenstoff parakrin mit der Nachbarzelle (Hassinger et al. 1996) kommunizieren.

Die Calcium-Oszillationen stellen in diesen Zellen somit einen sehr komplexen Signalmodus dar, der sehr wahrscheinlich eine Rolle in der intrazellulären und interzellulären Signaltransduktion spielt.

Die Untersuchung des Phänomens und die Klärung der Bedeutung der Calcium-Oszillationen bei den adipogenen Stammzellen soll nun Aufgabe dieser und auch der folgenden experimentellen Arbeiten sein.

## 2. Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit wurde erstmals an der Universität Gießen mit adulten Stammzellen aus Fettgewebe gearbeitet. Ziel war es dabei, Methoden zur Isolation und Kultivierung der Stammzellen zu erarbeiten und zu beschreiben und die spontane endotheliale Differenzierung der human fettabgeleiteten Stammzellen experimentell zu untersuchen. Hierbei sollten folgende Fragestellungen geklärt werden.

1. Wie gewinnt man humane fettabgeleitete Stammzellen? Eine Beschreibung der Methoden zur Isolierung der Zellen.
2. Wie verläuft der spontane Differenzierungsprozess bei den adipogenen Stammzellen?
3. Welche charakteristischen Eigenschaften zeigen die Stammzellen und die daraus spontan differenzierten Zellen?
4. Welches Verhalten zeigen diese Stammzellen und differenzierten Zellen auf einer extrazellulären Matrix wie Matrigel?
5. Wie verhalten sich die Stammzellen auf Tumorgewebe? Gibt es Anzeichen einer Tumor-induzierten Differenzierung?
6. Zeigen humane fettabgeleitete Stammzellen Calcium-Oszillationen? Durch welche Faktoren können die Calcium-Oszillationen beeinflusst werden?

# 3. Material

## 3.1 Firmen

1. Abcam Limited, Cambridge CB4 OTP, Cambridgeshire, UK
2. Alexis, 35305 Grünberg, Deutschland
2. Biochrom, 12247 Berlin, Deutschland
3. Biorad GmbH, 80901 München, Deutschland
4. Biozym Scientific GmbH, 31833 Oldendorf, Deutschland
5. Bühler, 72379 Hechingen, Deutschland
6. Calbiochem-Novabiochem GmbH, 65796 Bad Soden, Deutschland
7. Cell Signaling, 159 J Cummings Center Beverly, MA 01915
8. Chemicon International, Hampshire SO53 4NF, UK
9. Dako Corporation, CA 93013, Carpinteria, USA
10. Dianova, 20354 Hamburg, Deutschland
11. Dunn Labortechnik, 53567 Asbach, Deutschland
12. Eppendorf, 22339 Hamburg, Deutschland
13. Gilson International B.V., 65520 Bad Camberg, Deutschland
14. Greiner Bio-One GmbH, 72636 Frickenhausen, Deutschland
15. Heidolph Elektro GmbH, 93309 Kelheim, Deutschland
16. Heraeus Instruments, 63452 Hanau, Deutschland
17. Hirschmann® Laborgeräte, 74246 Eberstadt, Deutschland
18. Integra Biosciences, 35463 Fernwald, Deutschland
19. Invitrogen, 76131 Karlsruhe, Deutschland
20. Kendro Laboratory Products, 63505 Langenselbold, Deutschland
21. Labnet International Inc., Windsor, Berkshire, United Kingdom
22. LabVision Corporation, Neomarkers, CA 94539, USA
23. Langenbrick, 79312 Emmendingen, Deutschland
24. Leica, 64625 Bensheim, Deutschland
25. Menzel-Gläser, 38116 Braunschweig, Deutschland
26. Merck, 64293 Darmstadt, Deutschland
27. Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
28. Paesel- Lorei Vertriebs- und Marketing GmbH, 63452 Hanau, Deutschland
29. PAA, 35091 Cölbe, Deutschland

### 3. Material

---

30. Promega, 68199 Mannheim, Deutschland
31. Roche Diagnostics GmbH, 68305 Mannheim, Deutschland
32. Roth, 76231 Karlsruhe, Deutschland
33. R&D Systems, MN 55413, Minneapolis, USA
34. Santa Cruz Biotechnologie Inc., Santa Cruz California, USA
35. Sartorius, 37075 Goettingen, Deutschland
36. Schülke-Mayr-GmbH, 22851 Norderstedt
37. Serva, 69115 Heidelberg, Deutschland
38. Sigma (-Aldrich), 82024 Taufkirchen, Deutschland
39. Techne Progene, 97877 Wertheim-Bestenheid, Deutschland
40. Zeiss, 07745 Jena, Deutschland

#### **3.2 Geräte und Laborbedarf**

bakteriologische Schalen	Greiner
Cellspin Rührsystem	Integra
Deckgläschen	Roth
Gewebekulturschalen	Falcon, Greiner
FACS CaliburTM	Becton Dickinson
Immersionsöl	Roth
Inkubatoren	HERAcell® 240, Kendro
Konfokales Lasermikroskop	Leica
Lichtmikroskop	Zeiss
Objektträger	Roth
Röhrchen 15ml und 50ml	Greiner
Petriperm- Schalen	Greiner
pH- Meter digital	Sartorius
Pipetten	Pipetus®- standard von Hirschmann® , Glaspipette von Roth, Plastikpipetten von Becton Dickinson
Schüttler (ProBlot 25XLD Rocker)	Labnet International
Spinnerflaschen	CELLspin 240, Integra
Sterilbank	Heraeus
Vortexer	Heidolph

### 3. Material

---

Wasserbad	Hirschmann
Zellkulturplatten	BD
Zentrifugen	Centrifuge 5417C Eppendorf, Heraeus Labofuge 300, Heraeus Biofuge 15R

#### **3.3 Medien und Chemikalien**

Collagenase	Roche
BAPTA AM	Sigma
DMSO	Calbiochem
Dulbecco's PBS ohne Ca&Mg	PAA
EDTA	Invitrogen
Fetal Bovine Serum (FBS)	Sigma
Fluoromount-GTM	Paesel-Lorei
L-Glutamin 200mM (100x)	PAA
Glycerol	Sigma
Gadoliniumchlorid	Sigma
HAM F-10	PAA, Sigma
KCl	Roth
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Roth
Lanthanchlorid	Roth
Lithiumchlorid	Roth
Liberase	Roche
Matrigel	BD Bioscience
MEM (50x) Aminosäuren	Biochrom
β- Mercaptoethanol	Sigma
Natriumchlorid	Roth
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	Roth
Natriumpyruvat (100mM)	Biochrom
NEA (100x)	Biochrom
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA
Sigmacote	Sigma
SYBR Green Supermix	Biorad
Triton X-100	Sigma
Trypsin EDTA	Invitrogen

#### 3.4 Antikörper

##### *Primäre Antikörper:*

Anti-Aminopeptidase-N (CD13), Maus monoklonal	Neomarkers
Anti-Endoglin (CD105), Maus monoklonal	Chemicon
Anti-FLK-1, Maus monoklonal	R&D
Anti-FLK-1, Kaninchen polyklonal	NeoMarkers
Anti-Flt-1, Kaninchen polyklonal	Santa Cruz
Anti-Oct-4, Maus monoklonal	Chemicon
Anti-Stro-1, Maus monoklonal	R&D
Anti-Tie-2, Maus monoklonal	R&D
Anti-Tie-2, Kaninchen polyklonal	Santa Cruz
Anti-VeCadherin (CD144), Maus monoklonal	R&D
Anti-VeCadherin (CD144), Kaninchen polyklonal	Alexis
Anti-vWF, Kaninchen polyklonal	Dako

##### *Sekundäre Antikörper:*

Cy 5 goat anti-Kaninchen	Dianova
Cy 5 sheep anti mouse	Dianova
FITC goat anti-mouse IgG	Sigma
FITC goat anti-mouse IgG + IgM	Dianova
FITC sheep anti-Kaninchen IgG	Sigma

#### 3.5 Fluoreszenz-Farbstoffe

BODIPY	Molecular Probes
CMFDA	Molecular Probes
FLUO Calcium Indicators (Fluo-3, Fluo-4)	Molecular Probes
SYTOX Green Kernfärbelösung	Invitrogen

#### **3.6 Medien, Puffer, Substanzen**

##### **3.6.1 Medium**

Ham's F10 Medium wurde ursprünglich für die Kultivierung von Ovarzellen des chinesischen Hamster (CHO) sowie Hela- und murinen L-Zellen entwickelt. Es wird mittlerweile aber auch für viele andere Zellen, unter anderem adulte Stammzellen und Prostata-Tumor-Zellen eingesetzt.

Dem in dieser Arbeit verwendeten Medium wurden zusätzlich Aminosäuren, Antibiotika,  $\beta$ -Mercaptoethanol und hitzeinaktiviertes fötales Rinderserum beigefügt. Die Inaktivierung des Serums erfolgte durch Erhitzen auf 56° C für 35 min.

##### ***Zusammensetzung HAM-F10 Medium mit 10% FBS***

500 ml HAM F10 mit L-Glutamin

NaCl	126 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 mM
NaHCO <sub>3</sub>	14 mM
KCl	3,8 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,6 mM
MgSO <sub>4</sub>	0,6 mM
CaCl <sub>2</sub>	0,29 mM

57,5 ml hitzeinaktiviertes FBS

5 ml  $\beta$ -Mercaptoethanol (0,1mM)

5 ml MEM (100x) (2mM)

2,5 ml L-Glutamin (100x) (2mM)

2,5 ml Penicillin /Streptomycin (100x) (100U/ml)

##### ***Einfriermedium***

50% hitzeinaktiviertes FBS

40% zusammengesetztes Ham's F10 Medium

10% DMSO

### 3. Material

---

#### 3.6.2 Puffer

Der verwendete Puffer (PBS) wurde 10fach konzentriert angesetzt und vor Verwendung mit Millipore-Wasser 1:10 verdünnt. Die verwendeten Salze wurden in 1 l Millipore-Wasser gelöst und der Puffer mit HCl auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

##### **10x PBS**

KCl	2g	26,82 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2g	14,7 mM
NaCl	80g	1,37 M
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	12,5g	64,61 mM

**1x PBS** 10x PBS 100 ml + Millipore Wasser 900ml

**0,01% PBST** 1x PBS 999ml + 100µl Triton X-100

**0,1% PBST** 1x PBS 999ml + 1ml Triton X-100

**Ca<sup>2+</sup> freier Puffer**

NaCl	135 mM
KCl	5,4 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,0 mM
Glukose	10 mM
HEPES	10 mM

mit NaOH 0,1 M auf pH=7,4 eingestellt

**Blockreagenz**

10 % Milchpulver	8ml 0,01% PBST
	2ml Milchpulver
10 % FCS	8ml 0,01% PBST
	2ml FCS

### 3.6.3 Substanzen

#### 3.6.3.1 Matrigel

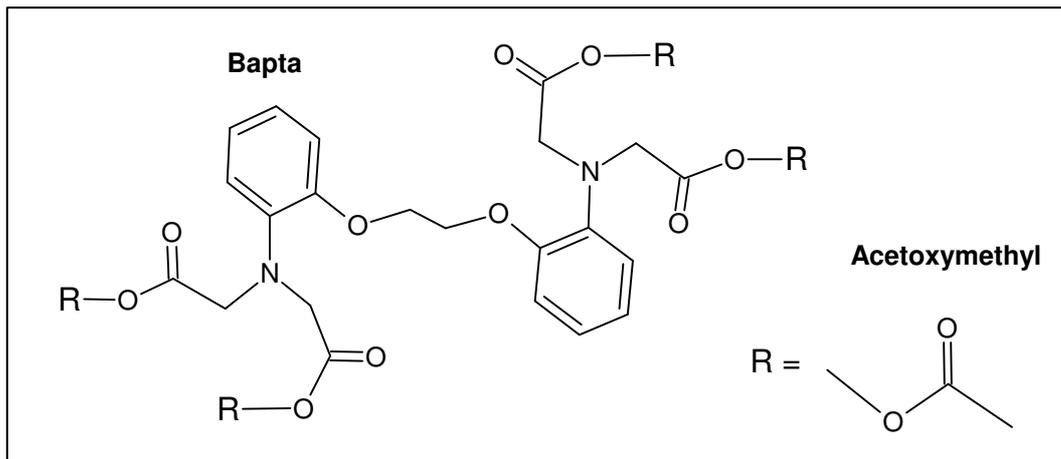
Matrigel ist eine gallertartige extrazelluläre Membran-Matrix, die von dem Engelbreth-Holm-Swarm Sarkom der Maus produziert und aus diesem isoliert wird. Es besteht vor allem aus den extrazellulären Matrixproteinen Laminin und Kollagen IV. Zusätzlich sind verschiedene Wachstumsfaktoren wie Tumor growth factor (TGF), Fibroblast growth factor (FGF) und tissue plasminogen activator (tPA) enthalten.

Plastikoberflächen für die Zellkultur können mit flüssigem Matrigel bei 4°C beschichtet werden. Nach Inkubation bei 37°C bilden die Proteine des Matrigels eine gallertartige Oberflächenmatrix, auf der die verschiedenen Zellen kultiviert werden können.

Endothelzellen bilden auf dieser Matrix sehr typische Netzwerkstrukturen, die sie auf reinen Plastikoberflächen nicht ausbilden (Skurk et al. 2005).

#### 3.6.3.2 BAPTA-AM

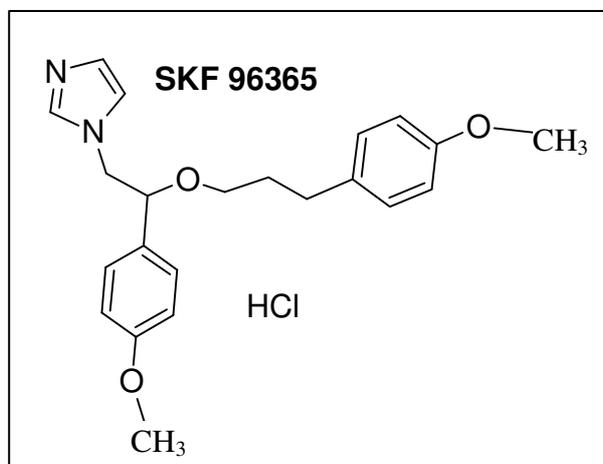
BAPTA (*1,2-Bis(o-Aminophenoxy)Ethan-N,N,N',N'-Tetraessigsäure*) ist ein spezifischer Calcium Chelator. Durch seine vier funktionellen Carboxylsäure-Gruppen kann BAPTA zwei Calcium-Ionen binden. BAPTA kann als geladenes Molekül nicht intrazellulär aufgenommen werden. Erst nach Kopplung der hydrophilen Carboxylsäure-Gruppen mit dem lipophilen Molekül Acetoxymethyl (AM,  $\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$ ) kann die Substanz in den intrazellulären Raum aufgenommen werden. Im Zytoplasma werden die lipophilen Gruppen durch unspezifische Esterasen wieder abgespalten und die funktionellen Carboxylsäure-Gruppen von BAPTA freigelegt. Durch Inkubation der Zellen bei 37°C mit BAPTA /AM kann die Substanz als Calcium-Chelator zur Bindung von intrazellulären Calcium eingesetzt werden (Gniadecki and Gajkowska 2003).



**Abb. 3.6.3.2** Strukturformel von BAPTA. Die funktionellen Carboxylsäuregruppen sind über eine Esterbindung mit Acetoxymethyl verbunden.

### 3.6.3.3 SKF 96365

SKF 96365 (*1-[β-[3-(4-methoxyphenyl)propoxy]-4-methoxyphenethyl]-1H-imidazole hydrochloride*) ist ein spezifischer Calcium-Antagonist, der den Rezeptor-vermittelten Calcium-Einstrom in die Zelle inhibiert. Verschiedene Effekte auf die Inhibition des Rezeptor-vermittelten Calcium-Einstroms konnte unter anderem bei Thrombozyten, neutrophilen Granulozyten und Endothelzellen gezeigt werden (Merritt et al. 1990).



**Abb. 3.6.3.3**  
Darstellung der chemischen Struktur von SKF 96365.

# 4. Methoden

## 4.1 Isolation humaner fettabgeleiteter Stammzellen

Ein Teil dieser Arbeit stellte die Erarbeitung und Protokollierung des Isolationsprozesses humaner adulter Stammzellen aus Fettgewebe dar. Für die Entnahme von Fettgewebe und die Isolierung der Stammzellen aus diesem Fettgewebe hatten sämtliche Spender im Vorfeld ihr schriftliches Einverständnis gegeben. Zudem liegt für die experimentellen Untersuchungen eine Genehmigung der Ethikkommission vor.

Das Ziel des erarbeiteten Isolationsprozesses war es, die Stammzellen direkt aus entnommenem Fettgewebe zu isolieren und keine Liposuktionsflüssigkeit zu verwenden. Die Isolation erfolgte in enger Zusammenarbeit mit dem Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin am Uniklinikum Gießen. Hierzu wurden die in der Routine verwendeten Geräte der integrierten Blutspendebank verwendet. Im Folgenden ist eine ausführliche Beschreibung dargestellt.

### 4.2.1 Vorbereitungen

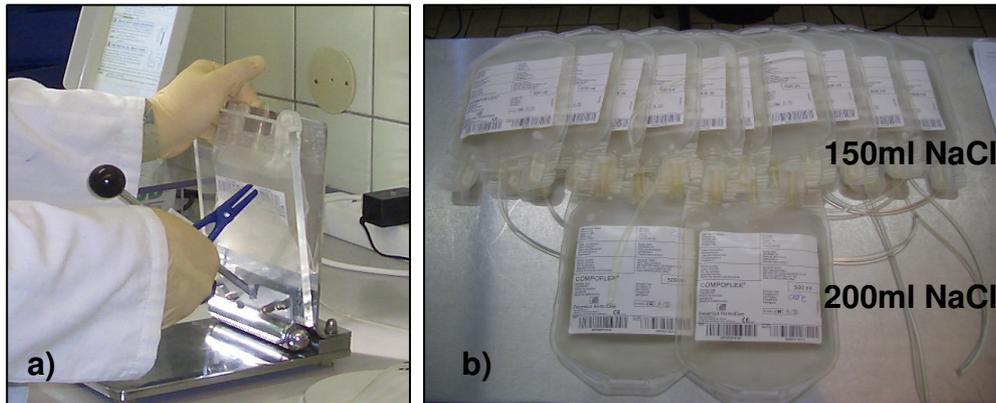
Zu den Vorbereitungen zählt die Bereitstellung von insgesamt 10 Compoflex® Leerbeutel (500 ml) für die späteren Waschvorgänge, von denen acht Beutel mit jeweils 150 ml NaCl und zwei Beutel mit jeweils 200 ml NaCl gefüllt werden müssen. Hierzu wird ein Infusionssystem mit der 500 ml NaCl Infusionsflasche verbunden und mit dem



**Abb. 4.1.1** a) Abfüllen der entsprechenden NaCl-Lösung in die Leerbeutel mit Hilfe einer Waage b) Darstellung der Konnektierung von Infusionsschlauch und Beutelschlauch durch den TSCD

## 4. Methoden

Schlauchsystem des Beutels durch den Thermo Sterile Tubing Welder (TSCD) steril konnektiert. Die genaue Bestimmung des Volumens erfolgt mit einer Waage (Beutelleergewicht 29 g). Nachdem das exakte Volumen abgefüllt worden ist, wird der Beutel vollständig entlüftet und verschweißt.

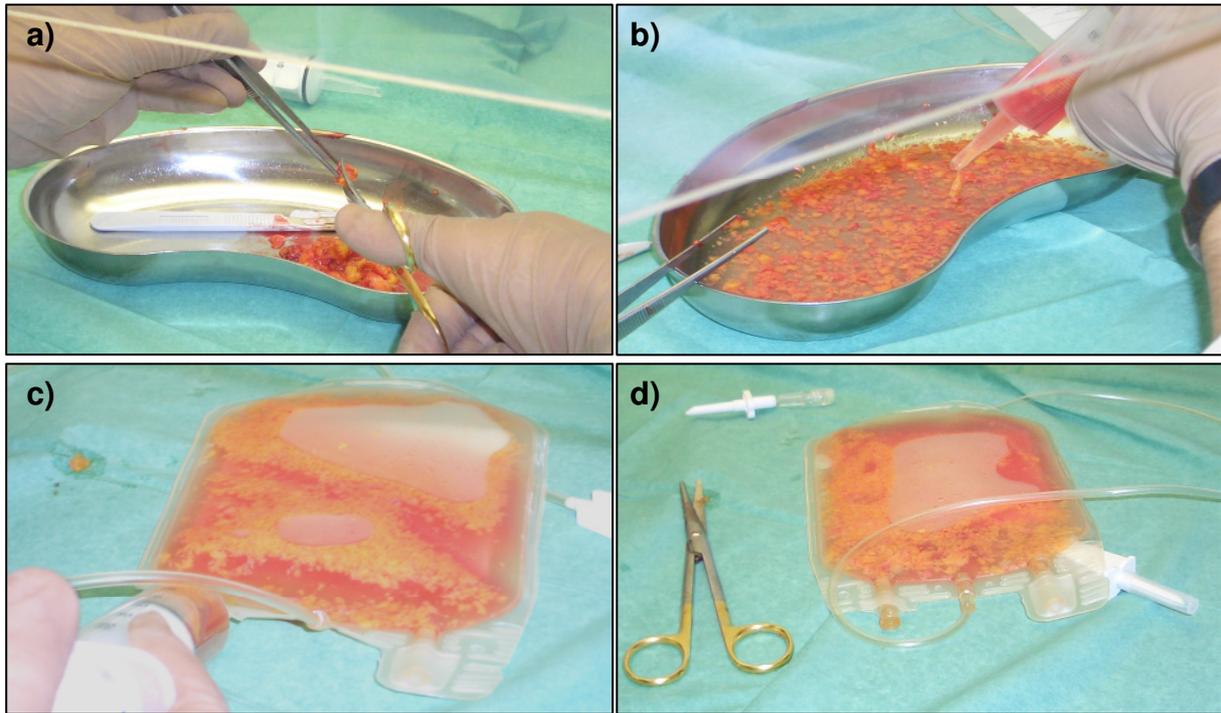


**Abb. 4.1.2** a) Entlüftung der CompoFlex-Beutel mit Hilfe einer gefederten Platte b) Abschluss der Vorbereitungsarbeiten

### 4.2.2 Bearbeitung des Fettgewebes

Das während der Operation entnommene Fettgewebe wird unter sterilen Bedingungen (Sterilbank, steriles Werkzeug, sterile Handschuhe) mit Hilfe einer Schere und Pinzette in einer Nierenschale mechanisch zerkleinert. Zu dem fraktionierten Fettgewebe wird in die Nierenschale ca. 200 ml NaCl-Lösung hinzu gegeben und beides mit einer 50 ml Spritze aufgezogen. Lösung und Fettgewebe können schließlich in einen leeren Beutel gespritzt werden. Der Beutel wird anschließend mit seinem gesamten Inhalt gewogen und die exakte Menge an verwendetem Fettgewebe kann nach Abzug des Beutelleergewichts und der verwendeten Menge an NaCl-Lösung bestimmt werden. Dieser Schritt ist wichtig, da von der Menge des Fettgewebes die spätere Konzentration an Enzymen für den Fettverdau abhängig ist.

## 4. Methoden



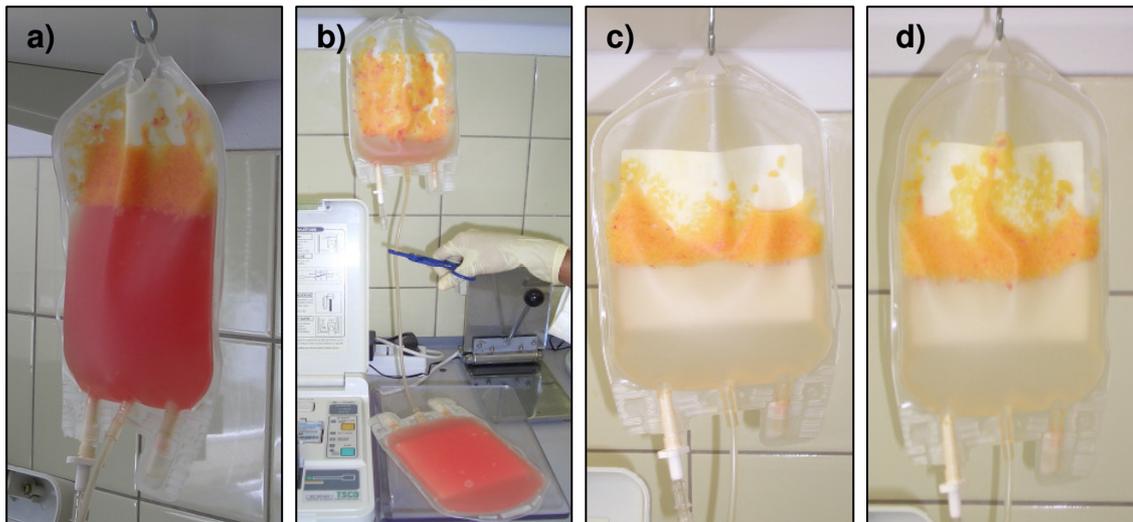
**Abb. 4.1.3** Zusammenstellung der verschiedenen Arbeitsschritte zur Bearbeitung des Fettgewebe, a) mechanische Zerkleinerung des Fettgewebes, b) Aufnahme des fraktionierten Fettgewebes und der Flüssigkeit in eine 50 ml Spritze, c) Überführung in einen Compoflex-Beutel, d) Abschluss der Bearbeitung des Fettgewebes.

### 4.2.3 Waschvorgänge

Vor den eigentlichen Waschvorgängen muss der mit Fettgewebe gefüllte Beutel vollständig entlüftet werden, um eine Schaumbildung zu vermeiden. Das Fettgewebe muss jetzt so häufig gewaschen werden, bis die Waschlösung im Beutel völlig klar ist. Hierzu werden nacheinander die vorbereiteten Waschbeutel (150 ml) mit dem Gewebebeutel konnektiert und die Waschlösung hinzugefügt. Durch kräftiges Schütteln sollten möglichst alle Blutbestandteile aus dem Gewebe gewaschen werden. In der Regel sind hierzu 8-10 Waschvorgänge nötig.

Da Fettgewebe eine geringere Dichte hat als die verwendete NaCl-Lösung, sammelt sich im hängenden Beutel das Fettgewebe oberhalb des Flüssigkeitsspiegels an. Nachdem das gesamte Gewebe aufgestiegen ist, kann die Waschlösung wieder in den alten Beutel abgelassen werden, so dass nur das Fettgewebe im ursprünglichen Beutel zurück bleibt.

Nach dem letzten Waschvorgang wird das Gewebe noch einmal in 200 ml NaCl aufgenommen.



**Abb. 4.1.4** Darstellung der einzelnen Waschschritte, a) Beutelinhalt nach dem 1. Waschvorgang, b) Ablassen der Waschlösung, c) Beutelinhalt nach dem 5. Waschvorgang, d) Beutelinhalt nach dem 7. Waschvorgang.

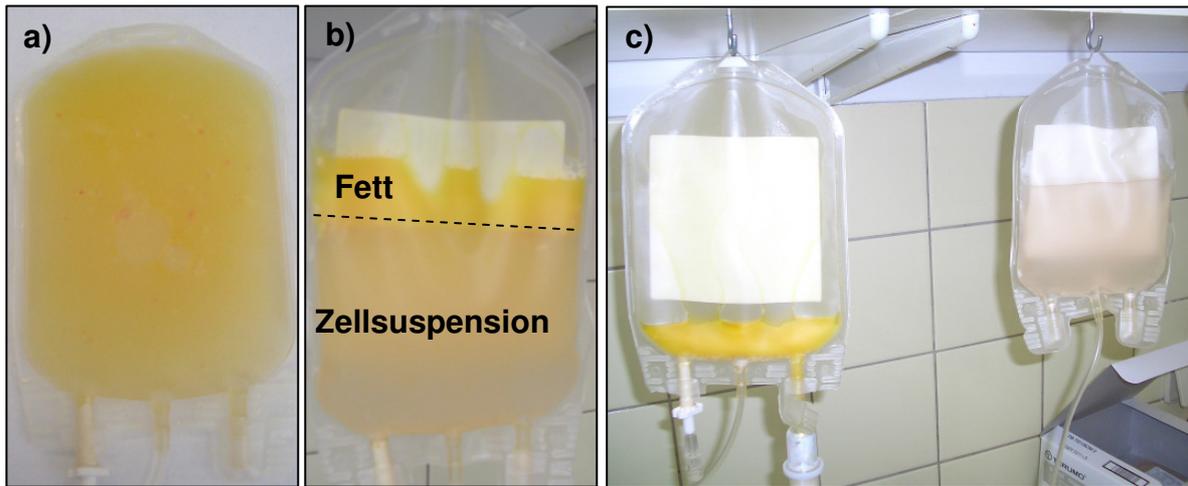
### 4.2.4 Verdauung

Nachdem das fraktionierte Fettgewebe gründlich gewaschen wurde und sich die Waschlösung in ihrer Farbe nicht mehr änderte, kann die enzymatische Verdauung gestartet werden. Hierzu wird das Enzym Liberase (Liberase<sup>TM</sup>, HI-purified Enzyme Blend for Human Islet Isolation, Roche<sup>®</sup>) mit 20 mL Aqua ad injektibile verdünnt und entsprechend der Fettgewebsmenge mit einer Spritze in den Beutel überführt. Das Enzym wird in einer Konzentration von 0,125 mg Enzym pro 200 ml Zellsuspensionslösung und 20 g Fettgewebe verwendet.

Die Verdauung erfolgt bei 37°C unter regelmäßigem Schütteln über 60 min in speziellen Geräten zum Auftauen von Blutprodukten. Nach der Verdauung hat der Beutelinhalt eine stark gelblich-trübe Farbe.

In dem hängenden Beutel schwimmt das freie Fett dem Dichtegradient nach auf dem Flüssigkeitsspiegel. Die Stammzellen befinden sich als Suspension in der Flüssigkeit.

Der Unterstand kann schließlich vorsichtig in einen neuen Beutel abgefüllt werden, während das Fett im alten Beutel verbleibt und für bakteriologische Untersuchungen zur Verfügung steht.



**Abb. 4.1.5** Ergebnis der enzymatischen Verdauung, a) Beutelinhalt als homogene gelbliche Masse, b) Aufspaltung von Zellsuspension und Fett nach dem Dichtegradient im hängenden Compoflex-Beutel, c) Abfüllen der Zellsuspension.

### 4.2.5 Konzentrierung

Um die gewonnenen Zellen zu konzentrieren wird der Beutel mit seinem Inhalt bei 1000 rpm über 10 min (400 G) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation kann der Überstand abgepresst werden und im Beutel verbleiben etwa 20ml Zellsuspension mit den darin enthaltenen Stammzellen. Diese können anschließend in die reguläre Zellkultur überführt werden.

In der Zellsuspension befinden sich nach Abschluss aller Isolationprozesse neben den Stammzellen noch weitere Zellen. Da die Stammzellen die einzig adhärenen Zellen sind, erhält man nach dem ersten Mediumwechsel eine reine Stammzellkultur.



**Abb. 4.1.6** Zellsuspension nach Abschluss des Isolationsprozesses. Im Compoflex-Beutel verbleiben ca. 20 ml Zellsuspension mit den darin befindlichen adipogenen Stammzellen.

### **4.2 Zellkultur humaner adulter Stammzellen**

Die nach dem oben beschriebendem Isolationsprotokoll gewonnenen humanen fettabgeleiteten Stammzellen wurden mit HAM's F10 Medium in T75-Flaschen in Kultur genommen. Die Kultivierung erfolgt in Inkubatoren bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit bis zu einem Konfluenzgrad von etwa 95%. Der Mediumwechsel mit jeweils 25 ml frischem Medium wurde alle zwei Tage durchgeführt. Mit Hilfe des inversen Mikroskops wurde die Zellkultur täglich beobachtet und kontrolliert.

#### **4.2.1 Passagieren der adulten Stammzellen**

Nachdem die Stammzellen weitgehend konfluent gewachsen sind, werden die Zellen in eine neue Passage überführt. Um die Stammzellen in Einzelsuspension zu bringen, wurde das proteolytische Agens Trypsin-EDTA verwendet. Hierzu wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und für 3-5 min bei 37°C mit 5 ml 0,2% Trypsin und 0,05% EDTA inkubiert. Die Zellseparation konnte durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren unterstützt werden. Daraufhin wurde die Trypsin-Reaktion mit 9 ml HAM's F10 Medium abgestoppt und die gesamte Zellsuspension konnte in einem 15 ml Falcon-Röhrchen bei 1000 rpm über 5 min (160 G) abzentrifugiert werden. Das Zellpellet wurde in 6 ml resuspendiert und zu 1/3 in die reguläre Zellkultur überführt.

#### **4.2.2 Einfrieren der adulten Stammzellen**

In regelmäßigen Abständen wurde ein Teil der Stammzellen zur Konservierung eingefroren. Hierzu wurden die Zellen wie oben beschrieben trypsiniert und zentrifugiert. Alle nun folgenden Prozeduren wurden auf Eis durchgeführt. Das Pellet wurde in 5 ml frisch angesetztem, eiskaltem Einfriermedium resuspendiert und zu je 1 ml in vorgekühlte Kryoröhrchen überführt. Die Kryoröhrchen wurden zunächst für 2 h Stunden bei -20°C eingefroren und dann über 24 h bei -80°C gelagert. Danach können sie zur endgültigen Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt und darin über mehrere Jahre aufbewahrt werden.

### 4.2.3 Auftauen der adulten Stammzellen

Das Auftauen der Zellen aus dem flüssigen Stickstoff sollte sehr schnell durchgeführt werden, da das im Medium enthaltene Frostschutzmittel DMSO toxisch auf die Zellen wirkt. Hierzu wurden die Kryoröhrchen innerhalb von ca. 1-2 min im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Die Zellsuspension wurde in 10 ml Medium aufgenommen und mit 1000 rpm über 5 min (160 G) zentrifugiert. Das Zellpellet kann daraufhin im Medium resuspendiert werden und in die reguläre Zellkultur überführt werden.

### 4.3 Zellkultur DU-145 Zellen, Züchtung von Tumorsphäroiden

Die Prozeduren für die Handhabung der DU-145 Zellen in der Zellkultur gleichen den Beschreibungen, wie sie in Kapitel 4.2 dargestellt sind. Auch diese Zellen können mit HAM's F10 Medium kultiviert werden.

Für die Züchtung von Tumor-Sphäroiden wurden ca.  $3\text{-}5 \times 10^6$  DU-145 Zellen in silikonisierte Spinnerflaschen (250 ml) überführt, die mit 125 ml HAM's F10 Medium gefüllt waren. Nach 24 h wurden die Flaschen auf ein Endvolumen von 250 ml mit Medium aufgefüllt. Der tägliche Mediumwechsel erfolgte durch Austausch von 125 ml Medium.



**Abb. 4.3.1** System der Spinnerflaschen zur Züchtung von 3-dimensionalen Tumorsphäroiden

## 4. Methoden

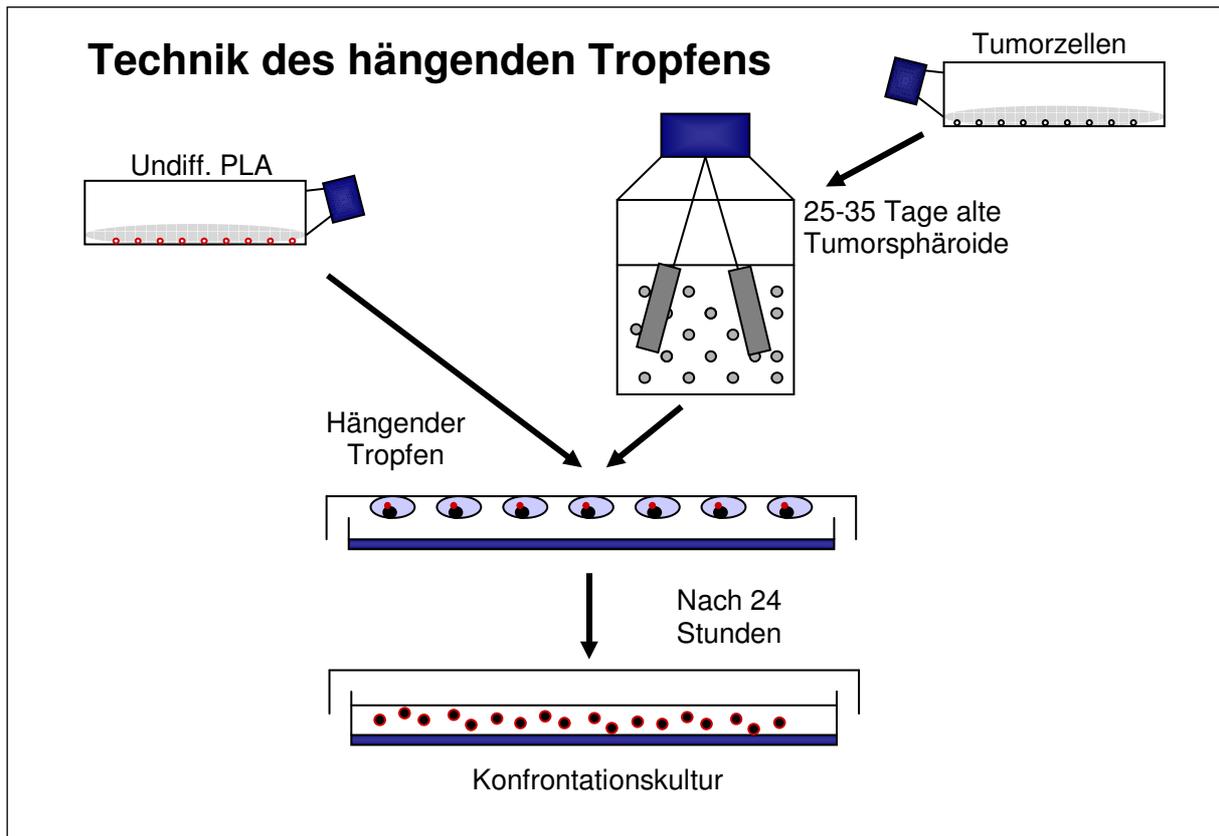
---

Die Kultivierung der Zellen in den Spinnerflaschen wurde im Inkubator bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit auf einem Magnetrührer mit einer Frequenz von 20 Umdrehungen pro Minute und einem Richtungswechsel nach 1440° (vier vollständige Umdrehungen) durchgeführt. Innerhalb von 25-35 Tagen wachsen im Spinnerflaschen-System Tumor-Sphäroide mit einer Größe von ca. 400 µm heran. Der Vorteil von diesen Tumorsphäroiden ist der dreidimensionale Charakter und die Entstehung einer zentralen Hypoxie. Somit eignet sich das Modell der Tumorsphäroide besonders zur Erforschung der Tumorbiologie. Das Spinnerflaschensystem ermöglicht im Vergleich zum hängenden Tropfen oder einer Kultivierung auf Schüttlern eine wesentlich einfache Züchtung, indem eine Adhärenz von Zellen vermieden wird und der Sicherstellung eines konstanten Austausches von Sauerstoff und Nährstoffen garantiert ist.

### **4.4 Konfrontationskulturen**

Die Präparation von Konfrontationskulturen zwischen Tumorsphäroiden und undifferenzierten Stammzellen erfolgte, um die Einflüsse des Tumors auf die Differenzierungseigenschaften von adulten Stammzellen näher zu untersuchen. Hierzu wurden DU-145 Tumorzellen wie oben beschrieben im Spinnerflaschensystem zu Sphäroiden angezüchtet. Zur Markierung für eine spätere Auswertung der Versuche wurden die Tumorsphäroide mit dem roten Vitalfarbstoff BODIPY und die verwendeten Stammzellen mit dem grünen Lebendfarbstoff CMFDA (jeweils 10 µM in Zellkulturmedium) 30 min bei 37°C im Inkubator angefärbt.

Die Konfrontationskulturen wurden in bakteriologischen Schalen (⊙ 12 cm) angesetzt. Hierzu wurden in den Deckel ca. 40 einzelne Tropfen Medium (20 µl) vorgelegt. Jeder Tropfen wurde mit einem Tumorsphäroid einer durchschnittlichen Größe von 300-500 µm bestückt. Dieses Tumorsphäroid wurde anschließend mit ca. 1000-2000 Stammzellen beimpft. Um eine Verdunstung der Tropfen zu vermeiden, wurden in den Boden der bakteriologischen Schalen ca. 10 ml PBS pipettiert. Die fertigen Kulturen konnten nun über Nacht durch vorsichtiges Umdrehen des Deckels im hängenden Tropfen konfrontierend wachsen. Nach 24 h wurden die Konfrontationskulturen vorsichtig mit einer Pipette aus dem Tropfen entnommen und in eine bakteriologische Schale mit HAM F10 Medium überführt. Zur Vermeidung der Adhärenz zwischen den jeweiligen Co-Kulturen erfolgte die weitere Kultivierung auf einem im Inkubator stehenden Wipp-Schüttler.



**Abb. 4.4.1** Schematische Darstellung der Prozeduren zur Präparation von Konfrontationskulturen mit Hilfe der Technik des hängenden Tropfens.

#### 4.5 Immunzytochemische Färbungen

Immunzytochemische Färbungen von Zellen wurden auf runden Deckgläschen ( $\odot$  12mm) durchgeführt. Dazu mussten die Zellen am Vortag trypsinisiert und auf diesen Deckgläschen adhärent anwachsen. Eine Zusammenstellung aller Färbeprozeduren für die entsprechenden Antikörper ist in der Tabelle 4.5 dargestellt. Zunächst wurden die Zellen einmalig mit PBS gewaschen. Je nach verwendetem Antikörper erfolgte eine Fixierung entweder mit 100% Methanol bei  $-20^{\circ}\text{C}$  über 10 min oder mit 4% PFA in PBS auf Eis über 20 min. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit 0,01% PBST gewaschen. Die mit PFA fixierten Zellen mussten zusätzlich mit 1% PBST für 10 min permeabilisiert werden. Zur Blockung von unspezifischen Bindungen wurden die Zellen auf den Deckgläschen mit 10%-igem Milchpulver in 0,01% PBST für 60 min bei Raumtemperatur behandelt.

Die Inkubation mit dem Primäntikörper erfolgte für 90 min bei Raumtemperatur. Sämtliche Antikörper wurden auf die jeweilige verwendete Konzentration in 10% Milchpulver (MP) in 0,01% PBST verdünnt. Anschließend wurden die Zellen 3-4 mal mit 0,01%-igem PBST

## 4. Methoden

gewachsen, um nicht-gebundenen Primärantikörper zu entfernen. Die Inkubation mit dem entsprechenden Sekundärantikörper wurde unter Lichtschutz bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach Abschluss der Inkubationsschritte wurden die Proben erneut 3-4 mal mit 0,01%-igem PBST gewaschen.

Die Proben konnten bei 4°C in 0,01% PBST bis zur Auswertung am konfokalen Mikroskop gelagert werden.

	<b>vWF</b>	<b>VE-Cadherin</b>	<b>Tie-2</b>	<b>Flt-1</b>	<b>FLK</b>
<b>Fix</b>	<i>4% PFA</i> (20min auf Eis)	<i>Methanol</i> (20min bei - 20°C)			
<b>Permeab.</b>	<i>PBST 0,1%</i> (100 µl 10 min)	-----			
<b>1. Ak</b>	<i>1:100 (0,5µg)</i> (MP) 90 min	<i>1:100 (0,5µg)</i> (MP) 90 min	<i>1:20 (0,5µg)</i> (MP) 90 min	<i>1:50 (0,2µg)</i> (MP) 90 min	<i>1 :50 (1µg)</i> (MP) 90 min
<b>2. Ak</b>	<i>1:100 (0,3µg)</i> (MP) Cy-5, 60 min				

	<b>Oct-4</b>	<b>STRO-1</b>	<b>CD13</b>	<b>CD 105</b>	
<b>Fix</b>	<i>4% PFA</i> (20min auf Eis)	<i>4% PFA</i> (20min auf Eis)	<i>Methanol</i> (20min bei - 20°C)	<i>Methanol</i> (20min bei - 20°C)	
<b>Permeab.</b>	<i>PBST 0,1%</i> (100 µl 10 min)	-----	-----	-----	
<b>1. Ak</b>	<i>1 :50 (1µg)</i> (MP) 90 min	<i>1 :10 (0,5µg)</i> (MP) 90 min	<i>1 :50 (0,2µg)</i> (MP) 90 min	<i>1 :20 (0,25µg)</i> (MP) 90 min	
<b>2. Ak</b>	<i>1:100 (0,3µg)</i> (MP) Cy-5, 60 min	<i>1:100 (0,3µg)</i> (MP) FITC 60 min	<i>1:100 (0,3µg)</i> (MP) Cy-5, 60 min	<i>1:100 (0,3µg)</i> (MP) FITC 60 min	

**Tab. 4.5.1** Übersicht über die verwendeten Antikörper für die immuncytochemischen Färbungen. Sämtliche Antikörpermengen sind auf ein verwendetes Endvolumen von 50 µl berechnet (MP = Milchpulver).

## 4. Methoden

---

### ***SYTOX-Kernfärbung***

Färbungen mit dem Kernfarbstoff SYTOX erfolgten im Anschluss an die immunzytochemischen Färbungen. Hierzu wurde SYTOX in einer Konzentration von 1:10.000 (50nM) in 10% Milchkpulver in 0,01%PBST angesetzt und die bereits fixierten und gefärbten Zellen für 10 min bei Raumtemperatur mit dieser Kernfärbelösung inkubiert.

### ***Lebend-Zell-Färbung mit CMFDA und BODIPY***

Die Vitalfärbung mit CMFDA und BODIPY diente zur Markierung von Zellen in der jeweiligen Fluoreszenzfarbe und zur Unterscheidung der verschiedenen Zellen in den Co-Kulturen. Die Färbung der lebenden Zellen war für ca. 4 Tage ausreichend nachweisbar und wurde durch die durchgeführten Fixierungsmethoden nicht beeinflusst. Eine Betrachtung und Auswertung nach immunzytochemischer Färbung war somit möglich.

Die Inkubation der Zellen mit den Lebendzellfarbstoffen erfolgte nach einer Verdünnung von 1:1000 mit Zellkulturmedium (10 $\mu$ M) über 30 min im Inkubator bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit Medium gewaschen und in frisches Medium überführt.

CMFDA als grüner Zellfarbstoff emittiert Licht nach Anregung mit dem Argon-Laser (488nm) im grünwelligen Bereich, während BODIPY als roter Zellfarbstoff nach Anregung durch den Helium-Neon-Laser (633nm) im rotwelligen Bereich Licht emittiert.

<b>Fluoreszenzfarbstoff</b>	<b>Absorption (nm)</b>	<b>Emission (nm)</b>
Cy-5	514, 552, 552	566, 570
Cy-3	649	666, 670
FITC	490, 494	520, 525
SYTOX	488	504, 523
CMFDA	492	517
BODIPY	581	591

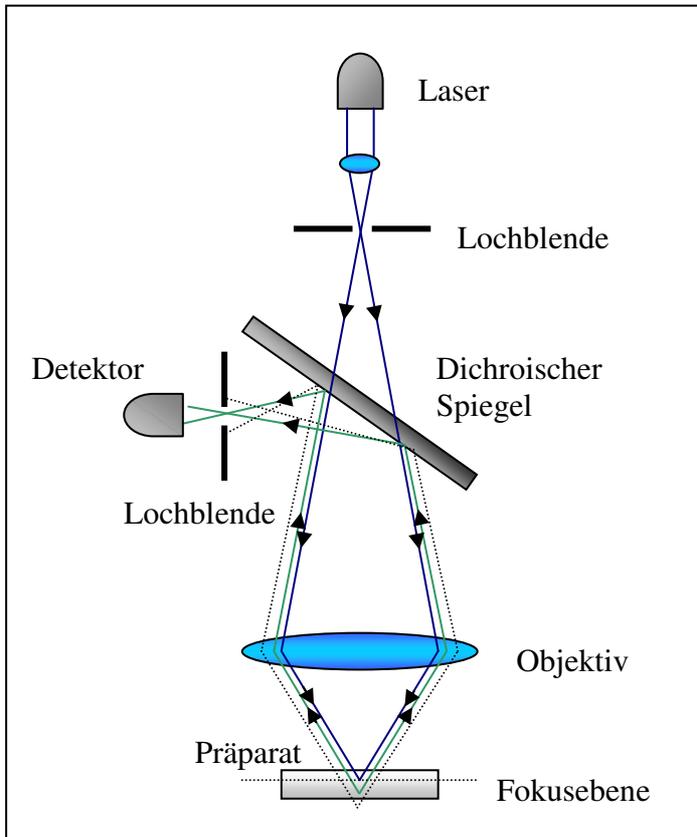
### ***4.6 Konfokale Lasermikroskopie***

Die konfokale Mikroskopie unterscheidet sich von der normalen Lichtmikroskopie durch die verschiedenen Techniken zur Erzeugung eines mikroskopischen Bildes mit deutlich

## 4. Methoden

gesteigerter Auflösung. Bei einem normalen Lichtmikroskop entsteht das Bild durch die Überlagerung einer scharfen Abbildung der Punkte in der Fokusebene und einer unscharfen Abbildung der Punkte außerhalb dieser Ebene. Die unscharf abgebildeten Anteile außerhalb der Fokusebene lassen sich nicht unterdrücken und beeinträchtigen somit deutlich die Auflösung des Bildes. In der konfokalen Mikroskopie wird das Licht einer punktförmigen Lichtquelle (in der Regel ein Laser) in die Probe maximal hineinfokussiert. Das Licht trifft somit direkt auf die Fokusebene. Aus der Fokalebene emittiertes Licht wird meist durch das gleiche Objektiv auf einer Lochblende abgebildet und gelangt von dort auf einem Detektor. Anregungs- und Detektionsfokus liegen somit konfokal, also übereinander. Durch einen nachgeschalteten Computer können die Signale aufgezeichnet und ausgewertet werden. Den prinzipiellen Aufbau eines konfokalen Mikroskops mit seinem Strahlengang ist in der Abbildung 4.6.1 dargestellt.

Optische Informationen, die nicht aus der Fokusebene kommen, werden zweifach unterdrückt: Zum einen werden Probenanteile außerhalb der Fokusebene nur sehr schwach beleuchtet und zum anderen kann auf Grund der Bauweise emittiertes Licht außerhalb der Fokusebene nicht auf die Lochblende fokussiert werden. Die störende Fluoreszenz außerhalb der Fokusebene wird somit unterdrückt und kann vom Detektor nicht aufgezeichnet werden.



**Abb. 4.6.1** Schematische Darstellung des Strahlengangs eines konfokalen Mikroskops. Das Licht einer punktförmigen Lichtquelle (Laser, Linse, Lochblende) wird über einen dichroischen Spiegel in den Strahlengang des Mikroskops eingebracht und durch das Objektiv in das Präparat fokussiert. Emissionslicht aus der Fokusebene wird durch das gleiche Objektiv und die Detektorlochblende von einem Detektor aufgenommen. Licht außerhalb der Fokusebene wird durch die Detektorlochblende abgeblockt (gestrichelte Linie).

## 4. Methoden

---

Durch diese Technik der konfokalen Lasermikroskopie konnten eine deutliche Erhöhung des Kontrastes und eine erhebliche Verringerung der störenden Fluoreszenz erreicht werden.

Die Auflösung ist allerdings wie beim Lichtmikroskop durch die Wellenlänge des verwendeten Lasers begrenzt. Bei blauem Licht beträgt sie ca. 200 nm lateral und 500 nm axial, bei längerwelligem Licht ist sie dementsprechend kleiner.

Da der Fokus immer nur auf einem Punkt liegt, ist es notwendig, die Probe automatisch abzurastern (Ablenkung in der x/y- Achse) und die einzelnen Informationen mit Hilfe eines Computers zu einem Bild zusammenzusetzen. Das dargestellte Bild gibt somit die Fluoreszenzintensitäten innerhalb der Fokusebene wieder und wird deshalb auch als optischer Schnitt bezeichnet. Durch Verschieben der Fokusebene (z-Ebene) in der Probe kann durch Addition der Fluoreszenzintensitäten eine 3-dimensionale Darstellung der Probe erzeugt werden.

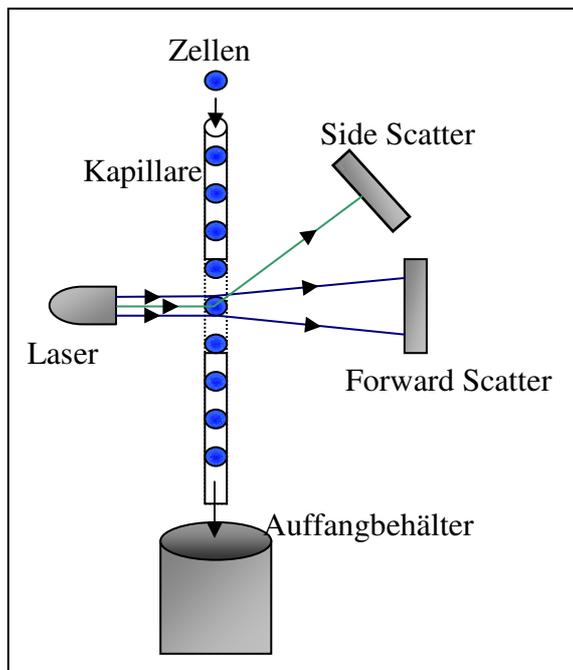
Konfokale Mikroskope nutzen Laser mit speziellen Wellenlängen des Lichtes, um die fluoreszierenden Moleküle in einer Probe anzuregen. Durch die Energie des Lichtes einer bestimmten Wellenlänge werden in fluoreszierenden Substanzen Elektronen in einen angeregten, energiereichen Zustand übergeben. Diesen Vorgang bezeichnet man als Absorption. Nach Unterbrechung der Energiezufuhr springen die Elektronen zurück in ihr Grundenergieniveau. Die dadurch freiwerdende Energie wird als Wärme und Fluoreszenzlicht abgegeben. (Haugland 1996, Schild 1996) Das Fluoreszenzlicht ist immer energieärmer und somit längerwellig als das Anregungslicht. Wird die anregende Energie konstant gehalten, ist die Anzahl der emittierten Photonen proportional zur Anzahl der vorhandenen Fluoreszenzmoleküle. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Mikroskop stehen folgende drei Laser mit ihren entsprechenden Wellenlängen zur Verfügung: 458/488nm Argon, 543nm HeNe (Helium/Neon) und 633nm HeNe. Zusätzlich können noch Argon-Laser im UV-Bereich des Lichtes (351, 364), Helium-Cadmium-Laser (442 nm) im kurzwelligen und Krypton-Laser im längerwelligem Licht optional mit einem LSM betrieben werden.

Das Konfokale Mikroskop wurde in dieser Arbeit vielseitig zum Nachweis von Oberflächenstrukturen nach Antikörperfärbung und zur Darstellung von Vorgängen in den Zellen mit Hilfe optischer Schnitte verwendet. Die Bilder wurden mit einem Computerprogramm (Scanware, Leica) aufgenommen und mit Hilfe der Leica Confocal Software SP2 ausgewertet.

### 4.7 Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrie (flow cytometry) bezeichnet eine Methode, mit der in einem laminarem Fluss mikroskopisch kleine Teilchen, z.B. Zellen untersucht werden können. Die Teilchen bzw. Zellen lassen sich in ihrer Anzahl zählen und nach ihren Eigenschaften charakterisieren und sortieren. Der Flüssigkeitsstrom wird durch eine im Gerät befindliche Kapillare gesaugt und passiert im Sensormodul einen vertikalen Laserstrahl. Trifft nun ein Teilchen auf den Laserstrahl, wird das Laserlicht gebeugt und reflektiert und es entsteht Streulicht. Je größer eine Zelle ist und je mehr Strukturen in ihrem Inneren sind, desto größer ist das entstehende Streulicht. Dieses kann durch zwei Parameter charakterisiert werden. Das gebeugte Vorwärtsstreulicht FSC (*Forward Scatter*) ist ein Maß für die Teilchengröße bzw. Zellgröße, während das reflektierte Seitwärtsstreulicht SSC (*Side Scatter*) als Maß für die Granularität, z.B. Größe und Struktur des Zellkerns genommen werden kann. Mit dieser Methode lassen sich bereits viele Zellen anhand ihrer morphologischen Eigenschaften auftrennen und unterscheiden.

Durch den Einsatz von ferromagnetisch markierten Antikörpern lassen sich die Zellen nach bestimmten Eigenschaften sortieren. Nach Bindung des Antikörpers werden die Zellen durch ein Magnetfeld im Gerät aus ihrem normalen Fluss abgelenkt und separiert.



**Abb. 4.7.1** Schematische Darstellung der Funktionsweise der Durchflusszytometrie. In der Kapillare fließt ein Flüssigkeitsstrom mit den entsprechenden Teilchen. Auf die Teilchen treffendes Laserlicht wird entweder gebeugt oder reflektiert und durch den Side Scatter oder Forward Scatter detektiert.

Eine besondere Form der Durchflusszytometrie ist die FACS-Analyse (*Fluorescence activated cell sorting*). Hierbei wird die Probe vorher mit Antikörpern inkubiert, die an

## 4. Methoden

Fluoreszenzfarbstoffe gebunden sind. Durch die Anregung des Lasers, emittiert die Probe Fluoreszenzlicht, welches ebenfalls nach Vorwärtsstreulicht und Seitwärtsstreulicht aufgeschlüsselt werden kann. Durch diese erweiterte Methode lassen sich weitgehend alle Merkmale einer Zellpopulation entsprechend der verwendeten Antikörper untersuchen. Durch den Einsatz verschiedener Laser kann die Anzahl der einsetzbaren Farbstoffe und damit die Informationsdichte erhöht werden.

In dieser Arbeit wurde die FACS-Analyse verwendet, um die Stammzellen und die aus ihnen differenzierten Zellen als Ergänzung zur Immunfluoreszenz zu charakterisieren. Das Färbeprotokoll bei den verwendeten Antikörpern unterschied sich vor allem in der Notwendigkeit einer Fixierung. Eine detaillierte Darstellung ist für jeden Antikörper in der Tabelle zusammengestellt.

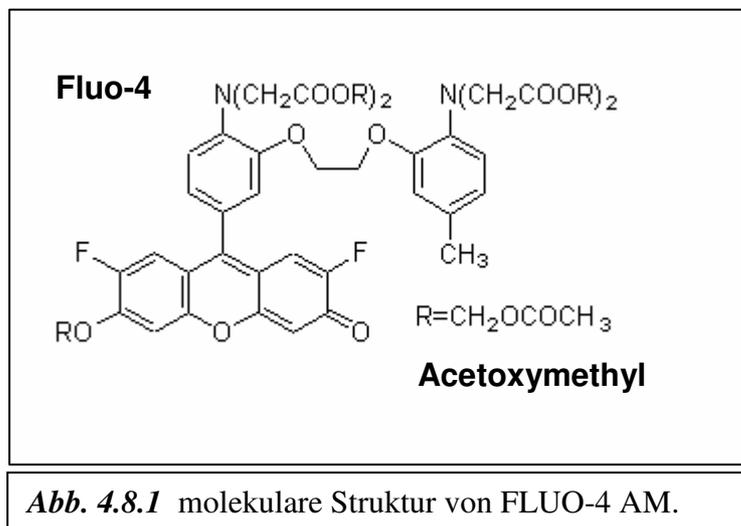
Prinzipiell wurden Zellen aus konfluenten T75-Zellkulturschalen mit jeweils 5 ml PBS gewaschen und anschließend mit 5 ml Trypsin/ETDA vereinzelt. Nach Zentrifugation (5 min, 1000 rpm, 160 G) wurde das Zellpellet noch einmal mit PBS gewaschen. Bei Verwendung von Antikörpern, die eine Fixierung benötigten, wurden die Zellen für 10 min mit eiskaltem Methanol bei -20°C fixiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Die weiteren Schritte sind für alle Antikörper gleich. Nach sämtlichen Waschschrritten wurde die Zellsuspension zentrifugiert (1000 rpm, 5 min, 160 G) und der Überstand verworfen. Das Zellpallet ( $1 \cdot 10^6$  Zellen) wurde in 100 µl Blockreagenz (10% FCS in 0,01% PBST) resuspendiert und für 30 min auf Eis geblockt. Für weitere 30 min wurden die Zellen mit der jeweiligen Antikörperkonzentration in insgesamt 150 µl inkubiert. Hierzu konnte die Antikörperkonzentration auf 150 µl Gesamtvolumen berechnet und in 50 µl gelöst werden. Nach jeweils 15 min wurde die Lösung zusätzlich mit der Pipette durchmischt. Nach zweimaligem Waschen erfolgte die Inkubation mit einem FITC-konjugierten sekundären Antikörper (1:300, 0,3 µg/150 µl) für ebenfalls 30 min unter Lichtschutz. Im Anschluss wurde die Probe zweimal mit PBS gewaschen und am FACS-Gerät analysiert. Als Kontrolle wurde bei allen Untersuchungen jeweils eine mit IgG (1:200, 1 µg/150 µl) markierte Probe mitgeführt.

	<b>CD13</b>	<b>STRO-1</b>	<b>CD105</b>	<b>VWF</b>	<b>VeCAD</b>	<b>TIE-2</b>
<b>Fixierung</b>	-----	-----	-----	<b>Methanol</b> (10min bei - 20°)	<b>Methanol</b> (10min bei - 20°)	<b>Methanol</b> (10min bei - 20°)
<b>1. AK</b> (Konzentration für 1 Mio Zellen)	<b>1:30</b> (1µg/150µl)	<b>1:3</b> (5µg/150µl)	<b>1:30</b> (0,5µg/150µl)	<b>1:100</b> (1µg/150µl)	<b>1:50</b> (0,3µg/150µl)	<b>1:50</b> (1,5µg/150µl)

### 4.8 Calcium Messungen

Intrazelluläre Calcium-Ionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ) spielen unter anderem als Botenstoffe in Signaltransduktionsprozessen eine große Rolle. Um die Calcium-Konzentrationen optisch darzustellen und analytisch zu messen, werden Fluoreszenzmoleküle verwendet, die Calcium-sensitiv fluoreszieren. Unter dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop können nach Inkubation mit den Calcium-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen in lebenden Zellen die dynamischen Konzentrationen von Calcium-Ionen nachgewiesen werden.

Zur Färbung wurde der Fluoreszenzfarbstoff FLUO-4 AM (1-[2-Amino-5-(2,7-difluoro-6-hydroxy-3-oxo-9-xanthenyl)phenoxy]-2-(2-amino-5-methylphenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid, pentaacetoxymethyl ester) verwendet. FLUO-4 AM ist durch die Kopplung mit Acetoxymethylester membrangängig und kann somit von den Zellen aufgenommen werden. Der Acetoxymethylester selbst ist nicht Calcium-sensitiv, erst nach hydrolytischer Spaltung durch zytosolische Esterasen kann die freie Carbonsäure chelatartig Calcium binden. Bei niedriger Calcium-Konzentration ist die Fluoreszenz sehr gering, bei höherer Konzentration steigt die Fluoreszenz stark an.



Für die Calcium-Messungen wurden die Stammzellen auf 12 mm Deckgläschen ausplattiert und konnten nach 24 h mit 10  $\mu\text{M}$  FLUO-4 AM im Zellkulturmedium angefärbt werden. Die Inkubation fand bei 37°C im Inkubator für 30 min statt. Nach einem Waschschrift mit Medium wurde das Deckgläschen in eine mit warmem Medium gefüllte Mikroskopierkammer überführt. Die Auswertung erfolgte im LiveDATA Mode am konfokalen Mikroskop unter Verwendung des Argon-Laser (488 nm). Die calciumabhängigen Fluoreszenzen (>515 nm)

## 4. Methoden

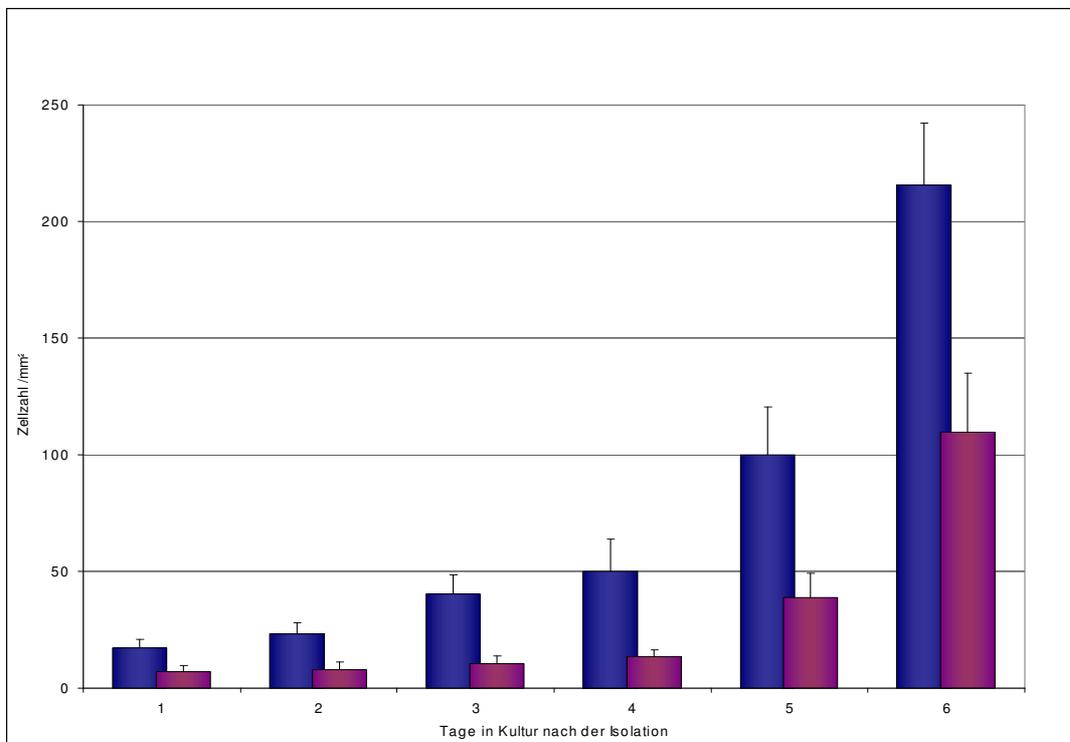
---

des Farbstoffe FLUO-4 AM wurde alle 5 s gemessen und über einen Zeitraum von mindestens 10 min aufgezeichnet und graphisch dargestellt.

# 5. Ergebnisse

## 5.1 Isolation humaner fettabgeleiteter Stammzellen

Ein Teil dieser Arbeit stellte die Etablierung und Optimierung der Isolationsmethode von humanen Stammzellen aus Fettgewebe dar. Eine sehr ausführliche Beschreibung des erarbeiteten Verfahrens ist im Methodenteil dieser Arbeit dargestellt. Sämtliche humanen fettabgeleiteten Stammzellen wurden anhand dieses Protokolls isoliert. Um für die spätere Zellkultur eine möglichst reine und hohe Ausbeute von Stammzellen aus dem Fettgewebe zu gewährleisten, erfolgte zu Beginn der Versuche die Optimierung des Isolationsprotokolls.



**Abb. 5.1.1** Untersuchung des Wachstumsverhalten in Abhängigkeit des Zeitraums bis zur Überführung in die reguläre Zellkultur. Es wurde die Zellzahl pro mm<sup>2</sup> bestimmt, die ursprünglich aus 500 µl Zellsuspension direkt nach den Isolationsprozessen (blau) und nach 4 Stunden (rot) gewonnen werden konnte.

Hierbei stellten sich drei Faktoren als besonders wichtig für eine hohe Stammzell-Ergiebigkeit aus dem Fettgewebe heraus. Zum einem musste das Fettgewebe durch sorgfältige mechanische Zerkleinerung gut präpariert werden und zum anderen waren die vielen Waschschriffe notwendig, um das Fettgewebe möglichst frei von Hämatozyten zu

## 5. Ergebnisse

---

bekommen. Ein dritter entscheidender Faktor war die zeitnahe Überführung der Stammzellen nach der Isolation in die Zellkultur.

Da die Stammzellen im Gegensatz zu sämtlichen anderen Zellen aus der Isolation adhärent auf dem Boden der Zellkulturschalen wachsen, konnten durch Mediumwechsel am nächsten Tag noch bereits vorhandene Nicht-Stammzellen entfernt und eine reine Kultur gewonnen werden.

Wie in der Abbildung 5.1.1 dargestellt, konnten bei zeitnaher Überführung (<30 Min) der Stammzellen in die Zellkultur bis zu 58% mehr Zellen gewonnen werden, als bei einer Überführung nach 4 h. Die Daten wurden durch die tägliche Auszählung aller adhärennten Zellen bis zum Tag 6 aus jeweils zehn mikroskopischen Sichtfeldern (n=10) gewonnen. Durch Größenbestimmung eines Sichtfeldes konnte die Zellzahl auf einer standardisierten Fläche von 1 mm<sup>2</sup> bestimmt werden.

Aus den gewonnenen Daten lässt sich zudem durch folgende Formel die Ergiebigkeit der Isolationsmethode pro Gramm Fettgewebe ermitteln.

$$k = \frac{n_{zell} * A_{ges} * V_{iso}}{G_{Fett} * V_{zell}}$$

**Formel 5.1.2** Formel zur Berechnung der Ergiebigkeit der Isolationsmethode zur Gewinnung von adulten fettabgeleiteten Stammzellen

*Stammzellen k = Konzentration (Zellen/Gramm Fettgewebe),  $n_{zell}$  = Zellzahl (1/mm<sup>2</sup>),  $A_{ges}$  = gesamte Zellkulturfläche (mm<sup>2</sup>),  $V_{iso}$  = Volumen der isolierten Zellsuspension pro Zellkulturfläche (ml),  $G_{Fett}$  = Menge an Fettgewebe (g),  $V_{zell}$  = Volumen der gesamten isolierten Zellsuspension (ml)*

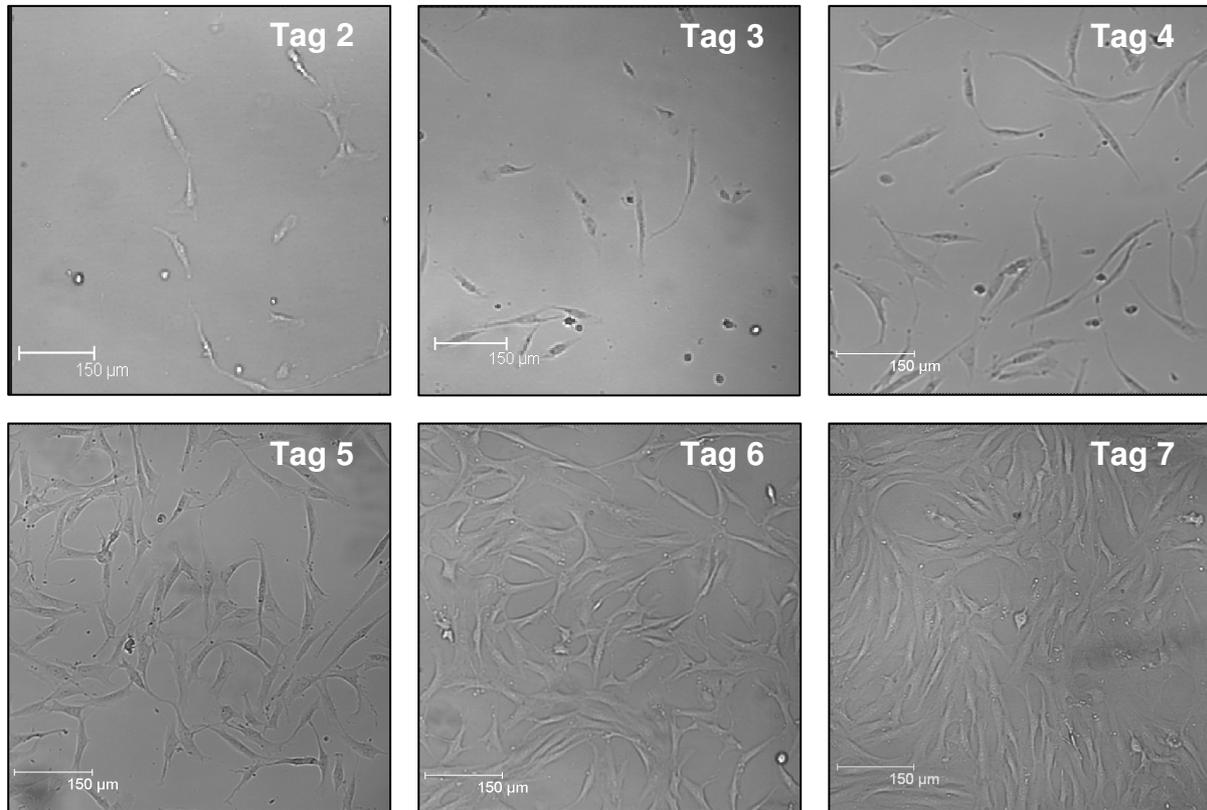
Laut Berechnungen konnten aus einem Gramm Fettgewebe unter idealen Bedingungen durch die Isolationsprozeduren 50.000 bis 100.000 Stammzellen gewonnen werden.

### 5.2 Wachstumsmessungen

Als weitere Grundlage für eine optimierte Zellkultivierung der isolierten Stammzellen und zum Nachweis der Proliferationseigenschaften wurden Wachstumsmessungen durchgeführt. Hierzu wurde das Wachstum der isolierten Stammzellen täglich mit Hilfe des inversen Mikroskops beobachtet. Eine Zusammenstellung der mikroskopischen Bilder ist in der

## 5. Ergebnisse

Abbildung 5.2.1 dargestellt. Es zeigt sich eine reine Zellkultur proliferierender Stammzellen, in der ab Tag 7 ist eine weitgehende Konfluenz der Stammzellen erreicht ist.



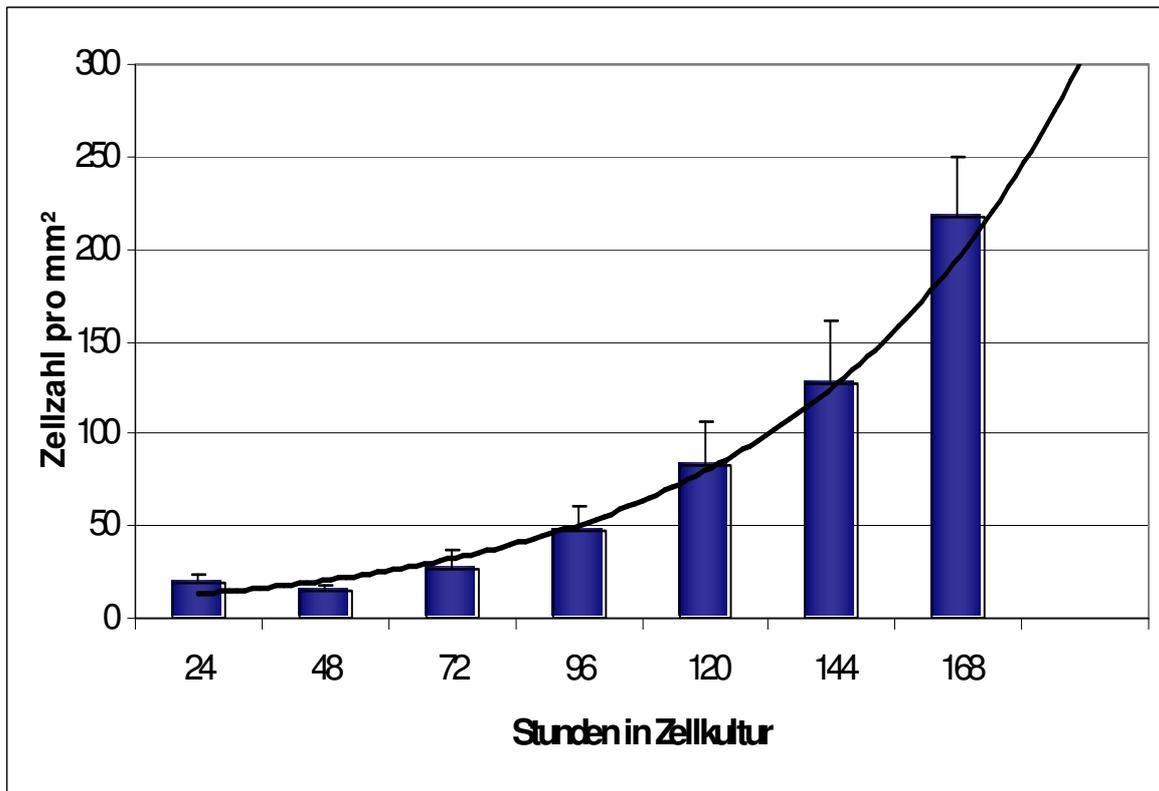
**Abb. 5.2.1** Beobachtung des Stammzellwachstum von Tag 2 bis 7 mit Hilfe des inversen Mikroskops.

Für die Erstellung von Wachstumskurven und der Berechnung der durchschnittlichen Zellverdopplungszeit wurden jeden Tag alle Zellen aus insgesamt 10 Sichtfeldern gezählt und auf eine Standardfläche von 1 mm<sup>2</sup> umgerechnet. Die Rohdaten sind in der Tabelle 5.2.2 und die entsprechende Wachstumskurve in Abbildung 5.2.3 wiedergegeben.

Tage in Zellkultur	1	2	3	4	5	6	7
Zellzahl pro mm <sup>2</sup>	19,5	15,2	27,0	47,0	82,9	127,1	217,7
Standardabweichung	4,0	3,0	9,4	12,9	24,1	33,3	32,5

**Tabelle 5.2.2** Durchschnittliche Zellzahl und Standardabweichung auf einer normierten Fläche von 1 mm<sup>2</sup> für die Berechnung der Wachstums-geschwindigkeit und zum Nachweis der Proliferationseigenschaften der Stammzellen.

## 5. Ergebnisse



**Abb. 5.2.3** Darstellung der Wachstumskurve der Stammzellen in Zellkultur. Hinzugefügt wurde eine auf Grund der Rohdaten berechnete Trendlinie.

Die durch mikroskopische Auszählung gewonnenen Rohdaten (Tab. 5.2.2) entsprechen einer zu erwartenden exponentiellen Wachstumsfunktion  $x = \mu * e^t$  (Abb. 5.2.4) aus der sich die Wachstumskonstante  $\mu$  und die Verdoppelungszeit  $t_d$  berechnen lassen.

## 5. Ergebnisse

---

$$(1) \quad \mu = \frac{\ln x_t - \ln x_0}{t - t_0}$$

$$(2) \quad t_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

a) *Berechnung innerhalb der ersten 72 Stunden*

$$\mu = \frac{\ln 27 - \ln 19,5}{72\text{Std} - 24\text{std}} \approx 0,00677\text{Std}^{-1}$$
$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \approx \frac{0,693}{0,00677\text{Std}^{-1}} \approx 102,4\text{Std}$$

b) *Berechnung nach 72 Stunden*

$$\mu = \frac{\ln 217,7 - \ln 27}{168\text{Std} - 72\text{std}} \approx 0,0215\text{Std}^{-1}$$
$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \approx \frac{0,693}{0,0215\text{Std}^{-1}} \approx 32,2\text{Std}$$

**Formel 5.2.4** Berechnung der Wachstumskonstante  $\mu$  (1) und Verdopplungszeit  $t_d$  (2) für das Zellwachstum a) während der ersten 72 h und b) nach 72 h.

Bei der Berechnung ergeben sich für die ersten 72 h reduzierte Wachstumsgeschwindigkeiten mit Verdopplungszeiten von über 100 h. In der weiteren Zellkultur nach 72 h beschleunigt sich die Wachstumsgeschwindigkeit auf Zellverdopplungszeiten von ca. 30 Stunden. Die genauen Berechnungen sind in der Abbildung 5.2.4 dargestellt.

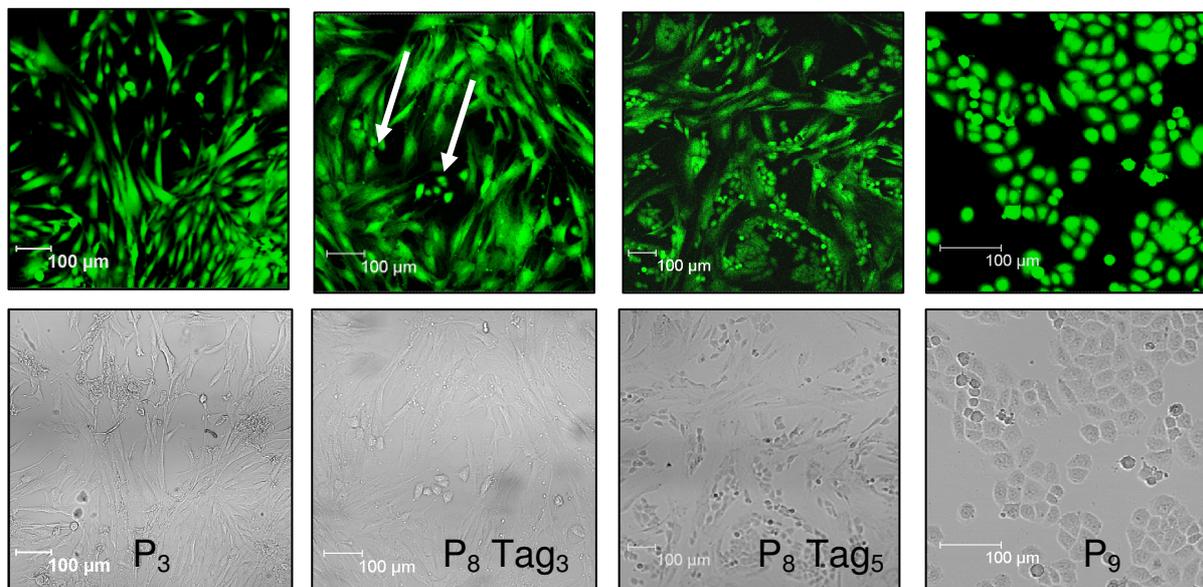
Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass die anfänglichen Isolationsprozeduren einen Stressfaktor darstellen und sich die Zellen zunächst organisieren müssen, bevor sie ihre endgültige Wachstumsgeschwindigkeit erreichen.

Eine weitere Beobachtung von mehr als 168 h (7 Tagen) ließ sich mit dieser Methode nicht realisieren, da die Konfluenz der Zellen soweit zunahm, dass eine sichere Abgrenzung untereinander und Auszählung der Zellen nicht mehr möglich war. Diese Ergebnisse belegen bereits eindeutig die Proliferationseigenschaften der isolierten Stammzellen.

### 5.3 Differenzierungsvorgang

In mehreren Kulturen ( $n \geq 5$ ) konnte eine spontane Differenzierung der sorgfältig isolierten fettabgeleiteten Stammzellen einwandfrei durch die im Weiteren beschriebenen Methoden nachgewiesen werden.

Die Stammzellen differenzierten spontan während der Kultivierung in den späteren Passagen ab Passage 8. Anfangs war die Bildung von kleinen Zellinseln mit differenzierter Morphologie zu beobachten. Diese dehnten sich aus bis weitgehend alle Zellen ihre Morphologie geändert hatten. Nach einer weiteren Passage waren keine Zellen mit stammzellmorphologischen Eigenschaften mehr nachweisbar. Protokolliert wurde das Differenzierungsverhalten unter dem Fluoreszenz-Mikroskop nach Anfärbung mit dem Lebend-Farbstoff CMFDA. Die Abbildung 5.3.1 zeigt das typische Differenzierungsverhalten.



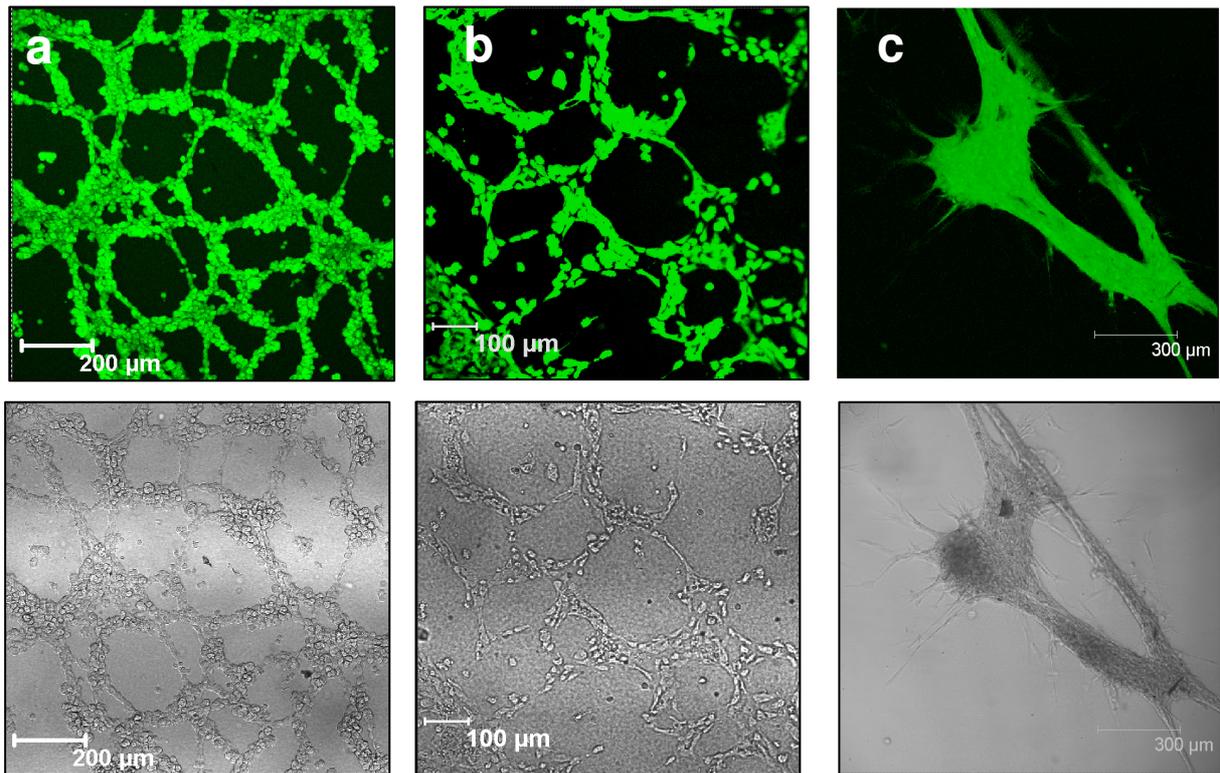
**Abb. 5.3.1** Protokollierung des Differenzierungsverhalten unter dem Fluoreszenz-Mikroskop nach Anfärbung mit CMFDA und im Transmissionsbild. Der Maßstab entspricht 100 µm.

### 5.4 Untersuchung des Zellverhaltens auf Matrigel

Zur weiteren Charakterisierung der Stammzellen und der differenzierten Zellen diente die Untersuchung des Wachstumsverhaltens auf mit Matrigel beschichteten Deckgläschen. Hierzu wurde das Verhalten der Stammzellen und der differenzierten Zellen mit dem von humanen, endothelialen Nabelschnurvenenzellen (HUVEC) verglichen (n=4). Es zeigten sich bereits nach 24 Stunden deutliche Unterschiede im Wachstumsverhalten zwischen den undifferenzierten Stammzellen und den differenzierten Zellen. Die Stammzellen bauten bereits innerhalb weniger Stunden Zellverbindungen auf und bildeten nach 24 h im Gel eine sehr dichte Zellansammlung. Außerhalb der Zellansammlung waren weitgehend keine Zellen mehr nachweisbar. Die differenzierten Zellen formten während der gleichen Beobachtungszeit Netzwerk-ähnliche Strukturen. Diese Strukturen zeigten deutliche Parallelitäten zu den Strukturen der HUVECs im Matrigel. Da die Bildung von Netzwerkstrukturen im Matrigel sehr typisch für endotheliale Zellen ist, beinhalten die gewonnenen Versuchsergebnisse erste Hinweise auf einen endothelialen Charakter der differenzierten Zellen.

Die Protokollierung des Wachstumsverhaltens auf Matrigel wurde ebenfalls mit Hilfe des Fluoreszenz-Mikroskops nach Färbung mit dem grünen Lebend-Farbstoff CMFDA und im Transmissionsbild durchgeführt. Zusammengefasst sind die Ergebnisse in der Abbildung 5.4.1.

## 5. Ergebnisse

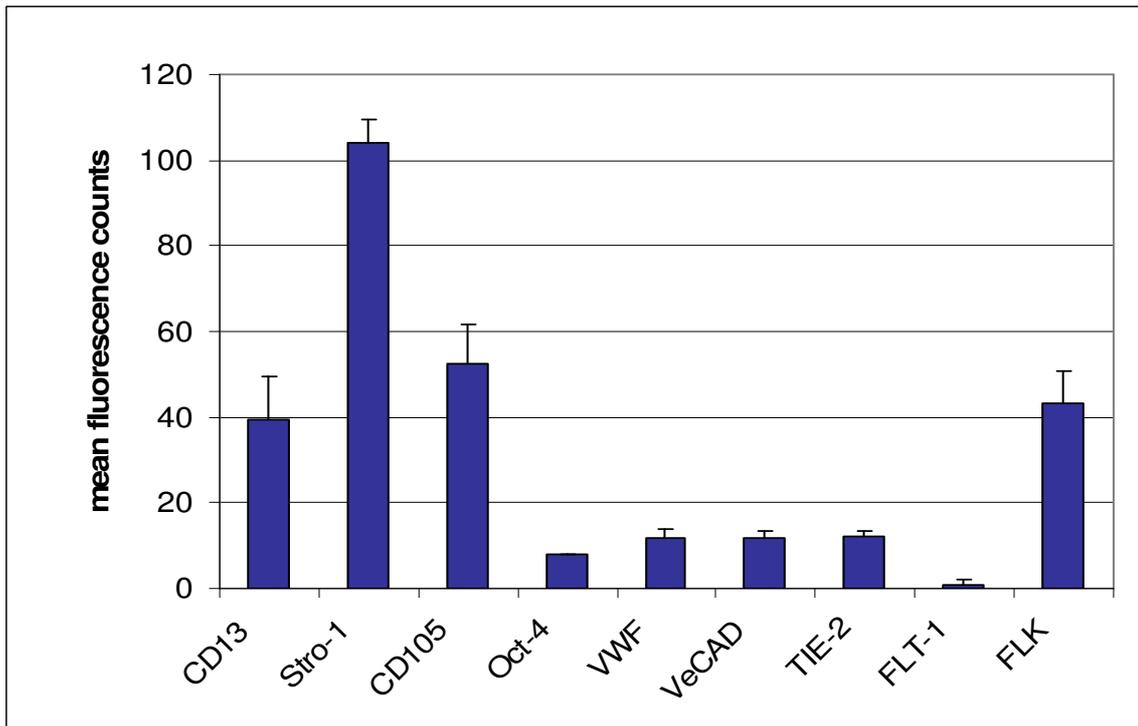


**Abb. 5.4.1** Untersuchung des unterschiedlichen Verhaltens auf Matrigel von a) HUVEC-Zellen, b) differenzierten Zellen und c) Stammzellen nach jeweils 24 Stunden. Darstellung nach Färbung mit dem grünen Lebend-Farbstoff CMFDA unter dem Fluoreszenz-Mikroskop und im Transmissionsbild.

### **5.5 Charakterisierung der Stammzellen durch Immunfluoreszenz**

Sämtliche Zellreihen wurden mit Methoden der Immunfluoreszenzmessung durch das konfokale Mikroskop und durch die FACS-Analyse charakterisiert (n=4). In einem ersten Schritt wurden die Zellen immunzytochemisch untersucht. Die Auswertung der Immunfluoreszenz bei den Stammzellen unter Verwendung von Antikörpern gegen die Stammzellmarker CD13, STRO-1 und CD105 zeigten signifikante Anfärbungen und bestätigen somit den Stammzellcharakter der isolierten Stammzellen. Hingegen konnten bei Verwendung von Antikörpern keine Fluoreszenzsignale gemessen werden, die gegen die endothelialen Marker VWF, VE-Cadherin, TIE-2 und FLT-1 gerichtet sind. Die Abbildungen 5.5.1 und 5.5.2 zeigen die quantifizierten Daten und die dazugehörigen exemplarischen Bilder der Antikörperfärbungen.

## 5. Ergebnisse

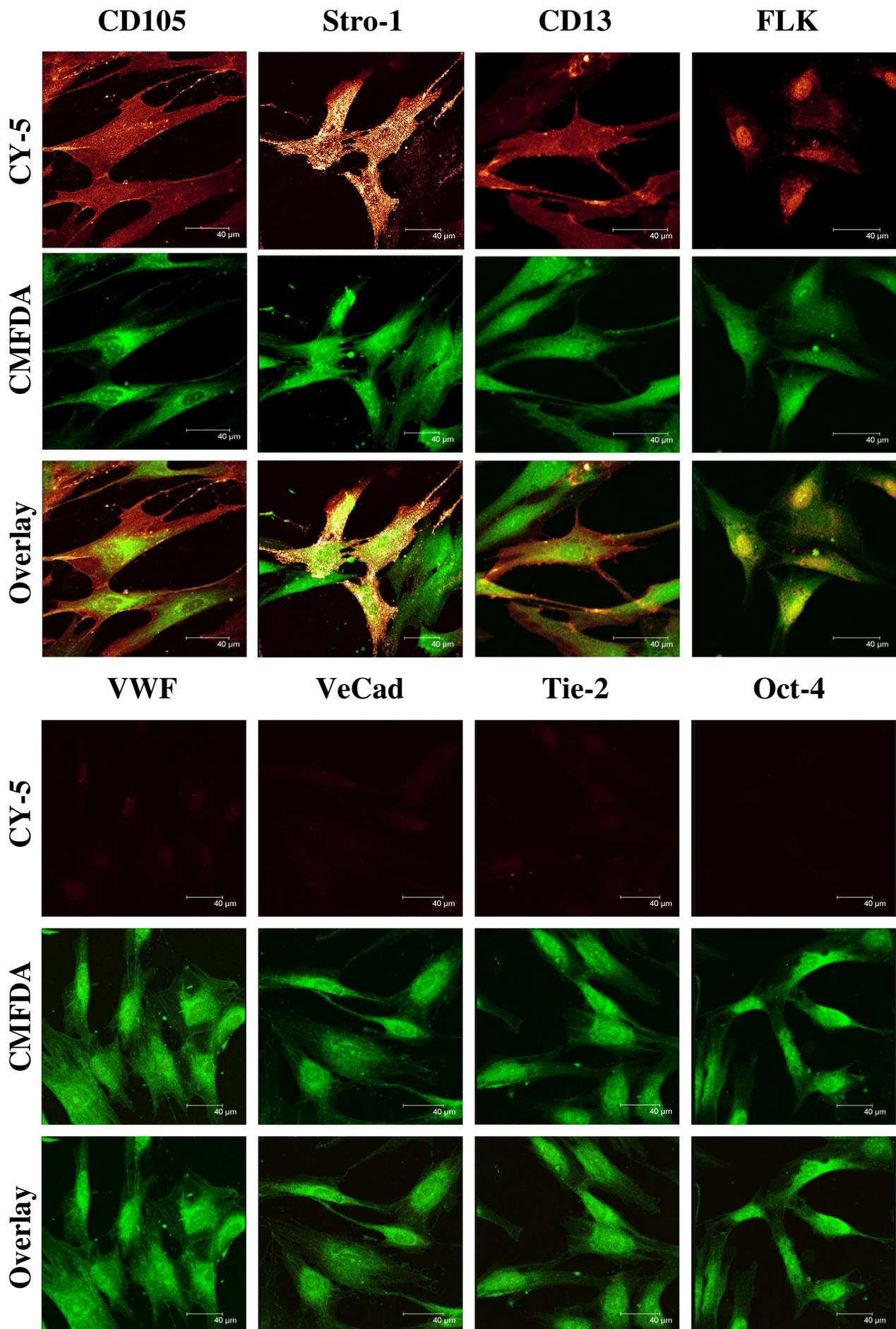


**Abb. 5.5.1** Messung der mittleren Immunfluoreszenz für Stammzellmarker (CD13, Stro-1, CD105, OCT-4) und Endothelmarker (VWF, VECadherin, TIE-2, FLT-1, FLK-1) bei adipogenen Stammzellen (n=4).

**Abb. 5.5.2** Immunhistochemische Charakterisierung der adipogenen Stammzellen bezüglich der Stammzellmarker (CD13, STRO-1, CD105 und OKT-4) sowie der Endothelmarker (VWF, VE-Cadherin, Tie-2 und FLT-1) (n=4).

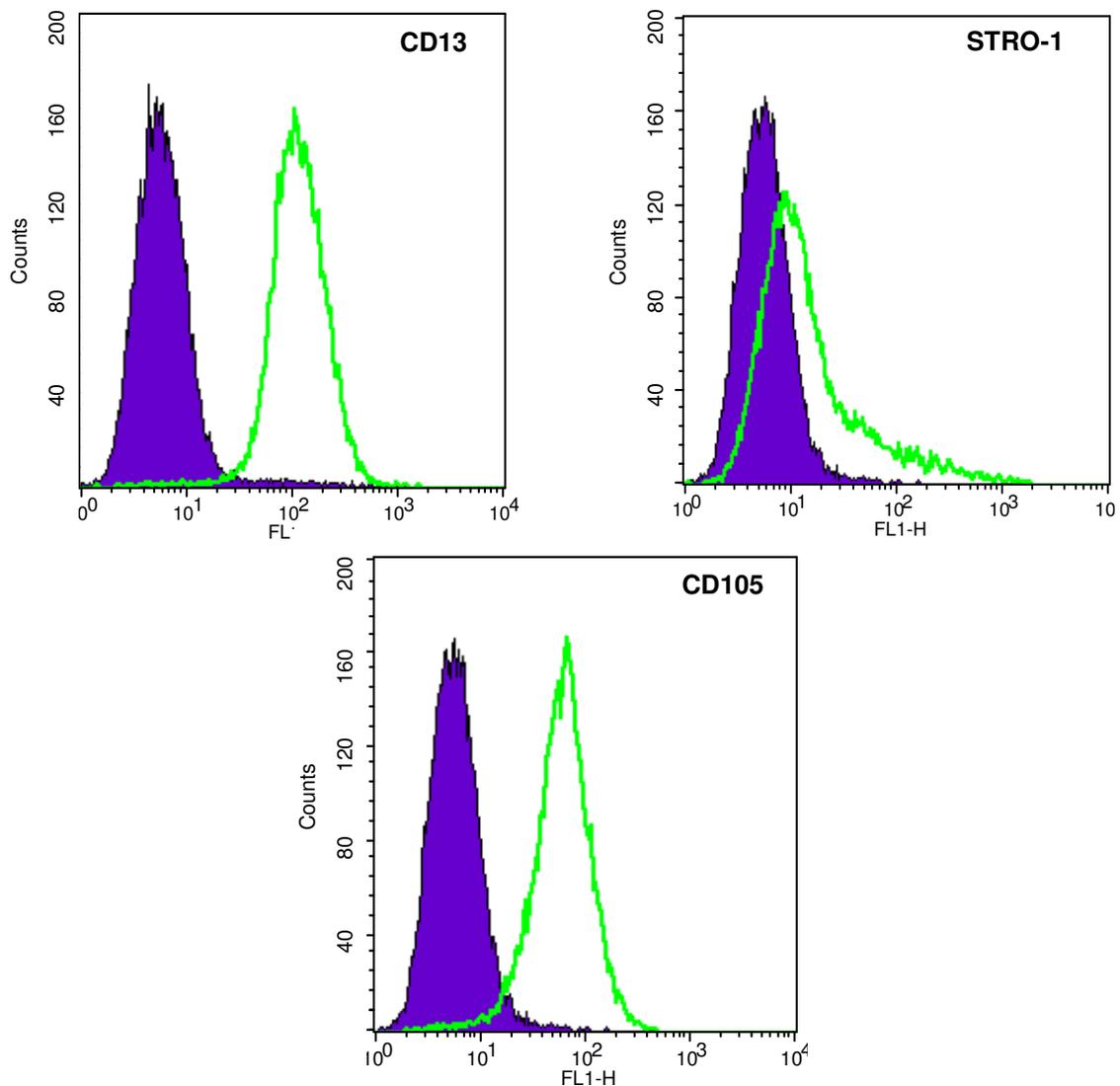
Im Cy-5-Kanal (rot dargestellt) wurde die Immunfluoreszenz gemessen. Die zusätzlichen Darstellungen zeigen die Anfärbung mit dem Lebend-Farbstoff CMFDA (grün) und die Überlagerungsbilder von Immunfluoreszenz und CMFDA-Färbung. Der Maßstab entspricht einer Länge von 40  $\mu\text{m}$ .

## 5. Ergebnisse



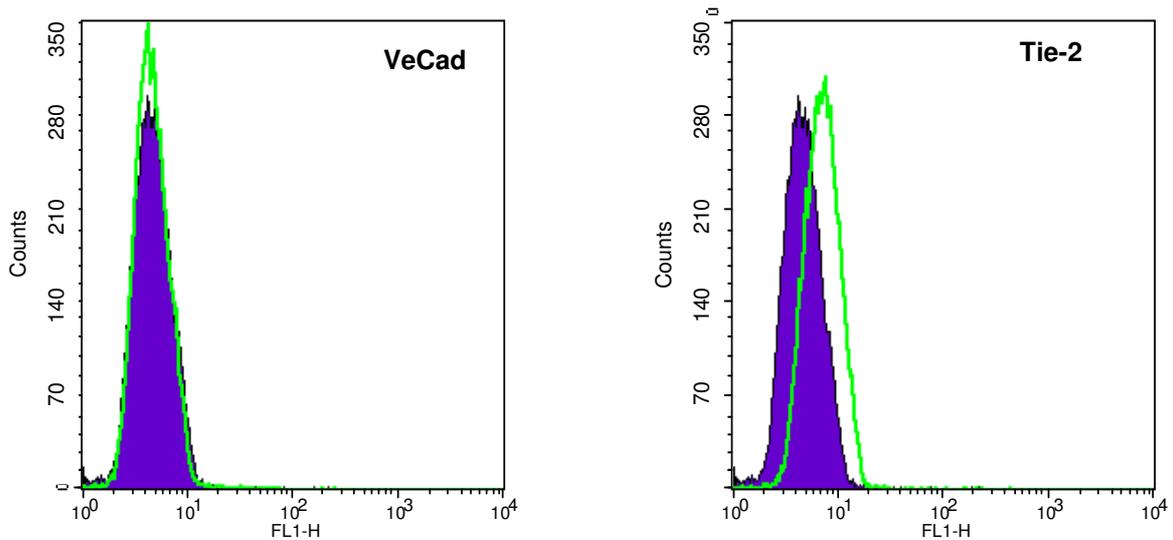
**5.6 Charakterisierung der Stammzellen durch FACS-Analyse**

Zur weiteren Analyse und Bestätigung der Ergebnisse der Immunfluoreszenzmessung wurden sowohl die Stammzellen als auch die differenzierten Zellen zusätzlich mit Hilfe der FACS-Analyse charakterisiert (n=3). Die FACS-Analyse weist für die Stammzellen das Vorkommen der Stammzellmarker CD13, Stro-1 und CD 105 eindeutig nach. Hingegen konnten Endothelmarker auf den Stammzellen nicht nachgewiesen werden. Die jeweiligen Histogramme für die verschiedenen Antigene sind für die Stammzellen in den Abbildungen 5.6.1 und 5.6.2 dargestellt.



**Abb. 5.6.1** Charakterisierung der Stammzellen durch die FACS-Analyse für die verschiedenen Stammzellmarker (n=3). Dargestellt sind jeweils für die Antikörper die IgG-Kontrolle (blaue Fläche) und die gefärbte Stammzellprobe (grüne Linie).

## 5. Ergebnisse



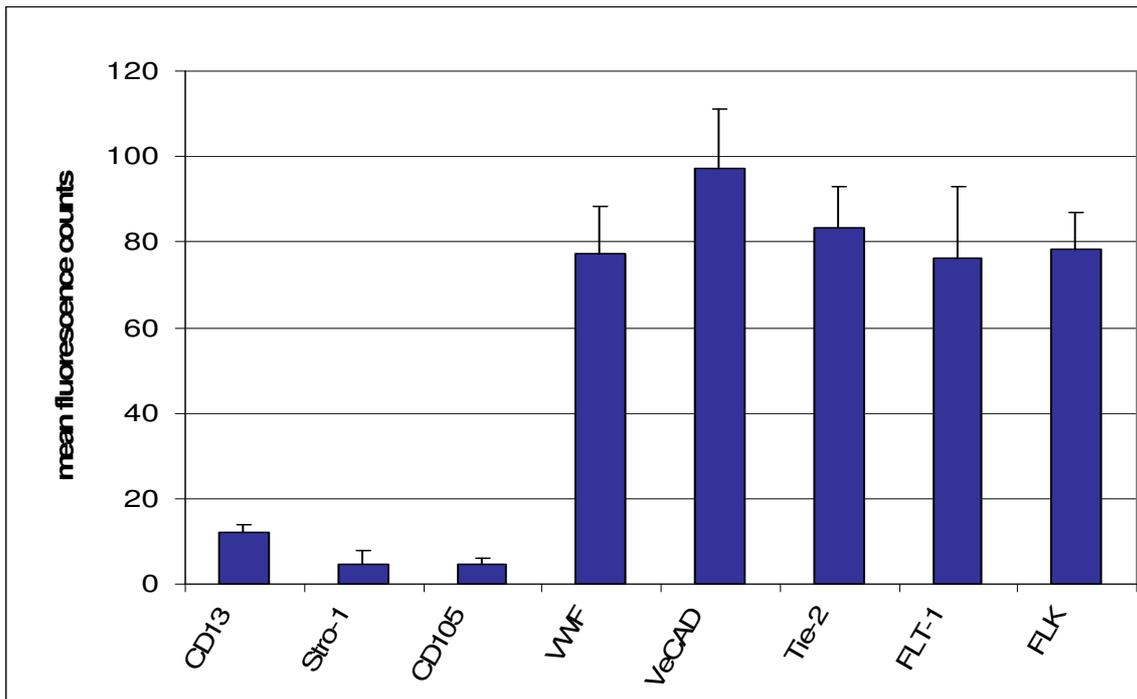
**Abb. 5.6.2** Charakterisierung der Stammzellen durch die FACS-Analyse für die verschiedenen Endothelmarker (n=3). Dargestellt sind jeweils für die einzelnen Antikörper die IgG-Kontrolle (blaue Fläche) und die gefärbte Stammzellprobe (grüne Linie).

Diese Ergebnisse bestätigen die Erkenntnisse aus der Immunfluoreszenzmessung und belegen den Stammzellcharakter der isolierten Zellen.

### **5.7 Charakterisierung der differenzierten Zellen durch Immunfluoreszenz**

Im Weiteren wurden die aus den Stammzellen spontan differenzierten Zellen mit Hilfe der Immunfluoreszenz charakterisiert (n=4). Während bei diesen differenzierten Zellen die Stammzellmarker nicht mehr nachweisbar waren, zeigte sich deutlich die Expression von endothelialen Markerproteinen. Im Einzelnen konnten die endothelialen Marker VWF, Ve-Cadherin, Tie-2, Flk-1 und Flt-1 nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse belegen somit einen endothelialen Charakter der ausdifferenzierten Stammzellen. Eine Zusammenstellung sämtlicher Ergebnisse ist in den Abbildungen 5.7.1 und 5.7.2 dargestellt.

## 5. Ergebnisse

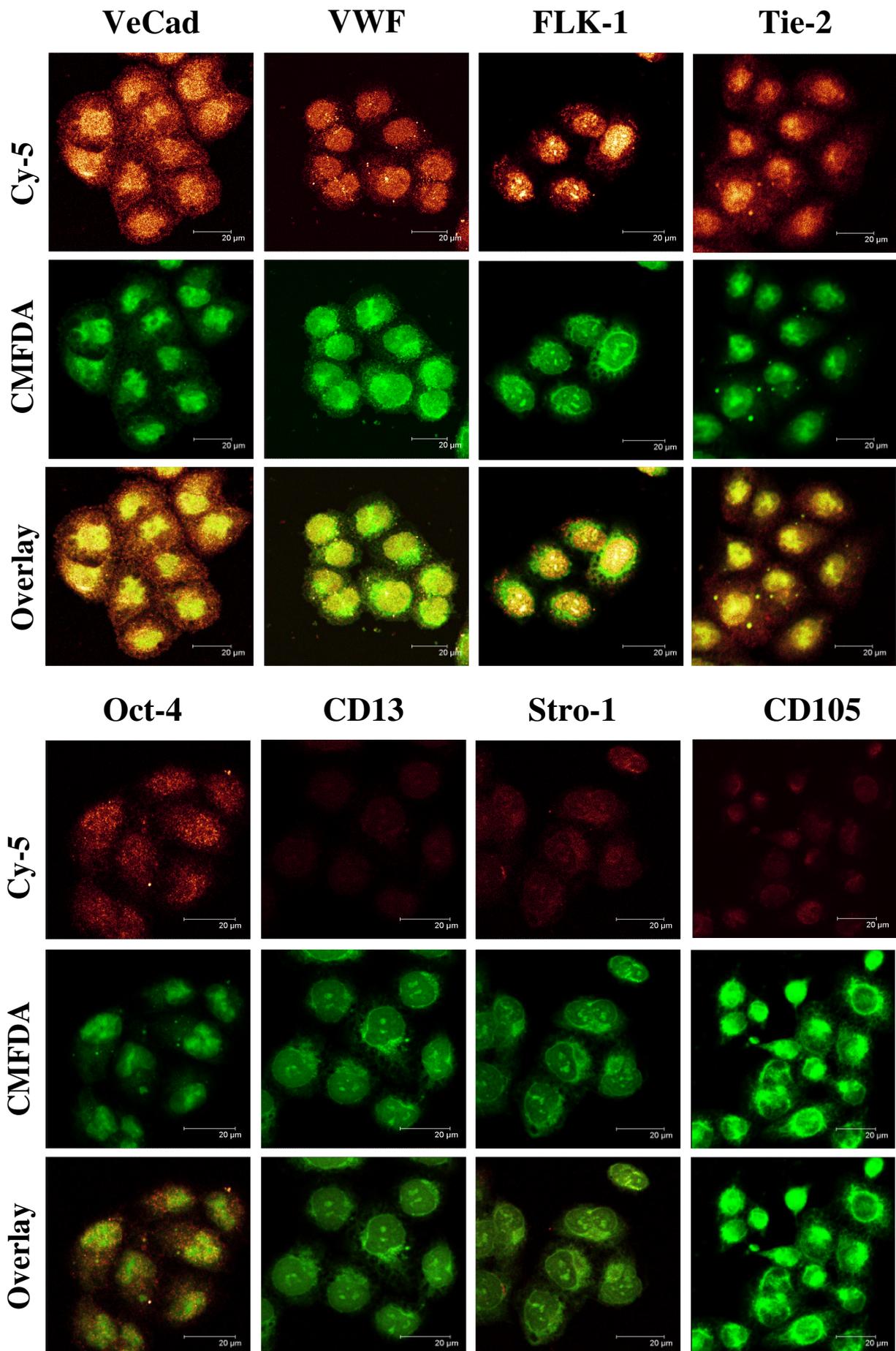


**Abb. 5.7.1** Messung der mittleren Immunfluoreszenz für Stammzellmarker (CD13, Stro-1, CD105) und Endothelmarker (VWF, VeCadherin, TIE-2, FLT-1 und FLK-1) der differenzierten Zellen (n=4).

**Abb. 5.7.2** Immunhistochemische Charakterisierung der differenzierten Zellen bezüglich der Stammzellmarker (CD13, STRO-1, CD105 und OCT-4) sowie der Endothelmarker (VWF, VE-Cadherin, Tie-2 und FLT-1) (n=4).

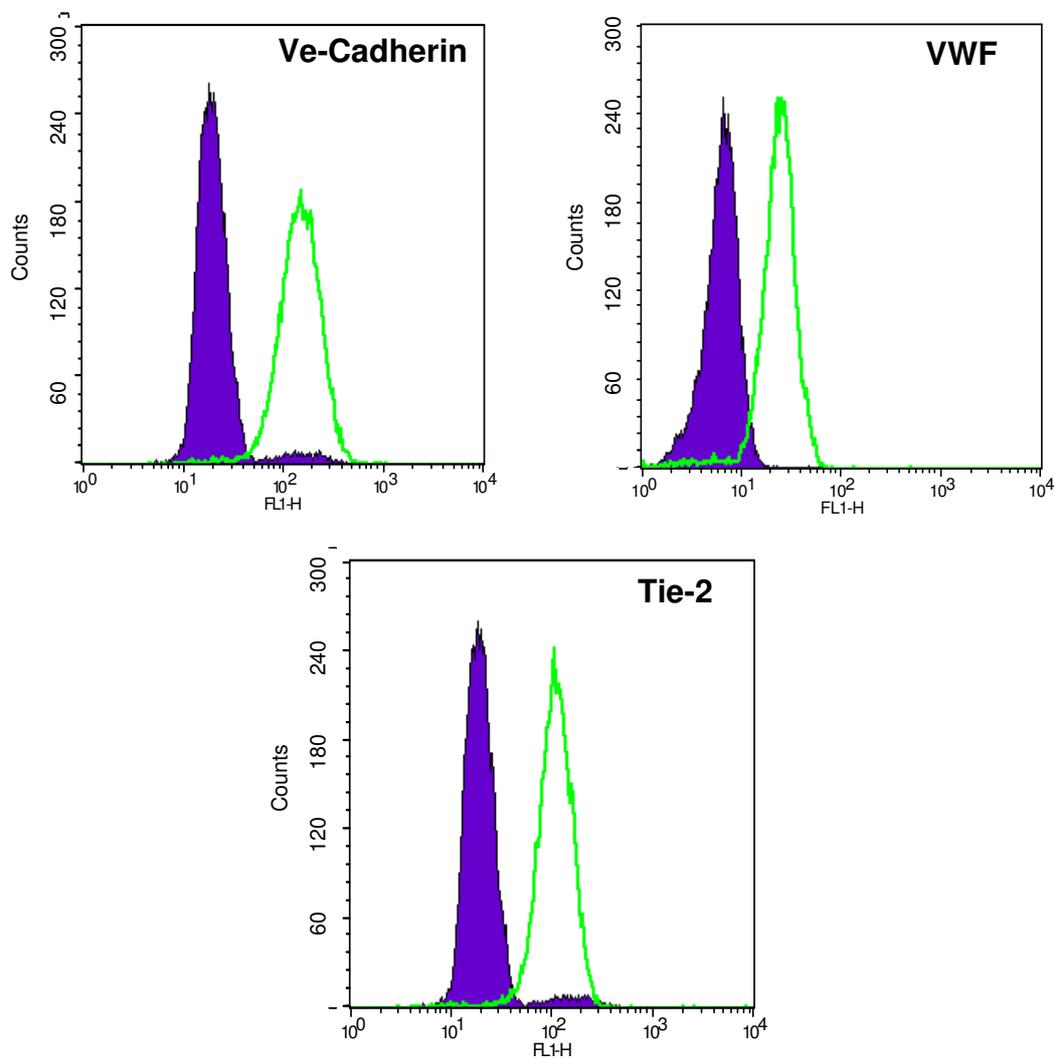
Im Cy-5-Kanal (rot dargestellt) wurde die Immunfluoreszenz gemessen. Die zusätzlichen Darstellungen zeigen die Anfärbung mit dem Lebend-Farbstoff CMFDA (grün) und die Überlagerungsbilder von Immunfluoreszenz und CMFDA-Färbung. Der Maßstab entspricht einer Länge von 20  $\mu\text{m}$ .

## 5. Ergebnisse



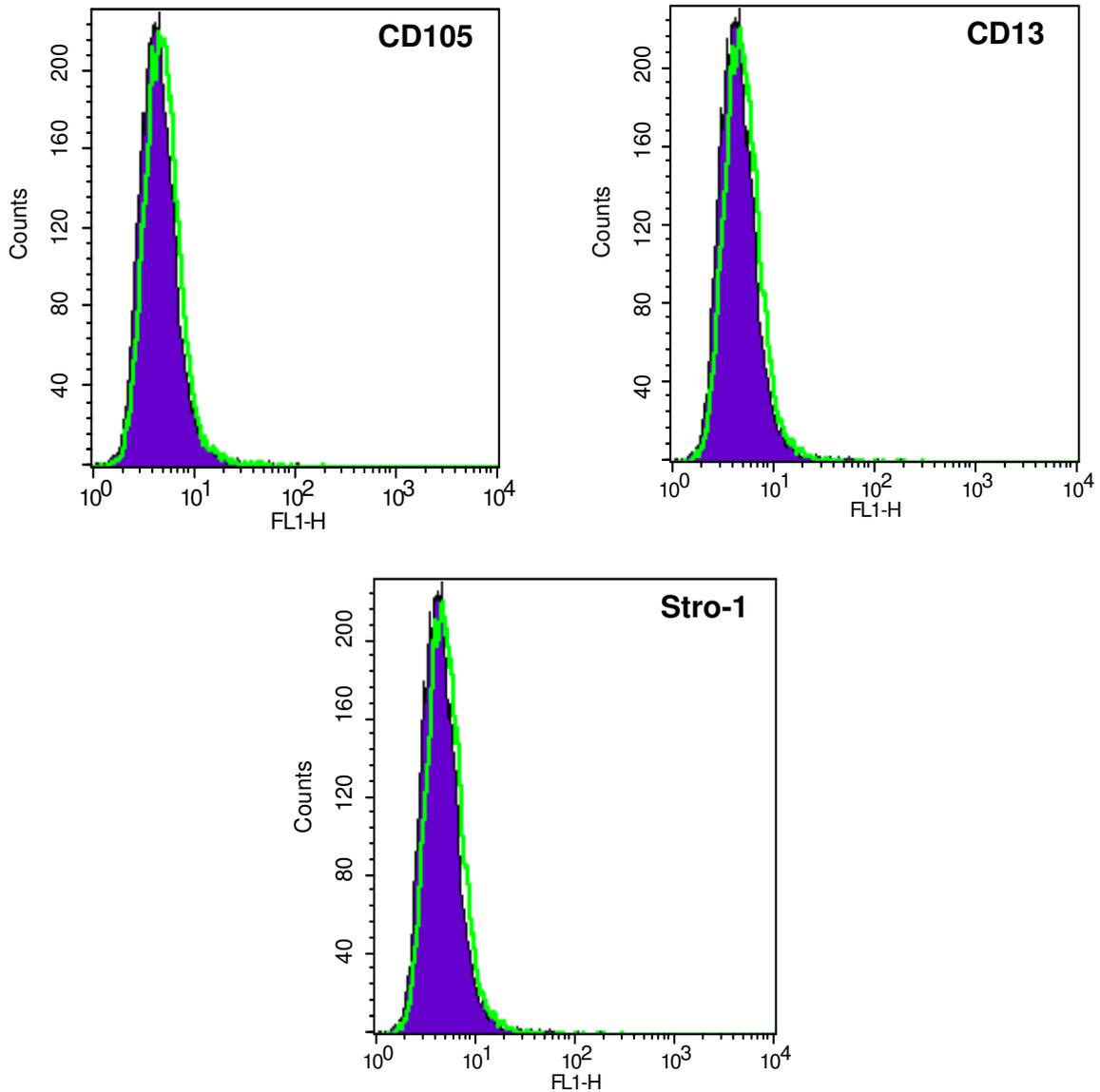
### 5.8 Charakterisierung der differenzierten Zellen durch FACS-Analyse

Analog zu den Stammzellen wurde die Charakterisierung der differenzierten Zellen durch die FACS-Analyse ergänzt (n=3). Die gewonnenen Daten bestätigen die Ergebnisse der zuvor durchgeführten Immunfluoreszenz-Messungen. So konnten mit der FACS-Analyse die Endothelmarker VWF, Ve-Cadherin und TIE-2 nachgewiesen werden. Analog zu der Immunfluoreszenz waren auch mit dieser Methode die Stammzellmarker nicht mehr detektierbar. Die einzelnen Histogramme für die verschiedenen Antikörper sind in den Abbildungen 5.8.1 und 5.8.2 dargestellt.



**Abb. 5.8.1** Charakterisierung der differenzierten Zellen durch die FACS-Analyse für die Endothelmarker (n=3). Dargestellt sind für jeden Antikörper die IgG-Kontrolle (blaue Fläche) und die gefärbte Zellprobe (grüne Linie).

## 5. Ergebnisse

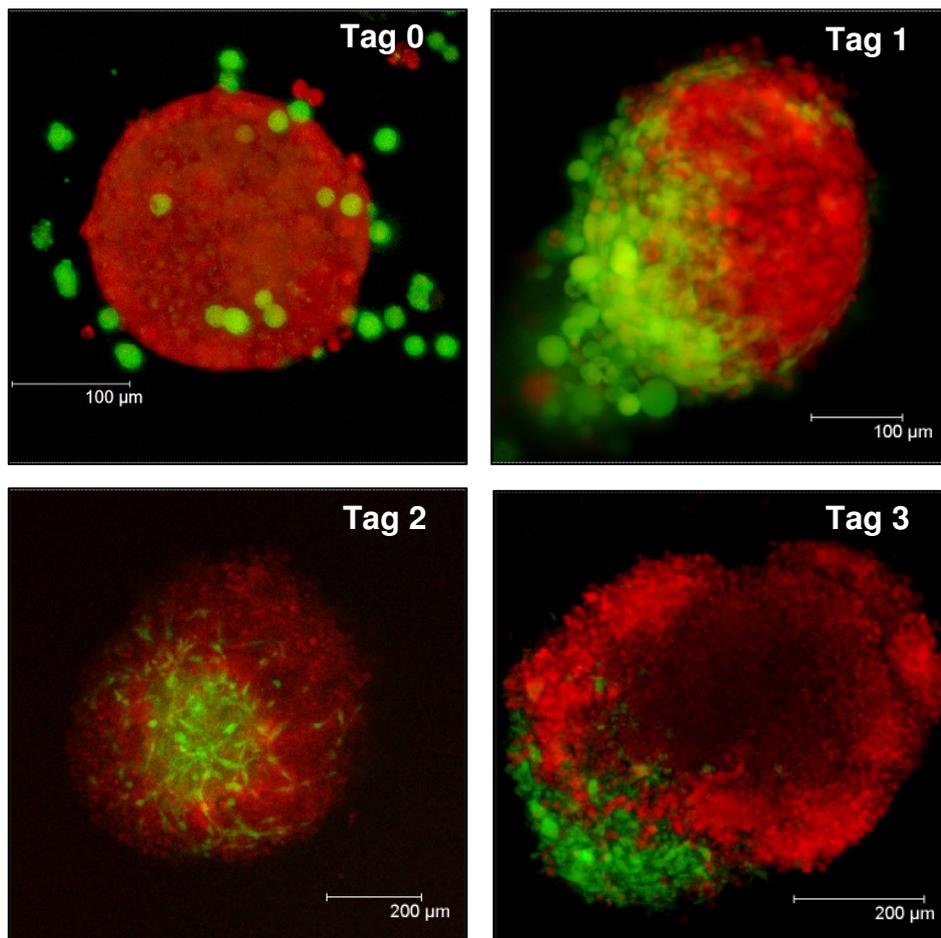


**Abb. 5.8.2** Zusammenstellung der Ergebnisse zur Charakterisierung der differenzierten Zellen durch die FACS-Analyse für die Stammzellmarker (n=3). Dargestellt sind für jeden Antikörper die IgG-Kontrolle (blaue Fläche) und die gefärbte Zellprobe (grüne Linie).

In der Zusammenschau dieser Befunde ergibt sich der eindeutige Nachweis einer spontanen endothelialen Differenzierung der humanen fettabgeleiteten Stammzellen während der Kultivierung. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit sollten nun die Hintergründe dieses Differenzierungsprozesses ausführlicher untersucht werden.

### **5.9 Wachstumsbeobachtungen und Differenzierung der Stammzellen in Konfrontations-Kulturen mit Tumorsphäroiden**

Es ist bekannt, dass Tumorgewebe die Gefäßneubildung aus Stammzellen im Konfrontationskultur-Modell induzieren kann (Wartenberg et al. 2001). Aus diesem Hintergrund heraus wurde das Verhalten der Stammzellen in Konfrontationskulturen mit Prostata-Tumor-Sphäroiden im Hinblick auf durch den Tumor induzierte endotheliale Differenzierungseigenschaften untersucht. Hierzu wurden die Stammzellen mit ca. 30 Tage alten avaskulären Tumor-Sphäroiden inkubiert. Beobachtet wurde das Verhalten in den Konfrontations-Kulturen nach vorheriger Fluoreszenz-Markierung des Tumor-Sphäroids mit dem Lebend-Farbstoff Bodipy (rot) und der Stammzellen mit CMFDA (grün) über einen Zeitraum von insgesamt 10 Tagen (n=3).



**Abb. 5.9.1** Tagesserie der Konfrontations-Kultur von Tumorgewebe (rot, Bodipy) und Stammzellen (grün, CMFDA).

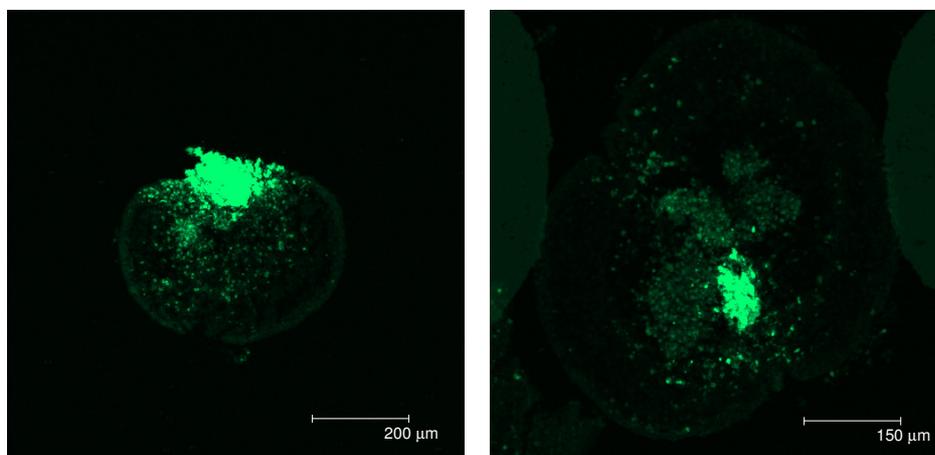
## 5. Ergebnisse

---

Die Abbildung 5.9.1 zeigt eine Zusammenstellung des Verhaltens von Stammzellen auf Tumorgewebe in der Konfrontationskultur bis zum Tag 3. Eine längere Beobachtung und Dokumentation war auf Grund der eingeschränkten Haltbarkeit der Vitalfluoreszenzfarbstoffe in Kultur nur eingeschränkt möglich.

Die dargestellten Ergebnisse zeigen bereits deutliche Hinweise, dass die Stammzellen den Tumor ab dem ersten Tag besiedeln und im weiteren Verlauf den Tumor infiltrieren.

Das infiltrative Wachstum in den Tumor konnte anhand von Paraffin-Schnitten noch einmal bestätigt werden (n=3). Hierzu wurden bei der Vorbereitung zur Konfrontationskultur nur die Stammzellen mit dem Lebend-Farbstoff CMFDA angefärbt. Am Tag 5 wurden die Konfrontationskulturen fixiert und in Paraffin eingebettet. Die Abbildung 5.9.2 zeigt die Schnitte durch die Mitte der in Paraffin eingebetteten Konfrontationskultur unter dem Fluoreszenz-Mikroskop. Deutlich ist das in den Tumor eindringende Wachstum der mit CMFDA (grün) markierten Stammzellen zu sehen.



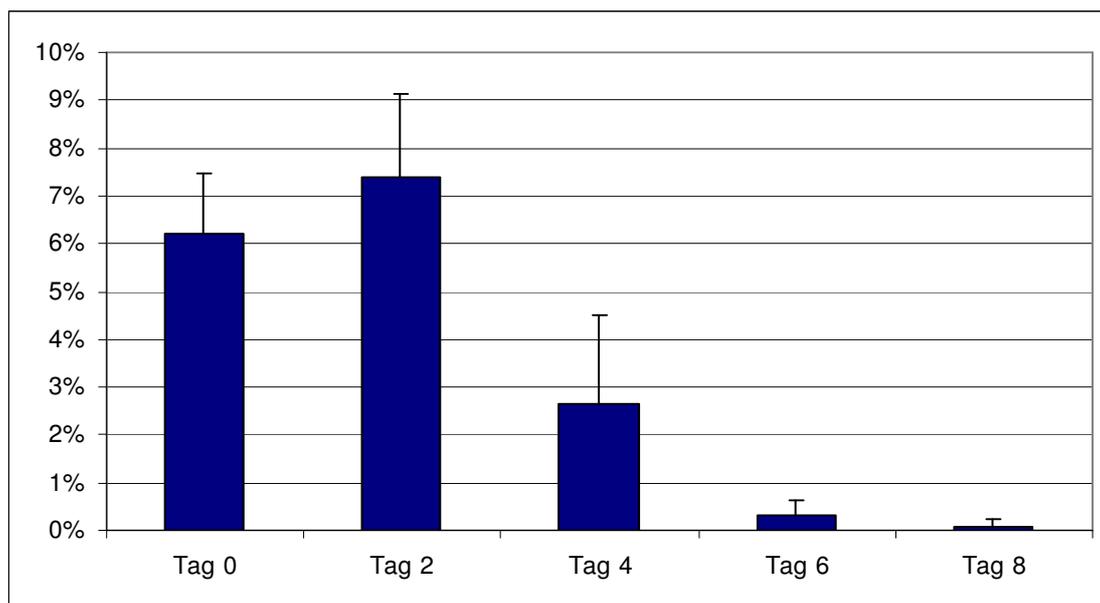
**Abb.5.9.2** Paraffin-Schnitte durch die Mitte der Konfrontationskulturen an Tag 5. Grün angefärbt sind die den Tumor infiltrierenden Stammzellen (n=3).

## 5. Ergebnisse

---

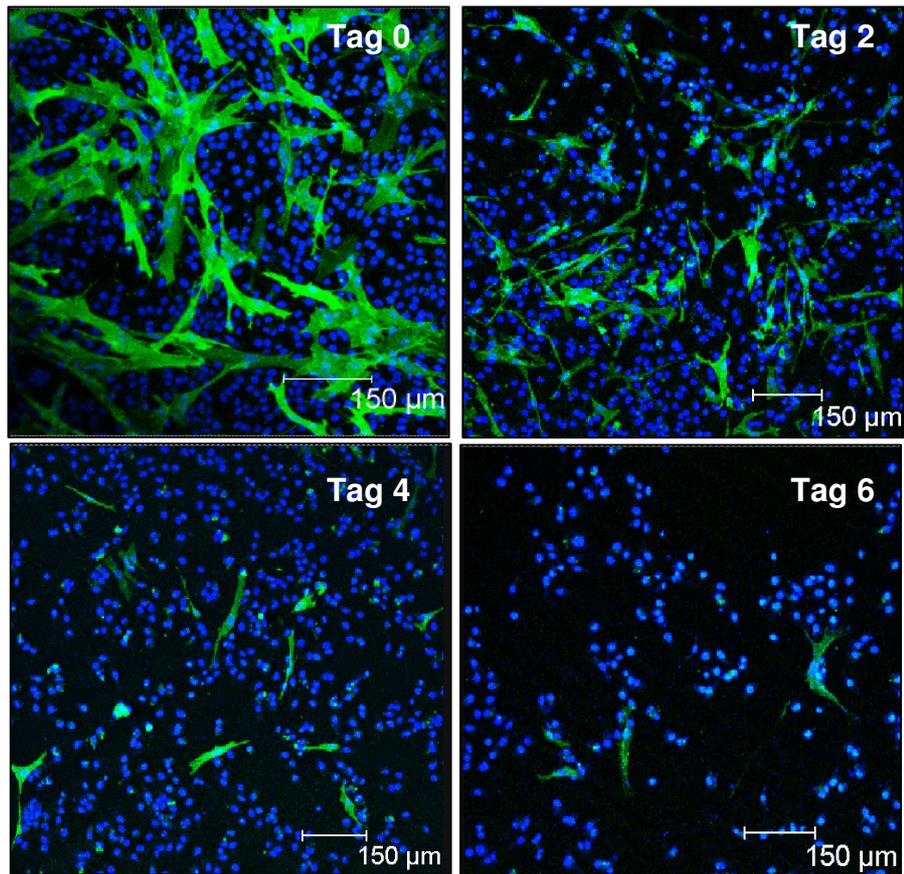
In der weiteren Untersuchung der Konfrontationskulturen zwischen Stammzellen und Tumorgewebe sollte geklärt werden, ob der Tumor den endothelialen Differenzierungsvorgang der Stammzellen induzieren kann.

Hierzu wurde zuerst untersucht, ob die Stammzellen in Konfrontationskultur mit dem Tumor ihre Stammzellmarker verlieren. Die Konfrontationskulturen wurden jeden zweiten Tag von Tag 0 bis Tag 8 mit dem Enzym Liberase verdaut. Anschließend wurden die dissoziierten Zellen über Nacht auf Deckgläschen kultiviert. Am nächsten Tag konnte die Färbung mit dem Antikörper gegen den Stammzellmarker CD13 durchgeführt werden. Ausgewertet wurde schließlich der prozentuale Anteil der CD13 positiven Zellen an allen nachweisbaren Zellkernen, die mit Kernfarbstoff Sytox angefärbt worden waren (n=3). Die Ergebnisse zeigen die deutliche Abnahme des Stammzellmarkers CD13 ab Tag 4. An Tag 8 waren weitestgehend keine CD13 positiven Zellen mehr nachweisbar. Die Abbildungen 5.9.3 und 5.9.4 geben die Ergebnisse dieser Experimente wieder.



**Abb. 5.9.3** Abnahme der CD13 positiven Zellen in Konfrontationskulturen nach Verdauung mit Liberase. Dargestellt ist der prozentuale Anteil von CD13 positiven Zellen an der Gesamtkernzahl (n=3),

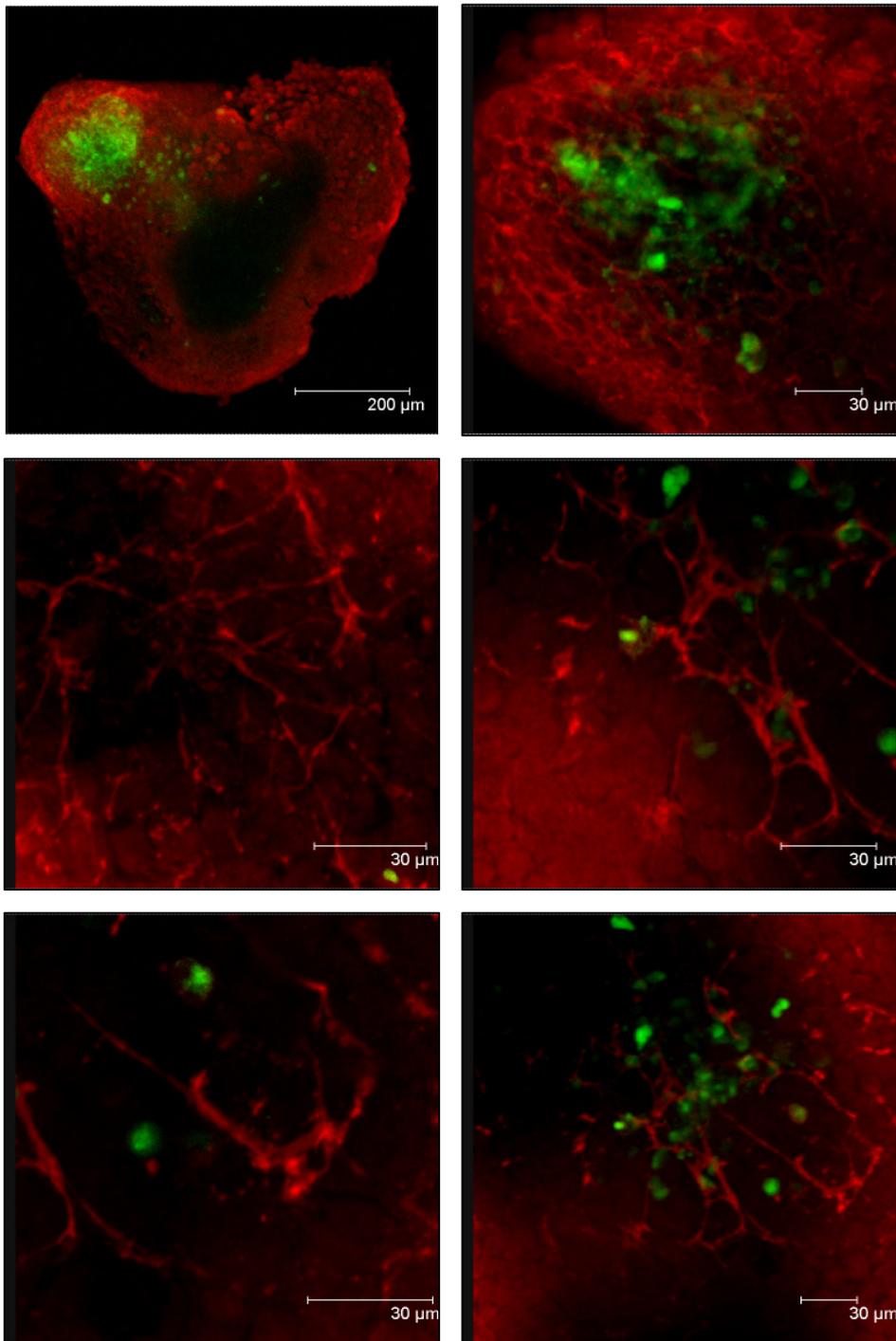
## 5. Ergebnisse



**Abb. 5.9.4** Zusammenstellung der zur Abbildung 5.9.3 gehörenden Fluoreszenzbilder. Grün (CMFDA) angefärbt ist der Stammzellmarker CD13 der Stammzellen. Blau (Sytox) dargestellt ist die Kernfärbung aller Zellen. Der Maßstab entspricht 150 µm.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass in den Konfrontationskulturen der Stammzellmarker CD13 abnimmt, sollte nun untersucht werden, ob die Stammzellen im Tumorgewebe zu Endothelzellen differenzieren. Durchgeführt wurde diese Versuchsreihe, indem die einzelnen Konfrontationskulturen ab Tag 6 gegen VWF angefärbt wurden. Die in die Konfrontationskultur gebrachten Stammzellen wurden vorher mit CMFDA angefärbt, um eine spätere Identifizierung zu gewährleisten. Die gewonnenen Daten sind in Abbildung 5.9.5 zusammengestellt. Ihnen ist zu entnehmen, dass in dem Bereich des Tumors, den die grün markierten Stammzellen infiltrieren, VWF positive, netzwerkartige Strukturen zu finden sind. In Gebieten des Tumors, in denen keine Stammzellen zu finden waren, konnten solche Strukturen nicht nachgewiesen werden.

## 5. Ergebnisse



**Abb. 5.9.5** Die Abbildungen zeigen die kapillar-ähnlichen VWF-positiven Strukturen (rot dargestellt) in der Konfrontationskultur in der Umgebung der Stammzellen (grün markiert) ab Tag 6 (n=3).

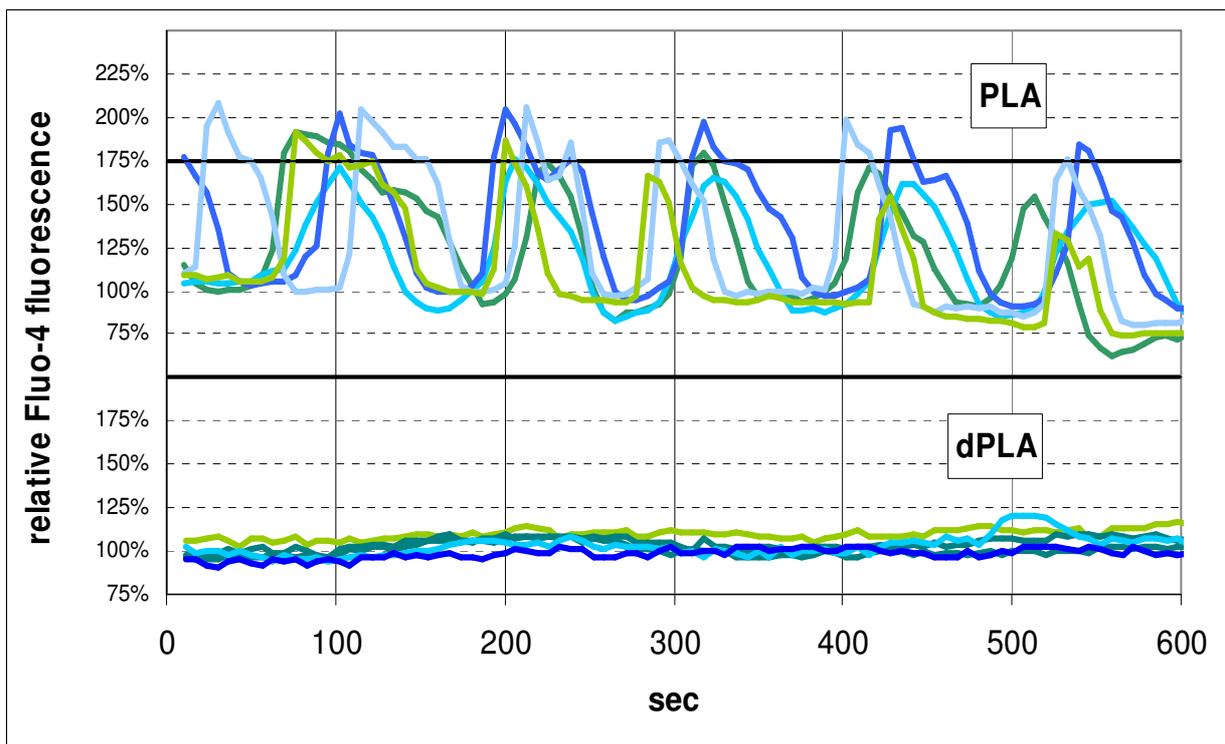
Die Untersuchungen zu den Konfrontationskulturen belegen insgesamt, dass die Stammzellen neben einer spontanen Differenzierung das Potential besitzen, das Tumorgewebe zu infiltrieren und durch das Mikromilieu des Tumors zu einer endothelialen Differenzierung gebracht zu werden. Dieses zeigt sich durch den Verlust der Stammzellmarker in der

## 5. Ergebnisse

Konfrontationskultur und der Neubildung von Endotheleigenschaften mit VWF positiven Netzwerkstrukturen im nativen avaskulären Tumorsphäroid.

### 5.10 Spontane Calcium – Oszillationen

In den folgenden Untersuchungen zu den Hintergründen der Differenzierung wurde die intrazelluläre Calcium-Konzentration der adipogenen Stammzellen und der endothelial differenzierten Zellen gemessen (n=5). Die Messung erfolgte mit Hilfe des konfokalen Mikroskops nach Anfärbung mit dem Calcium-Indikator Fluo-4 AM. Beim Vergleich beider Zellreihen ergaben sich grundlegende Unterschiede. Die Stammzellen zeigten unter Zellkultur-ähnlichen Bedingungen spontane intrazelluläre Calcium-Oszillationen, die bei den endothelial differenzierten Zellen nicht nachgewiesen werden konnten.



**Abb. 5.10.1** Darstellung der spontanen Calcium-Oszillationen der Stammzellen (PLA) im Vergleich zu den endothelial differenzierten Zellen (dPLA). Als Indikator diente das von der intrazellulären Calcium-Konzentration abhängige Fluochrom Fluo-4 AM. Dargestellt sind fünf repräsentativ oszillierende Zellen eines Sichtfeldes über einen Zeitraum von 10 min (n=5).

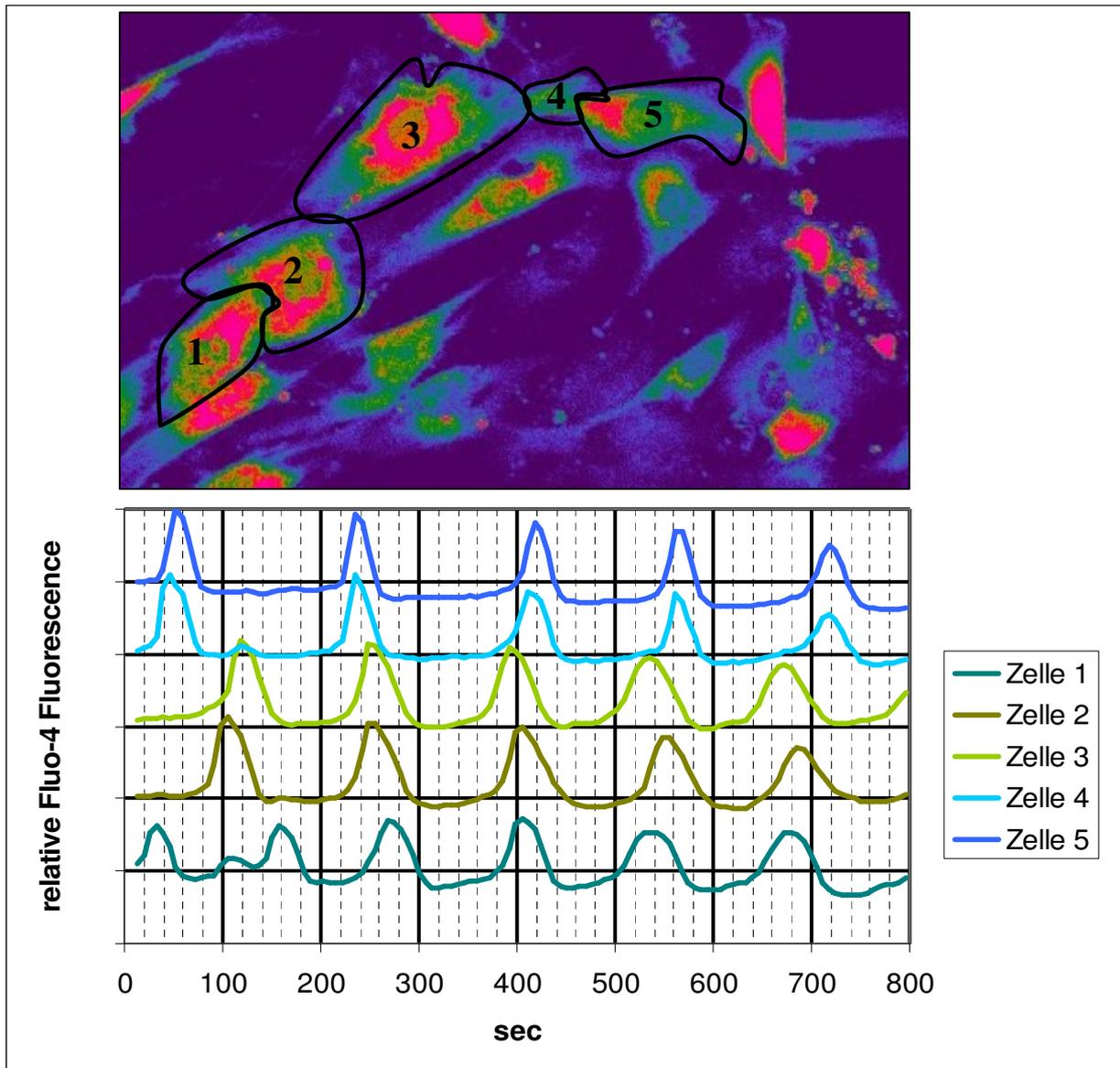
## 5. Ergebnisse

---

In der Abbildung 5.10.1 sind die typisch verlaufenden Oszillationen der Stammzellen und differenzierten Zellen repräsentativ gegenüber gestellt. Zunächst sollte die durchschnittliche Frequenz dieser Oszillationen bestimmt werden. Die Berechnungen bei optimalem Handling mit warmem Medium ergaben Oszillationsfrequenzen von  $11 \cdot 10^{-3} \pm 5 \cdot 10^{-3}$  Hz. Das entspricht einer zeitlichen Differenz von ca. 80-160 Sekunden zwischen den Peaks der Oszillationen. Es zeigten sich zudem Einflüsse durch die Temperatur und Qualität (pH-Wert) des verwendeten Mediums, weshalb diese Parameter in den Versuchen möglichst konstant gehalten werden mussten.

Bei der weiteren Analyse der Ergebnisse dieser Experimente fiel wiederholt auf, dass es neben unkoordiniert oszillierenden Zellen immer wieder Zellareale in der Kultur gibt, bei denen zeitlich synchronisierte Oszillationen vermutet werden können (n=5). Genauere Untersuchungen zur Synchronisation konnten allerdings diese Hypothese nicht bestätigen. Die Oszillationen der benachbarten Zellen besitzen zwar in diesen Gebieten eine annähernd gleiche Frequenz, allerdings verschieben sich längerer zeitlicher Betrachtung die Phasen der Oszillationen gegeneinander, so dass von einer Synchronisation nicht mehr ausgegangen werden kann. Eigene Triggerzellen, die wiederholt Calciumoszillationen in benachbarten Zellen induzieren, konnten ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Ein repräsentatives Beispiel von Calcium-Oszillationen in benachbarten Stammzellen mit geringer Phasenverschiebung ist in der Abbildung 5.10.2 dargestellt.

## 5. Ergebnisse

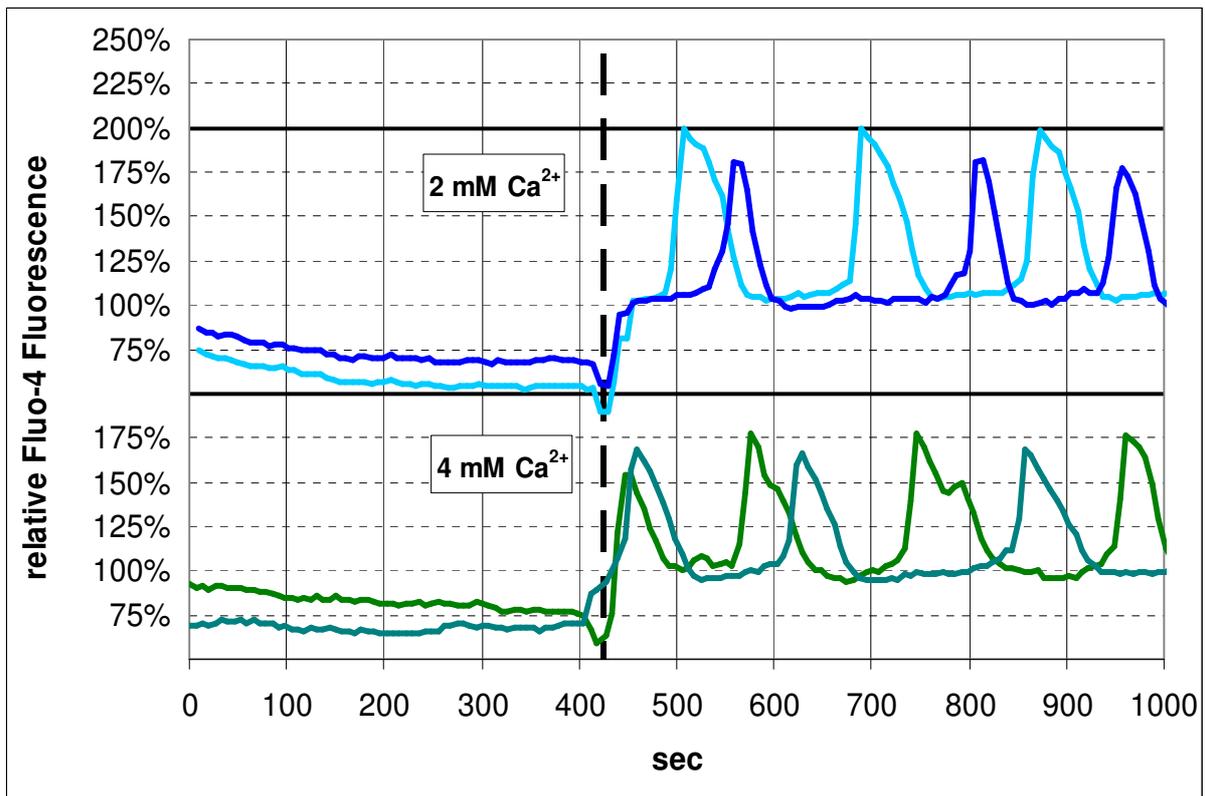


**Abb. 5.10.2** Darstellung einer repräsentativen Messung von desynchronen  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen bei den im Fluoreszenzbild markierten benachbarten Stammzellen. Deutlich ist die Phasenverschiebung der einzelnen Oszillationen im Verlauf zu erkennen ( $n=5$ ).

Zum ausführlicheren Verständnis der Oszillationen wurde der Einfluss von extrazellulärem Calcium auf die Oszillationen untersucht ( $n=5$ ). Hierzu erfolgten die Calcium-Messungen in einer  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Pufferlösung mit einer physiologischen Elektrolyt-Konzentration (Natrium, Kalium, Magnesium) und einem eingestellten pH-Wert von 7,4. Unter diesen Bedingungen konnten bei den Stammzellen keine spontanen Calcium-Oszillationen nachgewiesen werden. Erst nach Substitution von  $\text{Ca}^{2+}$  durch Zugabe einer Calcium-Lösung auf eine physiologische Konzentration von 2mM nahmen die adipogenen Stammzellen die Oszillationen wieder auf. Eine Steigerung der Calciumkonzentration auf 4mM zeigte im Weiteren keine zusätzlichen

## 5. Ergebnisse

Effekte auf die Frequenz oder Amplitude der Oszillationen. Repräsentative Messungen beider Versuchsreihen sind in der Abbildung 5.10.3 dargestellt. Diese Ergebnisse belegen eindeutig die Abhängigkeit von extrazellulärem Calcium für den Erhalt der Calcium-Oszillationen bei den adipogenen Stammzellen. Eine Erhöhung der Frequenz oder Amplitude durch zusätzliche Gabe von Calcium ließen sich hingegen nicht erzielen.



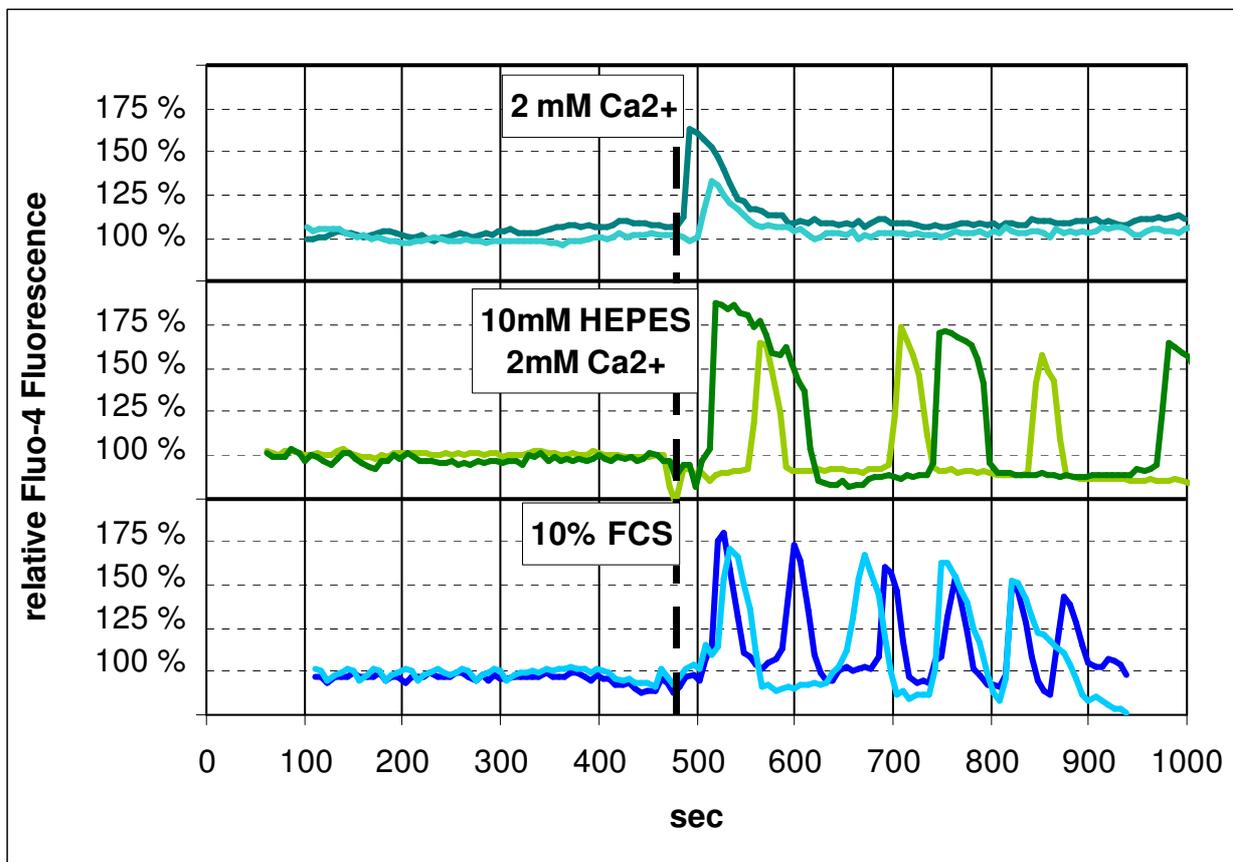
**Abb. 5.10.3** Darstellung der Calcium-Oszillationen bei den Stammzellen in Ca<sup>2+</sup>-freiem Puffer nach Zugabe von a) 2 mM Ca<sup>2+</sup>-Lösung und b) 4 mM Ca<sup>2+</sup>-Lösung (n=5).

In weiteren Untersuchungen zu den Calcium-Oszillationen konnte zudem gezeigt werden, dass neben einer ausreichenden Konzentration von extrazellulären Calcium-Ionen (2mM) auch ein Puffersystem und ein physiologisches Ionenverhältnis von Kalium-, Natrium- und Magnesiumionen für den Erhalt der regulären Oszillationen notwendig ist (n=5). Diese Ergebnisse konnten gewonnen werden, indem die Calcium-Messungen in serumfreiem Medium mit einem definierten pH-Wert von 7,4 durchgeführt wurden. Das verwendete Medium besitzt eine herstellereitig definierte Calcium-Konzentration von 0,3 mM und ist nicht mit einem Puffersystem ausgestattet.

In diesem serumfreien Medium (pH 7,4) konnten keine Oszillationen bei den Stammzellen nachgewiesen werden. Durch Substitution von Calcium während der Messungen auf eine

## 5. Ergebnisse

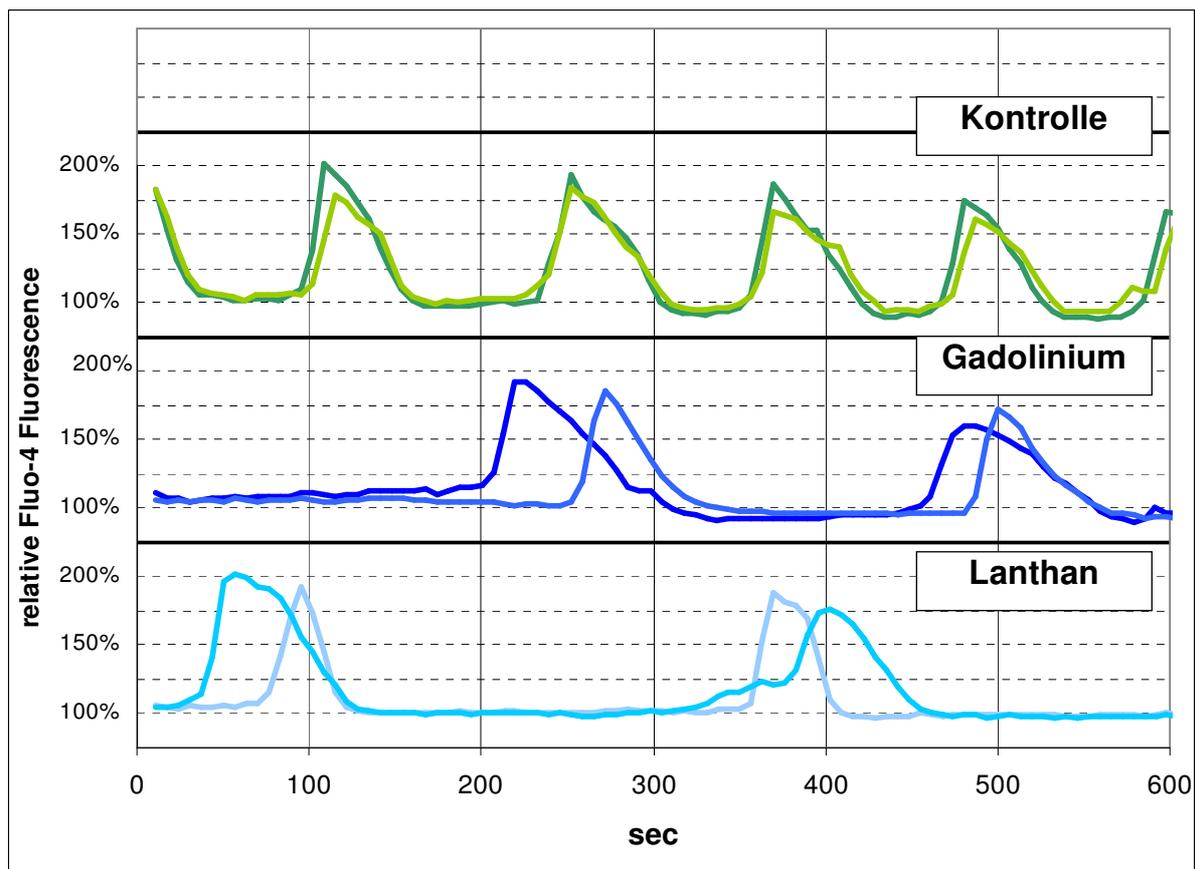
physiologische Konzentration von 2mM ließen sich die Oszillationen nicht erneut induzieren. Die Zellen zeigten nach Substitution von Calcium mit einem initialen Calcium-Peak, nahmen aber im Weiteren keine Oszillationen auf. Dieses Ergebnis zeigt, dass die alleinige Substitution von Calcium im serumfreien Medium für die Oszillationen nicht ausreichend ist. Erst durch zusätzliche Gabe eines HEPES-Puffersystems (10mM) zeigten sich spontane Oszillationen, die allerdings in ihrer Frequenz deutlich reduziert waren im Vergleich zu den Stammzellen nach Substitution der regulären Menge an Serum (10%). Diese gewonnenen Versuchsergebnisse sind in der Abbildung 5.10.4 an repräsentativen Zellen dargestellt.



**Abb. 5.10.4** Darstellung der Calcium-Oszillationen bei den Stammzellen in serumfreiem Medium (pH 7,4) nach Zugabe von a) 2 mM Ca<sup>2+</sup>-Lösung, b) 10 mM HEPES-Puffer und 2 mM Ca<sup>2+</sup> c) 10% FCS (n=5)

### 5.11 Inhibition der Calcium-Oszillationen

Es ist bekannt, dass Calcium-Oszillationen vielfältige Einflüsse auf das Verhalten unterschiedlicher Zellen haben. Es stellt sich nun die entscheidende Frage, welche Bedeutung die Oszillationen in den adipogenen Stammzellen besitzen. In den folgenden Experimenten sollten diesbezüglich die Einflüsse von Calcium-antagonisierenden Substanzen auf die Calcium-Oszillationen bei den adipogenen Stammzellen untersucht werden (n=5). In einer ersten Versuchsreihe wurden die Einflüsse von Lanthanchlorid ( $\text{LaCl}_3$ ) und Gadoliniumchlorid ( $\text{GdCl}_3$ ) analysiert. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 5.11.1 dargestellt. Im Vergleich zur Kontrollgruppe nahm die Oszillationsfrequenz nach Inkubation über 24 h mit 2 mM Lanthanchlorid und 2mM Gadoliniumchlorid deutlich ab. Lanthan und Gadolinium besitzen ähnliche Ionenradien wie Calcium und hemmen somit kompetitiv die Calciumaufnahme von extrazellulär nach intrazellulär.



**Abb. 5.11.1** Einfluss von Lanthanchlorid (2 mM) und Gadoliniumchlorid (2 mM) auf die Frequenz der Calcium-Oszillationen nach Inkubation über 24 Stunden im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dargestellt sind jeweils zwei repräsentativ oszillierende Zellen (n=5).

## 5. Ergebnisse

---

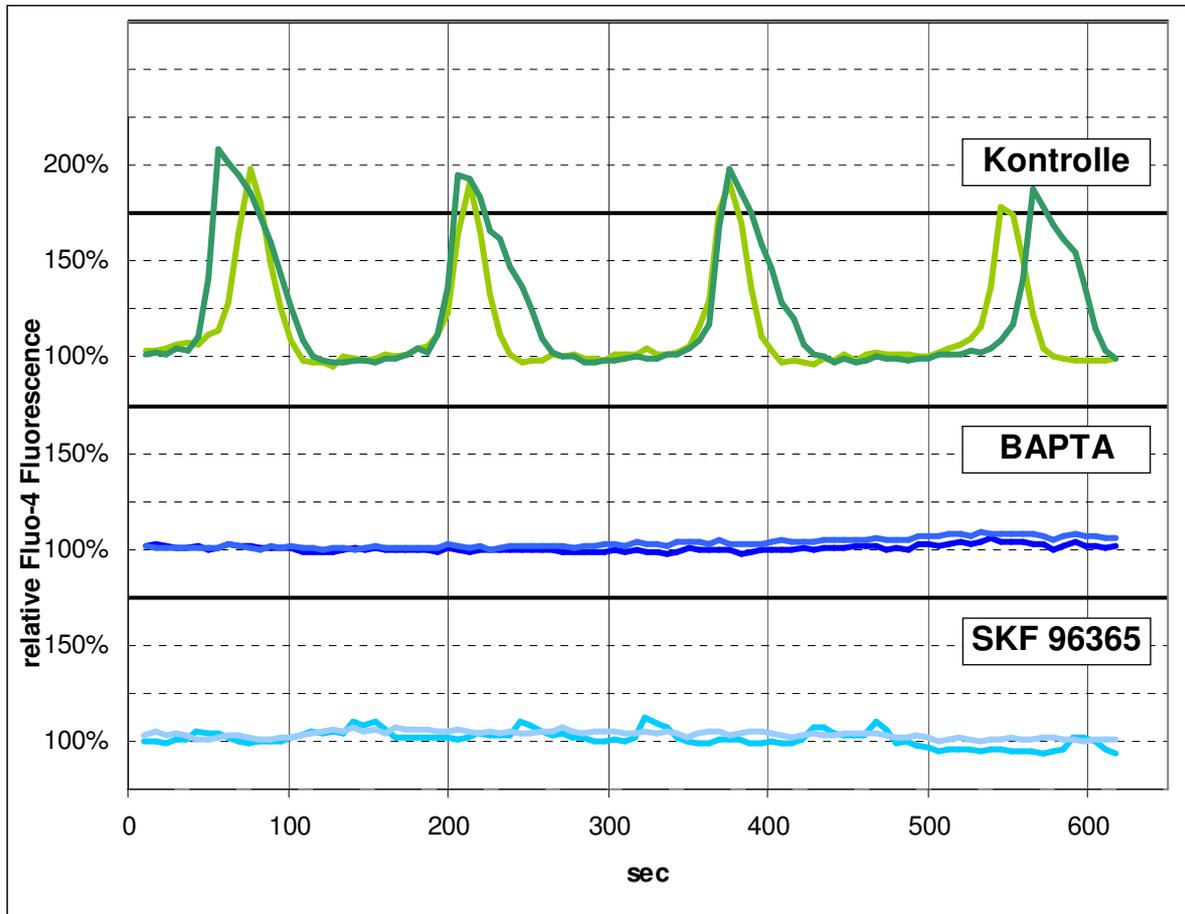
Die aus dem Punkt 5.11.1 gewonnenen Ergebnissen zeigen einen inhibierenden Effekt auf die Oszillationen durch Calcium-antagonisierende Substanzen wie Lanthan- und Gadoliniumionen. Im Zusammenhang mit den Ergebnissen aus Punkt 5.10.3 und 5.10.4 belegen sie die besondere Bedeutung von extrazellulärem Calcium für den Erhalt der Oszillationen.

Bei den durchgeführten Experimenten zeigten sich die Effekte auf die Oszillationen eher durch Modifikationen der Oszillationsfrequenzen und weniger der Oszillationsamplituden. Bei annähernd unveränderter Amplitude konnte eine deutliche Reduktion der Oszillationsfrequenz beobachtet werden. Sollten diese Oszillationen eine Bedeutung in den Signaltransduktionswegen der Zellen haben, ergeben diese Beobachtungen einen Hinweis auf eine Frequenzkodierung der Oszillationen im Gegensatz zu einer Amplitudenkodierung.

In einer zweiten Versuchsreihe wurden unter gleichen Versuchsbedingungen die Einflüsse von BAPTA und SKF 96365 analysiert (n=5). BAPTA kann als Calcium-Chelator nach Inkubation intrazellulär aufgenommen werden und intrazelluläres Calcium binden. SKF 96365 hingegen inhibiert den Rezeptor-gesteuerten Calciumeinstrom über spannungsabhängige Calcium-Kanäle. Beide Substanzen reduzieren somit die intrazelluläre Calcium-Konzentration. Nach Inkubation der Zellen über 24 Stunden mit BAPTA (10  $\mu$ M) und SKF (20  $\mu$ M) lassen sich keine Calcium-Oszillationen mehr nachweisen. Die Ergebnisse sind an repräsentativen Zellen in der Abbildung 5.11.2 dargestellt.

Im Zusammenhang mit den Ergebnissen aus den vorherigen Versuchreihen (5.10.3, 5.10.4, 5.11.1) zeigen diese Daten, dass die Calciumoszillationen neben extrazellulären Einflüssen auch durch Reduktion intrazellulären Calciums inhibiert werden können. Die gewonnenen Erkenntnisse dienen als Grundlage für die weitere experimentelle Untersuchung der an den Oszillationen beteiligten Prozesse, um die Regulation und schließlich die endgültige Bedeutung der Calcium-Oszillationen bei den adipogenen Stammzellen zu verstehen.

## 5. Ergebnisse



**Abb. 5.11.2** Einfluss von BAPTA (10 $\mu$ M) und SKF (20 $\mu$ M) auf die Calcium-Oszillationen nach Inkubation über 24 Stunden im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dargestellt sind jeweils zwei repräsentative Zellen (n=5).

# 6. Diskussion

## 6.1 Die Gewinnung und Charakterisierung der Stammzellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die spontane endotheliale Differenzierung humaner fettabgeleiteter Stammzellen *in vitro* untersucht. Voraussetzung für die Bearbeitung dieser Fragestellung war die Isolierung und Charakterisierung einer geeigneten Zellpopulation. Dabei konnte ein standardisiertes Protokoll erarbeitet und optimiert werden und für weitere Anwendungen dargestellt werden. Standardisierte Verfahren zur Isolation von adulten Stammzellen aus Fettgewebe sind bislang nicht veröffentlicht worden. Weitgehend alle Veröffentlichungen verwendeten Liposuktionsflüssigkeit als Stammzellquelle, die bei kosmetischen Operationen als Abfall angefallen ist (Cao et al. 2005, Gronthos et al. 2001, Zuk 2002). In dieser Arbeit wurde hingegen bei elektiven Operationen ein Stück Fettgewebe als ganzes entnommen und die Isolationsprozeduren erfolgten direkt am Präparat. Der Vorteil dieser Prozedur liegt in der sehr einfachen und weitgehend irritationslosen Entnahme beim Patienten. Es genügen somit ca. 20 Gramm Fettgewebe, um eine ausreichende Konzentration von Stammzellen für die weiteren experimentellen Arbeiten zu gewinnen. Die Schwierigkeit des gesamten Isolationsprozesses besteht vielmehr in der Auftrennung von Stammzellen und Nicht-Stammzellen aus der heterogenen Zellpopulation nach der enzymatischen Verdauung. Durch die Verdauung werden neben den Stammzellen auch mikrovaskuläre Endothel- und glatte Muskelzellen aus dem Fettgewebsverband gelöst (Strem et al. 2005). An Hand des Dichtegradienten lassen sich in einem ersten Schritt durch Zentrifugation Stammzellen und Hämatozyten von den restlichen Zellen, vor allem Adipozyten mit ihrem hohen Lipidanteil, trennen. (Martinez-Estrada et al. 2005). Durch die vielen Waschprozeduren sollte der Anteil von Hämatozyten möglichst gering gehalten werden. Die weitere Selektierung der Zellen erfolgte mit Hilfe der adhärenen Eigenschaften der Stammzellen auf Plastikoberflächen üblicher Zellkulturgefäße (Ashjian et al. 2003). Nach dem ersten Mediumwechsel nach 24 Stunden konnten alle nicht adhärenen Zellen entfernt werden. Zur Kontrolle dieser ersten Schritte wurde die Morphologie der Zellen mit denen aus der Literatur verglichen (Ashjian et al. 2003, Martinez-Estrada et al. 2005, Wagner et al. 2005). Die exakte Charakterisierung erfolgte zuerst mit Hilfe immunzytochemischer Methoden und wurde in einem zweiten Schritt mit durchflusszytometrischen Analysen bestätigt. Dabei dienten die in der Literatur beschriebenen Oberflächenmarker für adipogene Stammzellen als Orientierung (Gronthos et al.

## 6. Diskussion

---

2001, Strem et al. 2005, Zuk et al. 2002). In dieser Arbeit wurden die drei Marker CD105, Stro-1 und CD13 aus der Literatur ausgewählt und deren Expression an den isolierten Stammzellen getestet. Das Stromal-Antigen-1 (STRO-1) wurde bewusst ausgewählt, da seine Expression sehr spezifisch für mesenchymale Stammzellen ist. Bei einigen Arbeiten wird das Antigen als der mesenchymale Stammzellmarker angesehen. (De Ugarte 2003, Dennis et al. 2002, Gronthos et al. 1994, Zuk et al. 2002) In anderen Arbeiten konnte STRO-1 bei den fettabgeleiteten Stammzellen nicht nachgewiesen werden und dessen besondere Bedeutung relativiert werden (Gronthos et al. 2001). Ursachen der verschiedenen Nachweise können in Analogie zu Gimble et al (2003) durch verschiedene angewandte Techniken der Nachweismethoden, der verwendeten monoklonalen Antikörper gegen verschiedene Epitope des Antigens oder unterschiedlicher Primer im Rahmen der PCR begründet sein (Gimble and Guilak 2003). Der embryonale Stammzellmarker Oktamer-4 wurde für die Charakterisierung mitgeführt, da in einer Arbeit von Izahpanah et al (2006) deren Expression auf humanen fettabgeleiteten Stammzellen nachgewiesen werden konnte. In dieser Arbeit konnte dessen Expression auf den adipogenen Stammzellen hingegen nicht nachgewiesen werden. Der Nachweis des Stammzellcharakters der isolierten Zellen konnte mit den beiden verwendeten Methoden der Immunfluoreszenz und der FACS-Analyse sehr spezifisch geführt werden. Es ließen sich weitgehend alle Zellen der Kultur positiv anfärben, welches die Homogenität der Stammzellkultur bestätigt.

In kritischen Arbeiten wird der Nachweis einer Kombination von Stammzellmarker für die Charakterisierung der Stammzellen als nicht ausreichend angesehen. Vielmehr müssten auch die Proliferations- und Differenzierungseigenschaften der Stammzellen als weiteres Merkmal berücksichtigen werden (Hall and Watt 1989). Die Proliferationsfähigkeit der Stammzellen konnte in doppelter Hinsicht nachgewiesen werden. Zum einen lassen sich die Zellen mehrerer Passagen kultivieren, ohne ihre Morphologie und Oberflächenstrukturen zu ändern. Dieses ist nur möglich, wenn die Stammzellen sich mitotisch teilen. Zum anderen wurden detaillierte Wachstumsmessungen durchgeführt, um mathematisch die Verdopplungszeit  $t_d$  und Wachstumskonstante  $\mu$  zu errechnen. Eine Zellverdopplungszeit von  $t_d=32$  Stunden beweist die Proliferationsfähigkeit der Stammzellen.

Sämtliche Wachstumsmessungen wurden bei frisch isolierten Zellen durchgeführt. Ähnliche Zellverdopplungszeiten um ca. 30 Stunden konnten von Izahpanah et al. (2006) in den frühen Passagen ermittelt werden. In seinen weiteren Untersuchungen zeigte sich zudem eine Abnahme der Zellverdopplungszeit auf 120 Stunden in Passage 30 (Izadpanah et al. 2006). Aus diesem Grund wurden die Stammzellen für die experimentellen Untersuchungen

## 6. Diskussion

---

maximal bis Passage 15 kultiviert, um zusätzliche Einflüsse durch das Alter der Zellen zu vermeiden. Allerdings kann davon ausgegangen werden, dass adulte menschliche Stammzellen ein Leben lang im Körper vorhanden sind, so dass Effekte durch das Alter der Stammzellen nur begrenzt sind.

Das Differenzierungspotential der isolierten Stammzellen zeigte sich durch die spontane endotheliale Differenzierung in der regulären Zellkultur. Daraus lässt sich ableiten, dass die Stammzellen neben den üblichen Stammzellmarkern auch Differenzierungs- und Proliferationseigenschaften besitzen und die Bezeichnung als Stammzelle gerechtfertigt ist.

Es gibt bereits sehr genaue Studien über die Stammzellichte im mesenchymalen Knochenmarkgewebe, in dem das Stammzellvorkommen seit etwa 30 Jahren bekannt ist. In der Literatur wird davon ausgegangen, dass etwa 1 Stammzelle auf 25.000 bis 100.000 kernhaltigen Zellen trifft (Banfi et al. 2001, D'Ippolito et al. 1999, Muschler et al. 2001). Die Dichte ist allerdings stark abhängig vom Alter und Geschlecht der Patienten. Zu der Stammzellichte im Fettgewebe gibt es noch keine genauen Studien. In der Arbeit von Strem wird postuliert, dass fast 2% aller kernhaltigen Zellen im Lipoaspirat Stammzellen sind (Strem et al. 2005). Das entspricht laut seinen Beobachtungen ca. 5000 CFU pro Gram Fettgewebe bzw. etwa  $1 \cdot 10^6$  Zellen pro 200 ml Liposuktionsflüssigkeit. In den eigenen Untersuchungen ergaben die Messungen, dass aus einem Gramm Fettgewebe 50.000 bis 100.000 Stammzellen isoliert werden können. Diese Ergebnisse deuten an, dass die Isolation aus reinem Fettgewebe effizienter ist als die Isolation aus Liposuktionsflüssigkeit. Die Gründe könnten in der wesentlich irritationsloseren Isolierung der Stammzellen liegen. Zum anderen muss bei diesen Betrachtungen auch bedacht werden, dass Patienten, die sich einer Liposuktion-Behandlung unterziehen, wesentlich mehr Fettgewebe besitzen als normalgewichtigen Patienten, denen das Fettgewebe für die vorliegende Studie entnommen wurde.

In anderen Publikationen konnten bezüglich der Stammzellkonzentration im Fettgewebe keine Angaben gefunden werden. Allerdings hängt die Stammzellichte entscheidend von den Isolationsprotokollen, dem Anteil an Fettgewebe (Body Mass Index), dem Alter und dem Geschlecht des Patienten ab.

Laut Strem et al. beinhaltet das Fettgewebe im Gegensatz zum Knochenmark fast 40-fach mehr Stammzellen (Strem et al. 2005). Sollten sich diese Ergebnisse der höheren Stammzellkonzentration bei der Isolation aus Fettgewebe auch in der klinischen Routine bestätigen, hätte dies eine große Bedeutung für die zukünftige Stammzelltherapie. Es könnten

somit die adipogenen Stammzellen durch einfachere Isolationsprozeduren und durch höhere Endkonzentrationen bei ähnlicher Plastizität die hämatogenen Stammzellen des Knochenmarks in den bisherigen Stammzelltherapien ablösen.

### **6.2 Die spontane und induzierte Differenzierung**

In der regulären Zellkultur differenzierten die Stammzellen spontan in den späteren Passagen. Die früheste Differenzierung konnte ab Passage 8 beobachtet werden. Dieses ist insofern von Bedeutung, da man eine Differenzierung prinzipiell von einer Kontamination mit anderen Zellen im Rahmen des Isolationsprozesses unterscheiden muss. Die Stammzellen konnten allerdings mehrere Passagen kultiviert werden, bevor sie ihre Morphologie spontan änderten und sehr schnell komplett ausdifferenzierten. Dieses belegt die stattgefundene Differenzierung und schließt eine mögliche Kontamination aus, da sich sonst die spezialisierten Zellen ebenfalls vermehren und vorher nachweisbar sein müssten. Im Rahmen des Differenzierungsprozesses zeigten sich die morphologischen Änderungen von dem Fibroblasten-ähnlichen Aussehen der Stammzellen zu dem für Endothelzellen typischen Kopfsteinpflaster-ähnlichen Aussehen. Diese entsprachen aber nicht denen in der Literatur häufig beschriebenen Differenzierungen zu Adipozyten, Chondrozyten oder Osteoblasten, die gerichtet nur mit spezifischen Inkubationsmedien erzielt werden konnten (Zuk 2002).

Die Stammzellen differenzierten schließlich innerhalb einer Passage weitgehend aus und konnten für die folgenden experimentellen Untersuchungen kultiviert werden. Da die differenzierten Stammzellen eine wesentlich höhere Proliferationsrate besitzen als die adipogenen Stammzellen, wurden noch nicht differenzierte Stammzellen in der Zellkultur verdrängt, so dass in der nächsten Passage nur noch weitgehend differenzierte Zellen nachweisbar waren.

In den ersten grundlegenden Untersuchungen zu Charakterisierung der differenzierten Zellen wurde ein Matrigel-Assay durchgeführt. Die Besonderheit am Matrigel ist in Bildung einer Matrix, in der Zellen dreidimensional in einem Kollagengerüst wachsen können. Endothelzellen bilden in dieser Matrix sehr typische Netzwerk-Strukturen, die als wegweisendes Charakteristikum herangezogen werden können. Durch die sehr ähnlichen Strukturen von endothelial ausdifferenzierten HUVECs und den differenzierten Stammzellen kann zunächst von einer endothelialen Differenzierung ausgegangen werden (Gifford et al. 2004).

## 6. Diskussion

---

Spezifischere Nachweismethoden sind dennoch erforderlich. Sowohl durch immunzytochemische Methoden als auch mit durchflusszytometrischen Analysen konnten endotheliale Marker auf den differenzierten Stammzellen nachgewiesen werden. Die Zellen waren positiv für von-Willebrandt-Faktor, Ve-Cadherin, Tie-2 und FLK-1. Das FLK-1 Antigen als Rezeptor für VEGF ist einer der frühesten nachweisbaren Differenzierungsmarker für Endothel- und Blutzellen. Er spielt somit eine besondere Bedeutung in pränatalen und postnatalen endothelialen Vorläuferzellen (Cao et al. 2005). Das ebenfalls für Endothelzellen typische CD31 Antigen konnte mit den angewandten Methoden nicht nachgewiesen werden. Hingegen führte die Differenzierung zu einem Verlust sämtlicher getesteter Stammzellmarker. Dieses spricht für eine spontane endotheliale Differenzierung der fettabgeleiteten Stammzellen.

In der Literatur ist eine spontane Differenzierung humaner fettabgeleiteter Stammzellen zu Endothelzellen bislang nicht beschrieben. Die vorhandenen Arbeiten verwendeten endotheliale Wachstumsfaktoren wie VEGF zur Stimulation der Differenzierung (Cao et al. 2005, Planat-Bénard 2004) oder untersuchten die Differenzierung im Maus-Modell (Planat-Bénard 2004). Diese Beobachtung ist insofern von Bedeutung, weil sie zeigt, dass für eine endotheliale Differenzierung keine exogenen Stimulanzen verwendet werden müssen. Die Induktion durch Zugabe von VEGF oder die Implantation von Stammzellen im ischämischen oder bradytrophem Gewebe führt zwar zu einer gerichteten Differenzierung, doch belegen die eigenen Untersuchungen, dass dieses auch ohne Zugabe möglich ist. Eine solche Differenzierung könnte die spontanen physiologischen Vorgänge im gesunden Fettgewebe am ehesten widerspiegeln.

In Anlehnung an eine Publikation von Wartenberg et al. wurden neben den spontanen Differenzierungen der Stammzellen, die Einflüsse eines Tumors auf die Differenzierungseigenschaften im Konfrontationsmodell untersucht (Wartenberg et al. 2001). Die Fragestellung lautete dementsprechend, ob das sphärische Tumorgewebe infiltrierende Stammzellen zur Differenzierung anregt. Die dargestellten Ergebnisse demonstrieren, dass die Stammzellen das Tumorgewebe infiltrieren und sich in diesem endothelial differenzieren. Dieses zeigt sich durch den Verlust des CD13-Antigens und der Neubildung Kapillar-ähnlicher VWF-positiver Strukturen im ursprünglich avaskulären Tumorgewebe.

Es ist allgemein anerkannt, dass die durch den Tumor induzierte Angiogenese durch die Produktion von proangiogenetischen Faktoren wie die der VEGF-Familie und FGF reguliert wird. Diese Substanzen werden durch die hypoxische Bedingungen im avaskulären Tumor

## 6. Diskussion

---

freigesetzt (Richard et al. 1999). Wartenberg et al. konnten zeigen, dass genau diese Bedingungen die Differenzierung von embryonalen Stammzellen induziert. Es ist davon auszugehen, dass die Differenzierung mesenchymaler adulter Stammzellen im Tumor durch dieselben Einflüsse bedingt ist. Um dieses allerdings zu beweisen, müssten genauere Untersuchungen mit den adipogenen Stammzellen durchgeführt werden.

### **6.3 Calcium Oszillationen und deren Einflüsse**

Wie im Einleitungsteil schon detailliert beschrieben, haben Calcium-Oszillationen in nicht erregbaren Zellen großes wissenschaftliches Interesse erlangt. Die spannende Frage besteht darin, warum nicht erregbare Zellen ebenfalls energieaufwendige Calcium-Oszillationen aufrechterhalten und was diese in den Zellprozessen bewirken. Über diese physiologische Bedeutung kann viel spekuliert werden, jedoch wird laut Schuster et al. angenommen, dass die Oszillationen eine Bedeutung in der intrazellulären und interzellulären Signaltransduktion haben (Schuster et al. 2002). Besonders vorteilhaft erweisen sich Oszillationen im Vergleich zu statischen Signaltransduktionsprozessen dadurch, dass eine Sensibilisierung von Rezeptoren vermieden wird (Jacob 1990) und ein breiteres Spektrum an codierten Informationen vermittelt werden kann (Schuster et al. 2002). Zudem kann es kurzzeitig zu hohen zellulären Konzentrationen von Substanzen im Zytoplasma kommen, ohne dass die Substanz akkumuliert. Des Weiteren können die Oszillationen nur sehr schwer durch exogene Störungen beeinflusst werden (Gall et al. 2000, Rapp et al. 1981).

Bislang wurden spontane Calcium-Oszillationen in fettabgeleiteten mesenchymalen Stammzellen nicht beschrieben und untersucht. Folglich sollten sich die weiteren Experimente mit der Beschreibung und der genaueren Untersuchung dieser Calcium-Oszillationen beschäftigen, um die Prozesse, die hinter den Calcium-Oszillationen stehen, besser zu verstehen. Durch die Verwendung einer minimal definierten physiologischen Pufferlösung (Kalium, Natrium, Magnesium, Calcium, Glukose und HEPES-Puffer) konnten alle nötigen extrazellulären Substanzen für den Erhalt der Oszillationen bestimmt werden. Besondere Bedeutung besitzen die extrazellulären Calcium-Ionen. Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass die Oszillationen abhängig von diesen extrazellulären Calcium-Ionen sind. Durch zusätzliche Gabe von Calcium können die Oszillationen aber nicht weiter beeinflusst werden. So führt experimentell zugeführtes Calcium zu keiner Frequenzsteigerung, während die Zugabe von Lanthan oder Gadolinium, welche durch ähnliche Ionenradien Calcium-kompetitiv wirken, zu einer Frequenzabnahme der Oszillationen führt. In einer Arbeit von

## 6. Diskussion

---

Johnston et al. konnte zwar gezeigt werden, dass die Zugabe von Calcium zu einer Frequenzsteigerung der Oszillationen führte (Johnston et al. 2005), allerdings arbeiteten Johnston et al. bei ihren Versuchen mit interstitiellen Zellen der Kanichen-Urethra. Diese Zellen zeigten zudem im Vergleich zu den Stammzellen wesentlich schnellere Oszillationsfrequenzen von bis zu 5 Oszillationen pro Minute. Hingegen konnten Kapur et al. zeigen, dass bei embryonalen Stammzellen der Maus für den Erhalt der Oszillationen kein extrazelluläres Calcium notwendig ist. Extrazelluläres Calcium war jeglich für die Auffüllung der intrazellulären Calciumspeicher notwendig, aus denen die Oszillationen aufrechterhalten wurden (Kapur et al. 2007). Die unterschiedlichen Meinungen legen sehr nahe, dass Calcium-Oszillationen in verschiedenen Zellen unterschiedlich gesteuert und reguliert werden. Diese Annahme kann durch weitere experimentelle Arbeiten gestützt werden. So konnten Zimmermann et al. zeigen, dass in Speicheldrüsenzellen kein extrazelluläres Calcium notwendig war, um die Oszillationen aufrecht zuhalten (Zimmermann et al. 1997). Bei Hepatozyten gehen die Meinungen hingegen auseinander. Wood et al (Woods et al. 1990) zeigten eine Abhängigkeit vom Calcium während Rooney et al. und Dixon et al. dieses widerlegen konnten (Dixon et al. 1990, Rooney et al. 1989). Die Steuerung der Oszillationsfrequenz bei den adipogenen Stammzellen scheint durch intrazelluläre Mechanismen zu erfolgen, die allerdings von einem ausreichendem extrazellulären Calcium-Gehalt abhängig ist.

Die Calcium-Oszillationen bei den adipogenen Stammzellen können nicht nur durch die extrazelluläre Konzentration von Calcium beeinflusst werden, sondern ebenfalls durch Variationen im extrazellulärem pH-Wert. Trotz exakt eingestelltem pH-Wert (pH 7,4) im puffer- und serumfreien Medium bei physiologischen Ionenkonzentrationen, zeigten die Stammzellen keine Oszillationen. Erst nach Substitution eines Puffer (10mM HEPES-Puffer) nahmen die Zellen erneut spontane Oszillationen auf. In der Literatur ist eine Arbeit vorhanden, die Effekte auf die Calcium-Oszillationen bei Hormonstimulationen in Abhängigkeit des intrazellulären pH-Wertes bei HeLa-Zellen messen konnte (Sauve et al. 1990). Diese Erkenntnisse sind allerdings nur sehr bedingt auf die Oszillationen der adipogenen Stammzellen zu übertragen. Die Erklärung für diese Beobachtungen könnte hingegen durch zwei mögliche Annahmen erfolgen. Als Ursache für eine Verschiebung des pH-Wertes kommt zum einem die Sekretion von sauren Äquivalenten der lebenden Zellen in Frage und zum anderen könnten in den Prozessen der Oszillationen  $H^+$ -Transporter beteiligt sein, die den pH-Wert verschieben. Voraussetzung für beide Modelle ist allerdings ein pH-Wert abhängiger Prozess in der Aufrechterhaltung der Calcium-Oszillationen. In der Literatur

## 6. Diskussion

---

ist zu dieser Thematik weitgehend nichts bekannt. Zur Klärung dieser Thematik müssten diesbezüglich weitere experimentelle Untersuchungen unternommen werden.

Durch Substitution eines Puffers oder von Serum mit Puffereigenschaften in das ansonsten serumfreie Medium konnten die spontanen Calcium-Oszillationen hingegen sofort erneut induziert werden. Dieses bestätigt die Notwendigkeit der pH-Wert-Pufferung.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Oszillationen von einem extrazellulären Milieu abhängig sind, sollten in den weiteren Untersuchungen die intrazellulären und transmembranösen Vorgänge detaillierter untersucht werden. Hier stellte sich die Abhängigkeit eines intakten Calcium-Flusses über die Zellmembran über spannungsabhängige Calcium-Kanäle als notwendig heraus. Nach Inkubation der Zellen mit SKF 96365, welches den Calcium-Fluss über die Zellmembran hemmt, kommt es zu einem vollständigen Sistieren der Oszillationen. Die gleichen Ergebnisse konnte durch die intrazelluläre Calcium-Chelat-Bildung durch BAPTA erzielt werden.

Auch wenn die weiteren beteiligten Prozesse bei den Oszillationen wie die IP<sub>3</sub>- und DAG-Aktivität, die Phospholipase C, die Freisetzung von Calcium aus dem Endoplasmatischen Retikulum und der Ryanodin-Rezeptor in dieser Arbeit nicht berücksichtigt wurden, kann man aus den Versuchen ableiten, dass sowohl intrazelluläre als auch extrazelluläre Prozesse an der Aufrechterhaltung der Oszillationen beteiligt sind. Die ausführlichen intrazellulär beteiligten Prozesse der Calcium-Oszillationen in den adulten mesenchymalen Stammzellen werden in einer weiteren Doktorarbeit in derselben Arbeitsgruppe sehr detailliert experimentell untersucht (Mitteilung Myriam Hatry).

Sämtliche experimentelle Einflüsse auf die Oszillationen in den eigenen Untersuchungen manifestierten sich durch Änderungen der Frequenzen. Die Amplituden der Oszillationen blieben unter den verschiedenen experimentellen Bedingungen weitgehend konstant. Dieses Phänomen legt die Vermutung nahe, dass die Codierung über die Frequenz und nicht über die Amplitude gesteuert wird. Diese Beobachtungen wurden bereits von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben (Goldbeter et al. 1996, Meyer et al. 1988, Dupont et al. 1998) und konnten somit auch in der Übertragung auf mesenchymale Stammzellen bestätigt werden. Die besondere Bedeutung der Frequenzkodierung im Gegensatz zur Amplitudenkodierung wurde zum ersten Mal bei der Untersuchung der intrazellulären Antwort auf eine Hormonstimulation beschrieben. (Schuster et al. 2002)

## 6. Diskussion

---

Bei den Experimenten zu den spontanen Calcium-Oszillationen in den adulten Stammzellen, konnten Zellareale beobachtet werden, bei denen synchronisierte Calcium-Oszillationen vermutet werden können. Genauere Beobachtungen der einzelnen Phasen der Oszillationen konnten eine solche Synchronisation aber bis jetzt nicht nachweisen. Die spannende Frage bleibt aber weiterhin bestehen, ob unter gewissen Bedingungen vielleicht doch Synchronisationen vorhanden sind. Hieraus ergeben sich möglicherweise weitere Anknüpfungspunkte und lohnende Fragestellungen für zukünftige Arbeiten.

Eine Synchronisation der Calcium-Oszillationen ist insofern von großem wissenschaftlichem Interesse, da in der Literatur intensiv diskutiert wird, ob dieses Phänomen Zeichen einer interzellulären und intrazellulären Kommunikation darstellt. Es wird in der Literatur davon ausgegangen, dass in der interzellulären Calcium-Signaltransduktion zwei entscheidende Prozesse beteiligt sind: Zum einem über zytoplasmatische Botenstoffe durch Gap junctions (Toyofuku et al. 1998) und zu anderen über nach extrazellulär sezernierte Botenstoffe und deren Diffusion zu den Nachbarzellen (parakrine Signaltransduktion) (Hassingier et al. 1996). Gerade die Bedeutung der Gap junctions für die Aufrechterhaltung von Oszillationen in kommunizierenden Stammzellen ist ein interessanter Ansatzpunkt für die Erforschung von synchronisierten Calcium-Oszillationen. Diese Thematik wird in einer weiteren Doktorarbeit in derselben Arbeitsgruppe untersucht (Mitteilung Myriam Hatry). Abschließende Ergebnisse sind aber zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht vorhanden.

Die weitere zukünftige Fragestellung beinhaltet die Untersuchung, inwieweit die Differenzierung von Stammzellen über die Calcium-Oszillationen gesteuert wird. Die im Ergebnisteil beschriebenen experimentellen Ergebnisse lassen jedoch noch keine abschließende Deutung zu.

### **6.4 Abschließende Betrachtungen**

Diese Arbeit beschäftigte sich vor allem mit der Charakterisierung adipogener Stammzellen und deren Differenzierung. Es ist noch ein langer experimenteller Weg, bis die adipogenen Stammzellen Eingang in die klinische Routine haben werden. Das Ziel der Erforschung der Stammzellbiologie besteht vor allem in der Entwicklung von Stammzelltherapien zum Einsatz im Rahmen der regenerativen Medizin und des Tissue engineering. Idealerweise müsste eine Stammzelle für diesen Einsatz folgende Kriterien besitzen: zum einem müsste sie in großer Anzahl vorhanden und leicht zu isolieren sein und zum anderen müsste sie sich zu vielen

## 6. Diskussion

---

Zelllinien reproduzierbar differenzieren und sicher und effektiv autolog transplantiert werden können (Gimble et al. 2007)

Fettgewebe als Stammzellquelle entspricht einigen Anforderungen in besonderer Weise. Die Stammzellen sind in großer Anzahl vorhanden und lassen sich leicht isolieren. Eine Differenzierung zu verschiedenen Zelllinien wie Adipozyten, Chondrozyten, Osteoblasten, Kardiomyozyten, Endothelzellen und neuronalen Progenitorzellen (Ashjian et al. 2003, Planat-Bénard 2004, Zuk 2002) konnte experimentell in vitro und teilweise auch in vivo bereits gezeigt werden. Schwierigkeiten bestehen nach wie vor in der experimentellen Differenzierung zu spezialisierten Zellen der verschiedenen Organe wie Lunge, Niere oder Leber. Die Entwicklungs- und Differenzierungsvorgängen zu diesen Zellen sind bis heute nur noch sehr unvollständig verstanden.

Fettgewebe könnte als neue Stammzellquelle somit für die zukünftigen medizinischen Therapien eine entscheidende Rolle spielen. Dennoch wird es noch einige experimentelle Arbeiten bedürfen, bevor adipogene Stammzellen Eingang in die klinische Routine finden werden.

Ein wenig beleuchteter Punkt der Stammzelltherapie ist die maligne Transformation der Stammzellen. In einer Arbeit von Rubio et al. konnte gezeigt werden, dass bei einer Kultivierung über 4 Monaten die adipogenen Stammzellen maligne transformieren. Bei den Stammzellen konnte in über 30% der Fälle Kernabnormalitäten nachgewiesen werden. Nach Implantation in immundefiziente Mäuse entwickelten diese in über 50% der Fälle Tumoren (Rubio D. 2005). Es stellt sich dabei die Frage, inwieweit es sich bei der Studie wirklich um adipogene Stammzellen gehandelt hat.

In Arbeiten von Rehmann et al. konnte gezeigt werden, dass adipogene Stammzellen verschiedene angiogenetische Wachstumsfaktoren wie VEGF und HGF in einer bioaktiven Konzentration sezernieren (Rehman et al. 2004). Diese Beobachtungen eröffneten die Diskussion, ob es sich bei einer Stammzelltransplantation wirklich um eine regenerative Zelltherapie oder um eine Zell-basierte Zytokin-Therapie handelt. Eine reine Zytokin-Therapie könnte allerdings in medikamentöser Form durchgeführt werden und bedürfte keiner Injektion von Stammzellen.

Es wird somit notwendig sein, trotz aller Hoffungen, die für die Heilung von Krankheiten durch die Stammzelltherapie geweckt werden, den möglichen und realistischen Benefit für den Patienten ausreichend abzuwiegen. Es muss somit kritisch überprüft werden, ob die experimentell entworfenen Therapieansätze mit Stammzellen einen günstigen Effekt auf die Behandlung der Erkrankungen haben wird. Allerdings haben die adipogenen Stammzellen für

## 6. Diskussion

---

die weitere Erforschung von Stammzelltherapien den besonderen Vorteil der großen Verfügbarkeit und der autologen Transplantationsmöglichkeit, so dass in der Zukunft diese Stammzellen sicherlich eine entscheidende Rolle in der Medizin spielen werden.

## 7. Zusammenfassung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit den Grundlagen der Isolation, Charakterisierung und Differenzierung von humanen fettabgeleiteten Stammzellen. Für die Gewinnung der humanen Stammzellen für die experimentellen Untersuchungen wurden eigens entwickelte Methoden entworfen und ausführlich beschrieben, die eine hohe Stammzell-Ausbeute aus dem Fettgewebe gewährleisten. Die erarbeiteten Methoden sollen als zukünftige Anleitung für alle weiteren Stammzellisolationen für die experimentellen Arbeiten mit den Stammzellen dienen.

Neben der Etablierung sämtlicher Zellkulturmethoden für die Stammzellen wurden ausführliche Wachstumsmessungen durchgeführt, um die Proliferationseigenschaften der Stammzellen genauer zu beschreiben. Im Weiteren konnte durch den Nachweis von Stammzellmarkern die isolierten Stammzellen mit immunzytochemischen Methoden am konfokalen Mikroskop und in der FACS Analyse eindeutig charakterisiert werden.

In dieser Arbeit gelang es erstmals, eine spontane endotheliale Differenzierung der adipogenen Stammzellen durch den eindeutigen Nachweis von verschiedenen spezifischen endothelialen Markern durch immunzytochemische Methoden am konfokalen Mikroskop und durch die FACS-Analyse zu zeigen. Im Konfrontations-Modell der Stammzellen mit einem Tumor-Sphäroid konnten zudem endotheliale Differenzierungen der Stammzellen im Tumor induziert werden.

Im Weiteren konnten erstmals spontane Calcium-Oszillationen bei den adipogenen Stammzellen nachgewiesen werden, die ausführlicher auf ihre Beeinflussung durch extra- und intrazelluläre Substanzen analysiert wurden. Es konnte gezeigt werden, dass extrazelluläre Calcium-Ionen Einflüsse auf die Oszillationen haben. Zu dem ließen sich die Oszillationen durch Inkubation der Zellen mit SKF 96365 und BAPTA von intrazellulärer Seite inhibieren, was auf die Notwendigkeit sowohl extrazellulären Calciums, als auch Calcium aus intrazellulären Speichern hinweist.

## 8. Summary

This present study reports on the isolation, characterisation and differentiation of human adipose tissue derived stem cells. For human adipose tissue stem cell extraction own techniques were developed and described in detail to guarantee a high production of stem cells from adipose tissue. This developed technique should be guidance for further stem cell isolation processes.

After establishment of all procedures for stem cell culture growth measurements were undertaken to describe the proliferation properties of human adipose tissue derived stem cells in details. In further experiments the detection of stem cell markers expressed by human stem cells by confocal microscopy and FACS analysis were preformed to study their definite stem cell characteristics.

This is the first study to successfully show a spontaneous endothelial differentiation of adipose tissue derived stem cells during prolonged cell culture by definite detection of endothelial markers using immunohistochemistry, confocal microscopy and FACS analysis. In confrontation culture of stem cells with tumour spheroids endothelial cell differentiation could be induced.

Furthermore for the first time spontaneous  $\text{Ca}^{2+}$ -oscillations in adipose tissue derived stem cells were described. The effect of different conditions on calcium oscillations was studied. It was found that extracellular calcium-ions show effects on oscillations. In addition calcium oscillations can be abolished by intracellular substances such as SKF 96365 and BAPTA, which show the necessity of extracellular calcium and calcium from intracellular stores.

## 9. Literaturübersicht

- Aragon-Ching, J. B., and W. L. Dahut. 2008. The role of angiogenesis inhibitors in prostate cancer. *Cancer J* 14: 20-5.
- Ashjian, P. H., A. S. Elbarbary, B. Edmonds, D. DeUgarte, M. Zhu, P. A. Zuk, H. P. Lorenz, P. Benhaim, and M. H. Hedrick. 2003. In vitro differentiation of human processed lipoaspirate cells into early neural progenitors. *Plast Reconstr Surg* 111: 1922-31.
- Banfi, A., G. Bianchi, M. Galotto, R. Cancedda, and R. Quarto. 2001. Bone marrow stromal damage after chemo/radiotherapy: occurrence, consequences and possibilities of treatment. *Leuk Lymphoma* 42: 863-70.
- Barbara, N. P., Wrana, J. L., Letarte, M. 1999. Endoglin Is an Accessory Protein That Interacts with the Signaling Receptor Complex of Multiple Members of the Transforming Growth Factor- $\beta$  Superfamily. *J Biol. Chem.* 274: 584-594.
- Berridge, M. J. 1993. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 361: 315-25.
- Bezprozvanny, I., and B. E. Ehrlich. 1995. The inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP<sub>3</sub>) receptor. *J Membr Biol* 145: 205-16.
- Bootman, M. D., K. W. Young, J. M. Young, R. B. Moreton, and M. J. Berridge. 1996. Extracellular calcium concentration controls the frequency of intracellular calcium spiking independently of inositol 1,4,5-trisphosphate production in HeLa cells. *Biochem J* 314 (Pt 1): 347-54.
- Brazelton, T. R., Rossi, F. M., Keshet, G. I., Blau, H. M. 2000. From Marrow to Brain: Expression of Neuronal Phenotypes in Adult Mice. *Science* 290: 1775-1779.

## 8. Literaturübersicht

---

- Cao, B., Zheng, B., Jankowski, R., Kimura, S., Ikezawa, M., Deasy, B., Cummins, J., Epperly, M., Qu-Petersen, Z., Huard, J. 2003. Muscle stem cells differentiate into haematopoietic lineages but retain myogenic potential. *Nat Cell Biol* 5: 640-646.
- Cao, Y., Z. Sun, L. Liao, Y. Meng, Q. Han, and R. C. Zhao. 2005. Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 332: 370-9.
- Caveda, L., I. Martin-Padura, P. Navarro, F. Breviario, M. Corada, D. Gulino, M. G. Lampugnani, and E. Dejana. 1996. Inhibition of cultured cell growth by vascular endothelial cadherin (cadherin-5/VE-cadherin). *J Clin Invest* 98: 886-93.
- Cuthbertson, K. S., and P. H. Cobbold. 1985. Phorbol ester and sperm activate mouse oocytes by inducing sustained oscillations in cell Ca<sup>2+</sup>. *Nature* 316: 541-2.
- D'Ippolito, G., P. C. Schiller, C. Ricordi, B. A. Roos, and G. A. Howard. 1999. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J Bone Miner Res* 14: 1115-22.
- Davis, S., T. H. Aldrich, P. F. Jones, A. Acheson, D. L. Compton, V. Jain, T. E. Ryan, J. Bruno, C. Radziejewski, P. C. Maisonpierre, and G. D. Yancopoulos. 1996. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* 87: 1161-9.
- De Koninck, P., and H. Schulman. 1998. Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca<sup>2+</sup> oscillations. *Science* 279: 227-30.
- De Ugarte, D. A., Alfonso, Z., Zuk, P. A., Elbarbary, A., Zhu, M., Ashjian, P., Benhaim, P., Hedrick, M. H., Fraser, J. K. 2003. Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunology Letters* 89: 267-270.
- de Vries, C., J. A. Escobedo, H. Ueno, K. Houck, N. Ferrara, and L. T. Williams. 1992. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 255: 989-91.

## 8. Literaturübersicht

---

- Dennis, J. E., J. P. Carbillet, A. I. Caplan, and P. Charbord. 2002. The STRO-1+ marrow cell population is multipotential. *Cells Tissues Organs* 170: 73-82.
- Dixon, C. J., N. M. Woods, K. S. Cuthbertson, and P. H. Cobbold. 1990. Evidence for two Ca<sup>2+</sup>-mobilizing purinoceptors on rat hepatocytes. *Biochem J* 269: 499-502.
- Drexler, H. G., E. Thiel, and W. D. Ludwig. 1991. Review of the incidence and clinical relevance of myeloid antigen-positive acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 5: 637-45.
- Duff, S. E., C. Li, J. M. Garland, and S. Kumar. 2003. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *Faseb J* 17: 984-92.
- Dumont, D. J., G. Gradwohl, G. H. Fong, M. C. Puri, M. Gertsenstein, A. Auerbach, and M. L. Breitman. 1994. Dominant-negative and targeted null mutations in the endothelial receptor tyrosine kinase, tek, reveal a critical role in vasculogenesis of the embryo. *Genes Dev* 8: 1897-909.
- Dupont, G., and A. Goldbeter. 1998. CaM kinase II as frequency decoder of Ca<sup>2+</sup> oscillations. *Bioessays* 20: 607-10.
- F. F. Kabbinavar, J. S., M. McCleod, T. Patel, J. Hamm, J. Hecht, B. Perrou, S. Griffing, B. Nelson, W. Novotny. 2004. Bevacizumab (a monoclonal antibody to vascular endothelial growth factor) to prolong progression-free survival in first-line colorectal cancer (CRC) in subjects who are not suitable candidates for first-line CPT-11. *Journal of Clinical Oncol* 22: 3516.
- Ferrara, N., and T. Davis-Smyth. 1997. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 18: 4-25.
- Ferrari, G., Cusella-De Angelis, G., Coletta, M., Paolucci, E., Stornaiuolo, A., Cossu, G., Mavilio, F. 1998. Muscle Regeneration by Bone Marrow-Derived Myogenic Progenitors. *Science* 279: 1526-1530.

## 8. Literaturübersicht

---

- Gall, D., E. Baus, and G. Dupont. 2000. Activation of the liver glycogen phosphorylase by Ca(2+)oscillations: a theoretical study. *J Theor Biol* 207: 445-54.
- Gifford, S. M., M. A. Grummer, S. A. Pierre, J. L. Austin, J. Zheng, and I. M. Bird. 2004. Functional characterization of HUVEC-CS: Ca<sup>2+</sup> signaling, ERK 1/2 activation, mitogenesis and vasodilator production. *J Endocrinol* 182: 485-99.
- Gimble, J., and F. Guilak. 2003. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy* 5: 362-9.
- Gimble, J. M., Guilak, F. 2003. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization and differentiation potential. *Cytotherapy* 5: 362-369.
- Gimble, J. M., A. J. Katz, and B. A. Bunnell. 2007. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res* 100: 1249-60.
- Gniadecki, R., and B. Gajkowska. 2003. Intracellular calcium pool emptying induces DNA synthesis in HaCaT keratinocytes. *Exp Dermatol* 12: 453-9.
- Goldbeter, A. 1996. Biochemical Oscillations and Cellular Rhythms. *Cambridge University Press*, Cambridge.
- Gronthos, S., D. M. Franklin, H. A. Leddy, P. G. Robey, R. W. Storms, and J. M. Gimble. 2001. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol* 189: 54-63.
- Gronthos, S., S. E. Graves, S. Ohta, and P. J. Simmons. 1994. The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood* 84: 4164-73.
- Gussoni, E., Soneoka, Y., Strickland, C. D., Buzney, E. A., Khan, M. A., Flint, A. F., Kunkel, L. M., Mulligan, R. C. 1999. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 401: 390-394.
- Hall, P. A., and F. M. Watt. 1989. Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. *Development* 106: 619-33.

## 8. Literaturübersicht

---

- Hassinger, T. D., P. B. Guthrie, P. B. Atkinson, M. V. Bennett, and S. B. Kater. 1996. An extracellular signaling component in propagation of astrocytic calcium waves. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 13268-73.
- Haugland, R. P. 1996. Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals.
- Hurwitz, H., L. Fehrenbacher, W. Novotny, T. Cartwright, J. Hainsworth, W. Heim, J. Berlin, A. Baron, S. Griffing, E. Holmgren, N. Ferrara, G. Fyfe, B. Rogers, R. Ross, and F. Kabbinavar. 2004. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 350: 2335-42.
- Izadpanah, R., C. Trygg, B. Patel, C. Kriedt, J. Dufour, J. M. Gimble, and B. A. Bunnell. 2006. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem* 99: 1285-97.
- Jacob, R. 1990. Calcium oscillations in electrically non-excitable cells. *Biochim Biophys Acta* 1052: 427-38.
- Johnston, L., G. P. Sergeant, M. A. Hollywood, K. D. Thornbury, and N. G. McHale. 2005. Calcium oscillations in interstitial cells of the rabbit urethra. *J Physiol* 565: 449-61.
- Kapur, N., G. A. Mignery, and K. Banach. 2007. Cell cycle-dependent calcium oscillations in mouse embryonic stem cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: C1510-8.
- Küstermann, E., Roell, W., Breitbach, M., Wecker, S., Wiedermann, D., Buehrle, C., Welz, A., and J. Hescheler, Fleischmann, B.K., Hoehn, M. 2005. Stem cell implantation in ischemic mouse heart: a high- resolution magnetic resonance imaging investigation. *NMR Biomed* 18: 362-370.
- Kummer, U., L. F. Olsen, C. J. Dixon, A. K. Green, E. Bornberg-Bauer, and G. Baier. 2000. Switching from simple to complex oscillations in calcium signaling. *Biophys J* 79: 1188-95.

## 8. Literaturübersicht

---

- Lamoury, F. M., J. Croitoru-Lamoury, and B. J. Brew. 2006. Undifferentiated mouse mesenchymal stem cells spontaneously express neural and stem cell markers Oct-4 and Rex-1. *Cytotherapy* 8: 228-42.
- Lampugnani, M. G., M. Resnati, M. Raiteri, R. Pigott, A. Pisacane, G. Houen, L. P. Ruco, and E. Dejana. 1992. A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts. *J Cell Biol* 118: 1511-22.
- Lendeckel, U., M. Arndt, K. Frank, T. Wex, and S. Ansorge. 1999. Role of alanyl aminopeptidase in growth and function of human T cells (review). *Int J Mol Med* 4: 17-27.
- Lumelsky, N., Blondel, O., Laeng, P., Velasco, I., Ravin, R., McKay, R. 2001. Insulin-Secreting Structures Similar to Pancreatic Differentiation of Embryonic Stem Cells to Islets. *Science* 292: 1389-1394.
- Martinez-Estrada, O. M., Y. Munoz-Santos, J. Julve, M. Reina, and S. Vilaro. 2005. Human adipose tissue as a source of Flk-1+ cells: new method of differentiation and expansion. *Cardiovasc Res* 65: 328-33.
- McCormack, P. L., and S. J. Keam. 2008. Bevacizumab: a review of its use in metastatic colorectal cancer. *Drugs* 68: 487-506.
- Merritt, J. E., W. P. Armstrong, C. D. Benham, T. J. Hallam, R. Jacob, A. Jaxa-Chamiec, B. K. Leigh, S. A. McCarthy, K. E. Moores, and T. J. Rink. 1990. SK&F 96365, a novel inhibitor of receptor-mediated calcium entry. *Biochem J* 271: 515-22.
- Meyer, T., and L. Stryer. 1988. Molecular model for receptor-stimulated calcium spiking. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 5051-5.
- Mezey, E., Chandross, K. J., Harta, G., Maki, R. A., McKercher, S. R. 2000. Turning Blood into Brain: Cells Bearing Neuronal Antigens Generated in Vivo from Bone Marrow. *Science* 290: 1779-1782.

## 8. Literaturübersicht

---

- Millauer, B., L. K. Shawver, K. H. Plate, W. Risau, and A. Ullrich. 1994. Glioblastoma growth inhibited in vivo by a dominant-negative Flk-1 mutant. *Nature* 367: 576-9.
- Millauer, B., S. Wizigmann-Voos, H. Schnurch, R. Martinez, N. P. Moller, W. Risau, and A. Ullrich. 1993. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 72: 835-46.
- Morita, K., K. Koketsu, and K. Kuba. 1980. Oscillation of  $[Ca^{2+}]_i$ -linked  $K^+$  conductance in bullfrog sympathetic ganglion cell is sensitive to intracellular anions. *Nature* 283: 204-5.
- Muschler, G. F., H. Nitto, C. A. Boehm, and K. A. Easley. 2001. Age- and gender-related changes in the cellularity of human bone marrow and the prevalence of osteoblastic progenitors. *J Orthop Res* 19: 117-25.
- Mustonen, T., and K. Alitalo. 1995. Endothelial receptor tyrosine kinases involved in angiogenesis. *J Cell Biol* 129: 895-8.
- Passier, R., and C. Mummery. 2003. Origin and use of embryonic and adult stem cells in differentiation and tissue repair. *Cardiovasc Res* 58: 324-35.
- Passier, R., Mummery, C. 2002. Origin and use of embryonic and adult stem cells in differentiation and tissue repair. *Cardiovasc Res* 58: 324-335.
- Peter H. Ashjian, M. D., Amir S. Elbarbary, M.D., Brian Edmonds, Ph.D., Daniel DeUgarte, M.D., M. D. Min Zhu, Patricia A. Zuk, Ph.D., H. Peter Lorenz, M.D., Prosper Benhaim, M.D., and M. D. Marc H. Hedrick. 2003. In Vitro Differentiation of Human Processed Lipoaspirate Cells into Early Neural Progenitors. *Plast Reconstr Surg* 111: 1922-1931.
- Planat-Bénard, V., Menard, C., André, M., Puceat, M., Perez, A., Garcia-Verdugo, J.-M., Pénicaud, L., Casteilla, L. 2004. Spontaneous Cardiomyocyte Differentiation From Adipose Tissue Stroma Cells. *Circ Res* 94: 223-229.

## 8. Literaturübersicht

---

- Pochampally, R. R., J. R. Smith, J. Ylostalo, and D. J. Prockop. 2004. Serum deprivation of human marrow stromal cells (hMSCs) selects for a subpopulation of early progenitor cells with enhanced expression of OCT-4 and other embryonic genes. *Blood* 103: 1647-52.
- Rapp, P. E., A. I. Mees, and C. T. Sparrow. 1981. Frequency encoded biochemical regulation is more accurate than amplitude dependent control. *J Theor Biol* 90: 531-44.
- Rehman, J., D. Traktuev, J. Li, S. Merfeld-Clauss, C. J. Temm-Grove, J. E. Bovenkerk, C. L. Pell, B. H. Johnstone, R. V. Considine, and K. L. March. 2004. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* 109: 1292-8.
- Richard, D. E., E. Berra, and J. Pouyssegur. 1999. Angiogenesis: how a tumor adapts to hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* 266: 718-22.
- Riemann, D., A. Kehlen, and J. Langner. 1999. CD13--not just a marker in leukemia typing. *Immunol Today* 20: 83-8.
- Riemann, D., A. Kehlen, K. Thiele, M. Lohn, and J. Langner. 1997. Induction of aminopeptidase N/CD13 on human lymphocytes after adhesion to fibroblast-like synoviocytes, endothelial cells, epithelial cells, and monocytes/macrophages. *J Immunol* 158: 3425-32.
- Roche, S., M. J. Richard, and M. C. Favrot. 2007. Oct-4, Rex-1, and Gata-4 expression in human MSC increase the differentiation efficiency but not hTERT expression. *J Cell Biochem* 101: 271-80.
- Rooney, T. A., E. J. Sass, and A. P. Thomas. 1989. Characterization of cytosolic calcium oscillations induced by phenylephrine and vasopressin in single fura-2-loaded hepatocytes. *J Biol Chem* 264: 17131-41.
- Rubio D., G.-C. J., Martin MC., de la Fuente R., Cigudosa JC., Lloyd AC., Bernad A. 2005. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res* 65: 3035-3039.

## 8. Literaturübersicht

---

- Sadler, J. E. 1998. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu Rev Biochem* 67: 395-424.
- Sauer, H., C. Hofmann, M. Wartenberg, A. M. Wobus, and J. Hescheler. 1998. Spontaneous calcium oscillations in embryonic stem cell-derived primitive endodermal cells. *Exp Cell Res* 238: 13-22.
- Sauve, R., A. Diarra, M. Chahine, C. Simoneau, L. Garneau, and G. Roy. 1990. Single-channel and Fura-2 analysis of internal Ca<sup>2+</sup> oscillations in HeLa cells: contribution of the receptor-evoked Ca<sup>2+</sup> influx and effect of internal pH. *Pflugers Arch* 416: 43-52.
- Schild, D. 1996. Laser scanning microscopy and calcium imaging. *Cell Calcium* 19: 281-96.
- Schuster, S., M. Marhl, and T. Hofer. 2002. Modelling of simple and complex calcium oscillations. From single-cell responses to intercellular signalling. *Eur J Biochem* 269: 1333-55.
- Seo, B.-M., Miura, M., Gronthos, S., Bartold, P. M., Batouli, S., Brahim, J., Young, M., Robey, M. G., Wang, C.-Y., Shi, S. 2004. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 264: 149-155.
- Shalaby, F., J. Rossant, T. P. Yamaguchi, M. Gertsenstein, X. F. Wu, M. L. Breitman, and A. C. Schuh. 1995. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 376: 62-6.
- Shibuya, M., N. Ito, and L. Claesson-Welsh. 1999. Structure and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 and -2. *Curr Top Microbiol Immunol* 237: 59-83.
- Simmons, P. J., Gronthos, S., Zannettino, A., Ohta, S., Graves S. 1994. Isolation, characterization and functional activity of human marrow stromal progenitors in hemopoiesis. *Prog Clin Biol Res* 389: 271-280.

## 8. Literaturübersicht

---

- Simmons, P. J. a. T.-S., B. 1991. Identification of Stromal Cell Precursors in Human Bone Marrow by a Novel Monoclonal Antibody, STRO-1. *Blood* 78: 55-62.
- Skurk, C., H. Maatz, E. Rocnik, A. Bialik, T. Force, and K. Walsh. 2005. Glycogen-Synthase Kinase3beta/beta-catenin axis promotes angiogenesis through activation of vascular endothelial growth factor signaling in endothelial cells. *Circ Res* 96: 308-18.
- Stone, K. R., Mickey, D.D., Wunderli, H., Mickey, G.H., Paulson, D.F. 1978. Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *Int J Cancer* 21: 274-281.
- Strem, B. M., K. C. Hicok, M. Zhu, I. Wulur, Z. Alfonso, R. E. Schreiber, J. K. Fraser, and M. H. Hedrick. 2005. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med* 54: 132-41.
- Toyofuku, T., M. Yabuki, K. Otsu, T. Kuzuya, M. Hori, and M. Tada. 1998. Intercellular calcium signaling via gap junction in connexin-43-transfected cells. *J Biol Chem* 273: 1519-28.
- Wagner, W., F. Wein, A. Seckinger, M. Frankhauser, U. Wirkner, U. Krause, J. Blake, C. Schwager, V. Eckstein, W. Ansorge, and A. D. Ho. 2005. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol* 33: 1402-16.
- Wartenberg, M., F. Donmez, F. C. Ling, H. Acker, J. Hescheler, and H. Sauer. 2001. Tumor-induced angiogenesis studied in confrontation cultures of multicellular tumor spheroids and embryoid bodies grown from pluripotent embryonic stem cells. *Faseb J* 15: 995-1005.
- Weissmann, I. L. 2000. Stem cells: units of development, units of regenerator and units in evolution. *Cell* 100: 157-168.
- Winslow, T., ed. 2001. *Stem cells*.

## 8. Literaturübersicht

---

- Wislet-Gendebien, S., Hans, G., Leprince, P., Rigo, J.-M., Moonen, G., Rogister, B. 2005. Plasticity of Cultured Mesenchymal Stem cells: Switch from Nestin-Positive to Excitable Neuron-Like Phenotype. *Stem Cells* 23: 392-402.
- Woods, N. M., C. J. Dixon, K. S. Cuthbertson, and P. H. Cobbold. 1990. Modulation of free Ca oscillations in single hepatocytes by changes in extracellular K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup>. *Cell Calcium* 11: 353-60.
- Yang, K., and C. L. Cepko. 1996. Flk-1, a receptor for vascular endothelial growth factor (VEGF), is expressed by retinal progenitor cells. *J Neurosci* 16: 6089-99.
- Zimmermann, B., and B. Walz. 1997. Serotonin-induced intercellular calcium waves in salivary glands of the blowfly *Calliphora erythrocephala*. *J Physiol* 500 (Pt 1): 17-28.
- Zuk, P. A., M. Zhu, P. Ashjian, D. A. De Ugarte, J. I. Huang, H. Mizuno, Z. C. Alfonso, J. K. Fraser, P. Benhaim, and M. H. Hedrick. 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13: 4279-95.
- Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, P. D., Huang, J. I., Mizuno, H., Alfonso, Z. C., Fraser, J.K., Benhaim, P., Hedrick, M. H. 2002. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Molecular Biology of the cells* 13: 4279-4295.

# 10. Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden im Folgenden veröffentlicht:

Sauer H., Hatry M., **Steffen P.**, Padmasekar M., Howaldt H.P., Lendeckel S., Ettore G., Bein G., Piper H.M., Wartenberg M. 2008. NOS inhibitors synchronize calcium oscillations in fat-derived mesenchymal stem cells by increasing gap junctional coupling. (*zum Zeitpunkt der Drucklegung in Revision, September 2008*)

**Steffen P.**, Padmasekar M., Wartenberg M., Sauer H. 2006. Endothelial cell differentiation from human fat-derived stem cells. Abstract number: PT07A-23. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*; Volume 5, Supplement 1: PT07A-23

Sauer H., **Steffen P.**, Hatry M., Wartenberg M. 2007. Calcium oscillations in differentiating mesenchymal stem cells derived from human fat tissue. Abstract number: P04-L2-14. 2007. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*; Volume 5, Supplement 1: P04-L2-14

## 11. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Heinrich Sauer für die interessante Themenstellung und die wertvolle Unterstützung während meiner Arbeit.

Ferner gilt mein herzlicher Dank allen, die durch ihre Mithilfe zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Meinen Arbeitskollegen danke ich zudem für die vielen fachlichen Diskussionen, die erfolgreiche Zusammenarbeit und die hervorragende Arbeitsatmosphäre.