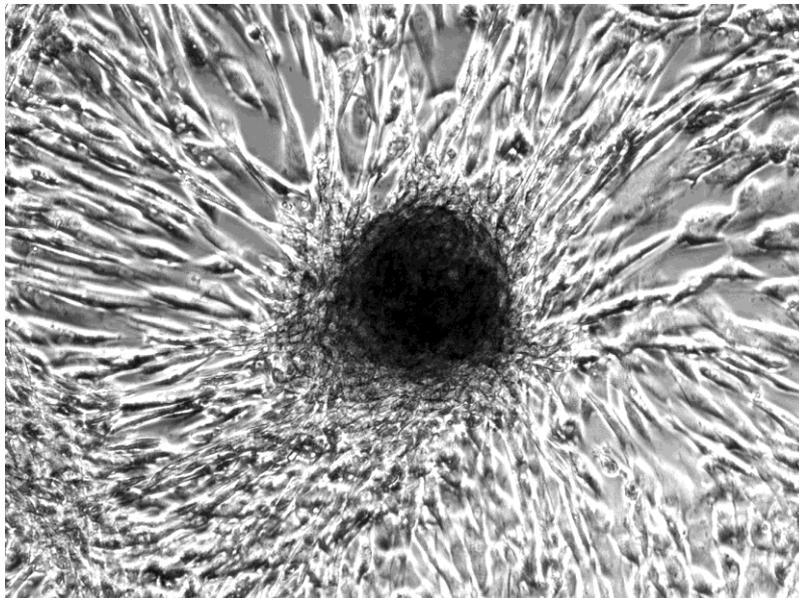


**Charakterisierung des Wachstums- und
Differenzierungspotentials caniner mesenchymaler
Stammzellen aus Knochenmark und Fettgewebe**



INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
am Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Christine Michaela Reich

Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Dr. Stefan Arnhold

**Charakterisierung des Wachstums- und
Differenzierungspotentials caniner mesenchymaler
Stammzellen aus Knochenmark und Fettgewebe**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
am Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen
eingereicht von

Christine Michaela Reich
Tierärztin aus Hanau

Gießen 2014

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Stefan Arnhold

Prof. Dr. Sybille Mazurek

Tag der Disputation: 23.06.2014

„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.“

Christine Michaela Reich

Meinen Eltern und meinen Freunden gewidmet

A. INHALTSVERZEICHNIS

A.	Inhaltsverzeichnis.....	6
B.	Publikationsverzeichnis.....	10
C.	Abkürzungsverzeichnis.....	12
D.	Abbildungsverzeichnis.....	15
E.	Tabellenverzeichnis.....	16
F.	Einleitung.....	17
G.	Literaturübersicht.....	18
1.	Stammzell-Modell.....	18
2.	Adulte mesenchymale Stammzellen.....	19
3.	Canine mesenchymale Stammzellen.....	20
3.1	MSC aus dem Knochenmark (KM-MSC).....	20
3.2	MSC aus dem Fettgewebe (Fett-MSC).....	21
3.3	MSC anderer Herkünfte.....	22
4.	Ansätze therapeutischer Anwendungsmöglichkeiten von MSC beim Hund..	23
4.1	Einsatz bei der Osteoarthritis und Knorpelregeneration.....	23
4.2	Einsatz bei der Frakturheilung und Knochenregeneration.....	26
H.	Material und Methoden.....	30
1.	Probengewinnung.....	30
1.1	Gewinnung adulter mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark	30
1.2	Gewinnung adulter mesenchymaler Stammzellen aus dem Fettgewebe..	31
2.	Zellkultur.....	33

INHALTSVERZEICHNIS

2.1	Passagieren	33
2.2	Bestimmung der Populationsverdopplungszeit.....	34
2.3	Kryokonservierung	35
2.4	Das Auftauen von Zellen	35
3.	Wundheilungs-Assay (Wound-Healing Cell Migration Assay)	36
4.	Durchflusszytometrie (FACS)	37
5.	Differenzierungen	39
5.1	Anlegen von Monolayer-Kulturen	39
5.2	Anlegen von Pelletkulturen.....	39
5.3	Chondrogene Differenzierung	40
5.4	Osteogene Differenzierung	41
5.5	Osteogene Differenzierung unter Zusatz von Calciumchlorid	42
6.	Histologie.....	43
6.1	Fixation und Vorbereitung der Proben.....	43
6.2	Hämalaun-Färbung	44
6.3	Alcianblau-Färbung	44
6.4	von Kossa-Färbung.....	45
7.	Elektronenmikroskopie	46
7.1	Fixation und Einbettung der Proben	46
7.2	Anfertigen der Schnitte und Vorbereitung für die TEM	46
8.	Molekularbiologie.....	46
8.1	Gewinnung und Aufbewahrung der Proben.....	46

INHALTSVERZEICHNIS

8.2	RNA-Extraktion	47
8.3	DNAse Behandlung und Reverse Transkription (RT)	48
8.4	Qualitative Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)	50
8.5	Agarose-Gelelektrophorese	52
8.6	Quantitative RT-PCR (qRT-PCR).....	53
9.	Statistische Auswertung.....	55
I.	Ergebnisse	56
1.	Isolierung, Morphologie und Kultureigenschaften von caninen MSC aus Knochenmark und Fettgewebe	56
1.1	Mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark (KM-MSK)	56
1.2	Mesenchymale Stammzellen aus dem Fettgewebe (Fett-MSK)	58
1.3	Kryokonservierung	62
1.4	Populationsverdopplungszeit	64
2.	Wound healing assay (Wundheilungs-assay)	65
3.	Expression stammzellspezifischer Marker und Marker früher Differenzierung	66
3.1	Stammzellspezifische Marker.....	66
3.2	Marker früher Differenzierungswege	69
4.	Chondrogene Differenzierung	69
4.1	Histomorphologie	69
4.2	Elektronenmikroskopie	73
4.3	Quantitative Expression chondrogener Marker-Gene.....	74

INHALTSVERZEICHNIS

5.	Osteogene Differenzierung	77
5.1	Histomorphologie	77
5.2	Elektronenmikroskopie	79
6.	Osteogene Differenzierung unter Zusatz von Calciumchlorid.....	82
6.1	Histomorphologie	82
J.	Diskussion.....	84
1.	Charakterisierung der MSC des Hundes.....	84
2.	Chondrogene Differenzierung	87
3.	Osteogene Differenzierung	90
K.	Zusammenfassung.....	97
L.	Summary.....	99
M.	Literaturverzeichnis	101
N.	Anhang	112
1.	Verbrauchsmaterialien und Geräte	112
2.	Chemikalien und Reagenzien	113
3.	Antikörper für die Durchflusszytometrie	116
4.	Rezepte verwendeter Färbelösungen	116
4.1	5 % Silbernitrat (von Kossa-Färbung).....	116
4.2	5% Na-Carbonat-Formaldehyd (von Kossa-Färbung)	116
4.3	Farmers Reducer (von Kossa-Färbung)	116
4.4	Kernechtrot	117
4.5	Alcianblau-Färbelösung	117

B. PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

Originalarbeiten

Reich CM, Raabe O, Wenisch S, Bridger PS, Kramer M, Arnhold S (2012): Isolation, culture and chondrogenic differentiation of canine adipose tissue- and bone marrow-derived mesenchymal stem cells - A comparative study. Vet Res Comm. 2012(36):139-148; DOI 10.1007/s11259-012-9523-0

Raabe O, Shell K, Würtz A, **Reich CM**, Wenisch S, Arnhold S (2011): Further insights into the characterization of equine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. Vet Res Comm. 2011(35)6:355-65. DOI 10.1007/s11259-011-9480-z

Raabe O, **Reich C**, Wenisch S, Hild A, Burg-Roderfeld M, Siebert HC, Arnhold S (2010): Hydrolyzed fish collagen induced chondrogenic differentiation of equine adipose tissue-derived stromal cells. Histochem Cell Biol. 2010 Dec;134(6):545-54. DOI 10.1007/s00418-010-0760-4

Abstracts

Tryankowski E, **Reich C**, Raabe O, Wenisch S, Kramer M, Arnhold S (2010): Effect of varying Ca²⁺-concentration on the osteogenic differentiation of adult mesenchymal stem cells. Abstract. 27. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft vom 29.09.2010 bis 01.10.2010 in Würzburg, veröffentlicht im Kongressbuch. DOI 10.3337/anatges.2010.0013

Reich CM, Raabe O, Wenisch S, Bridger PS, Kramer M, Arnhold S (2009): Comparison of canine adipose and bone marrow derived stem cells. Abstract 1st annual meeting of the veterinary stem cell consortium at the world congress on regenerative medicine, 29.-30.10.2009, Leipzig, veröffentlicht in Regen. Med. 2009, 4(6), Suppl. 2

Raabe O, **Reich C**, Wenisch S, Burg-Roderfeld M, Siebert H-C, Arnhold S (2009): Analyzing the chondrogenic differentiation potential of equine adipose tissue-derived stem cells. Abstract 1st annual meeting of the veterinary stem cell consortium at the

PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

world congress on regenerative medicine, 29.-30.10.2009, Leipzig, veröffentlicht in Regen. Med. 2009, 4(6), Suppl. 2

Reich CM, Raabe O, Wenisch S, Bridger PS, Arnhold S (2009): Comparison of canine bone marrow and adipose derived mesenchymal stem cells. Abstract und Poster auf der 104. Jahrestagung der Anatomischen Gesellschaft/ Joint meeting 2009 Anatomische Gesellschaft-Nederlandse Anatomen Vereniging vom 27.03.09 - 30.03.09 in Antwerpen, Belgien, veröffentlicht in Kongressbuch. DOI 10.3337/anatges.2009.0009

Raabe O, **Reich C**, Wenisch S, Burg-Roderfeld M, Siebert H-C, Arnhold S (2009): Analyzing the chondrogenic differentiation potential of equine adipose tissue-derived stem cells. Abstract und Poster auf der 104. Jahrestagung der Anatomischen Gesellschaft Joint meeting 2009 Anatomische Gesellschaft-Nederlandse Anatomen Vereniging vom 27.03.09 - 30.03.09 in Antwerpen, Belgien, veröffentlicht in Kongressbuch. DOI 10.3337/anatges.2009.0009

C. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AD-MSC	adipose tissue derived stem cell
AK	Antikörper
Aqua bidest	Aqua bidestillata
Aqua dest	Aqua destillata (destiliertes Wasser)
BM-MSC	bone marrow derived stem cell
BMP	bone morphogenetic protein
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
CaR	Calciumrezeptor
CD	Cluster of differentiation
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid (Komplementär-DNA)
CO ₂	Kohlendioxid
CT	threshold cycle (Schwellenwert)
Coll2A1	Collagen 2A1
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EZM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Reticulum
FACS	Durchflusszytometrie (fluorescence-activated cell sorting)
FBS	fötales Kälberserum (fetal bovine serum)

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Fett-MSC	Mesenchymale Stammzellen aus dem Fettgewebe
FSC	Forward scattered light (Vorwärts-Streulicht)
GAPDH	Glyceraldehyd- 3-phosphat-dehydrogenase
GFP	Green fluorescent protein
H	hours (Stunden)
Ig	Immunoglobulin
ITS	Insulin-Transferrin-Selenium
KM	Knochenmark
KM-MSC	Mesenchymale Stammzelle aus dem Knochenmark
mRNA	messenger ribonucleic acid (Boten-Ribonucleinsäure)
MSC	mesenchymal stem cell (Mesenchymale Stammzelle)
NK	Negativkontrolle
NTC	No template control (Negativkontrolle PCR)
O ₂	Sauerstoff
Oct4	octamer-binding transcription factor 4
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphatpuffer)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PE	Fluorophor R-Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd (4%ig)
qRT-PCR	quantitative RT-PCR
RT-PCR	reverse transcription PCR
rER	raues Endoplasmatisches Reticulum
RNA	Ribonucleic acid (Ribonucleinsäure)
RT	reverse transcription (reverse Transkription)
SD	standard deviation (Standardabweichung)
SSC	Sideward scattered light (Seitwärts-Streulicht)
SVF	stromal vascular fraction

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

TBS	tris buffered saline (Tris-Puffer)
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TGFβ	Transforming growth factor beta

Einheiten:

%	Prozent
μl	Microliter
μm	Micrometer
μM	Micromolar
°C	Grad Celsius
cm	Centimeter
d	days (Tage)
g	Gramm
h	hours(Stunden)
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
ng	Nanogramm
nm	Nanometer

D. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1 Wundheilungsassay	37
Abb. 2 Vergleichende Morphologie von KM-MSC (A,C,E,G) und Fett-MSC (B,D,F,H)	61
Abb. 3 Vergleich prä und post Kryokonservierung von KM-MSC (A,C) und Fett-MSC (B,D).....	63
Abb. 4 Vergleichende Zellmorphologie in der Durchflusszytometrie	64
Abb. 5 Populationsverdopplungszeit und Migrationsgeschwindigkeit im Vergleich ...	66
Abb. 6 Vergleichende mRNA-Expression des Pluripotenzmarkers Oct4 und früher Marker der Differenzierung in Fett, Knochen und Knorpel	67
Abb. 7 CD90 Expression des Oberflächenmarkers CD90	68
Abb. 8 Chondrogene Differenzierung KM-MSC nach 10 und 23 Tagen (Alcianblau- Färbung).....	71
Abb. 9 Chondrogene Differenzierung Fett-MSC nach 10 und 23 Tagen (Alcianblau- Färbung).....	72
Abb. 10 Ultrastrukturelle Darstellung der chondrogenen Differenzierung	74
Abb. 11 Relative mRNA-Expression von Sox9 und Coll2A1	76
Abb. 12 Histomorphologie osteogene Differenzierung.....	78
Abb. 13 Ultrastrukturelle Darstellung der osteogenen Differenzierung der KM-MSC	80
Abb. 14 Ultrastrukturelle Darstellung der osteogenen Differenzierung der Fett-MSC	81
Abb. 15 Osteogene Differenzierung unter dem Zusatz von CaCl ₂	83

E. TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1 Primersequenzen qualitative PCR.....	51
Tab. 2 Primersequenzen qRT-PCR.....	55
Tab. 3 Proben KM-MSD	56
Tab. 4 Proben Fett-MSD	59

F. EINLEITUNG

Mesenchymale Stammzellen (mesenchymal stem cells = MSC) sind multipotente, nicht-hämatopoetische Vorläuferzellenzellen, die sich in die verschiedensten Gewebe differenzieren können und darüber hinaus immunmodulatorische und heilungsfördernde Eigenschaften besitzen (Barry et al. 2004b; Caplan et al. 2006). In der Tiermedizin haben MSC aufgrund dieser Eigenschaften vor allem beim Pferd bereits breiten Eingang in die Therapie v.a. orthopädischer Erkrankungen gefunden (Arnhold et al. 2007; Smith et al. 2003; Frisbie et al. 2010). Der Einsatz von MSC am Hund beschränkt sich demgegenüber bisher vor allem auf präklinische Studien an Versuchshunden zur Abklärung potentieller Anwendungsmöglichkeiten am Menschen (Bruder et al. 1998; Ryu et al. 2009; Yang et al. 2009). Darüber hinaus existieren jedoch erste klinische Studien zum therapeutischen Einsatz von MSC bei der Osteoarthritis des Hundes (Black et al. 2007; 2008). Auch wenn bei diesen Studien keine Aufreinigung und nähere Charakterisierung der applizierten MSC stattfand, so geben ihre positiven Ergebnisse doch Grund zur Hoffnung, dass auch der Hund von einer MSC-gestützten Therapie profitieren könnte. Die Tatsache, dass MSC nicht nur aus dem Knochenmark, sondern auch aus dem Fettgewebe des Hundes isoliert werden können, vereinfacht darüber hinaus deren Gewinnung am Patienten deutlich (Neupane et al. 2008; Vieira et al. 2010). Gleichzeitig stellt sich jedoch die Frage, ob MSC aus dem Knochenmark und dem Fettgewebe des Hundes tatsächlich vollkommen gleichwertig sind.

Vergleichende Studien bei anderen Spezies deckten in den vergangenen Jahren deutliche Unterschiede bei MSC verschiedener Herkünfte auf, welche den Erfolg einer therapeutischen Behandlung entscheidend beeinflussen könnten (Im et al. 2005; Lee et al. 2004; Ugarte et al. 2003; Vidal et al. 2007, 2008). Eine solche vergleichende Studie fehlte bisher beim Hund. Der systematische Vergleich von MSC aus dem Knochenmark und Fettgewebe im Hinblick auf ihre Kultivierbarkeit, Proliferation, Marker-Expression und Differenzierbarkeit entlang der chondrogenen und osteogenen Linie sollte daher der Gegenstand dieser Arbeit sein.

G. LITERATURÜBERSICHT

1. STAMMZELL-MODELL

Als Stammzellen bezeichnet man Zellen, welche in der Lage sind, sich selbst zu erneuern und sich in verschiedenste Gewebe zu differenzieren. Dabei kann die Differenzierungsfähigkeit unterschiedlich weit reichen. Zu Beginn ihrer Entwicklung, nach der Befruchtung, sind die Zellen der Zygote bis etwa zum 4-Zell-Stadium noch toti- bzw. omnipotent, d.h. sie können sich noch jedwedem Gewebe entwickeln. Sowohl das Gewebe des späteren Embryos selbst (Embryoblast) als auch das Gewebe des Trophoblasten können aus diesen totipotenten Stammzellen hervorgehen. Bereits ab dem 8-Zellstadium und dem Beginn der Morula differenzieren sich die Furchungszellen oder Blastomeren in eine innere und äußere Zellmasse und verlieren damit ihre Totipotenz. Sie entwickeln sich entweder in Richtung des Trophoblasten oder des Embryoblasten. Während der Trophoblast gemeinsam mit den mütterlichen Teilen später die Plazenta bildet, stellt der Embryoblast die Grundlage für alle Gewebe des späteren Individuums dar. Da sich die Zellen des Embryoblasten nicht mehr in das extraembryonale Gewebe des Trophoblasten entwickeln und somit kein vollständiges Individuum hervorbringen können, werden sie als pluripotent bezeichnet. Pluripotenz bezeichnet somit die Fähigkeit sich in Gewebe aller drei Keimblätter (Ekto-, Endo- und Mesoderm) zu entwickeln (Schnorr/Kressin 2011). Die Zellen des Embryoblasten oder der sogenannten inneren Zellmasse werden daher auch als embryonale Stammzellen bezeichnet und haben bereits breiten Eingang in die Forschung gefunden. Da die Isolierung von embryonalen Stammzellen die Erzeugung und das anschließende Opfern eines Embryos erfordert, ist die Gewinnung solcher Stammzellen jedoch aufwändig und überdies ethisch sehr umstritten. Einen Ausweg aus diesem Dilemma bot hier die Entdeckung und Charakterisierung einer weiteren Gruppe von Stammzellen, der sogenannten adulten oder mesenchymalen Stammzellen.

2. ADULTE MESENCHYMALE STAMMZELLEN

Bereits 1976 postulierte Friedenstein, dass das Knochenmark postnatal ein Reservoir für Stammzellen zur Regeneration mesenchymaler Gewebe darstellt. Er war gleichzeitig auch der Erste, dem es gelang aus dem Knochenmark fibroblastoide, adhärent wachsende Zellen mit großem Proliferations- und osteogenem Differenzierungspotential zu isolieren (Friedenstein 1976a, b; Owen et al. 1988). Dieser Entdeckung folgten Arbeiten weiterer Forschergruppen, die das Differenzierungspotential dieser Zellen auch in verschiedene andere Gewebe nachweisen konnten. Dazu gehörten zunächst Differenzierungen in Knochen, Knorpel und Fett, schließlich aber auch in Muskel- und Sehngewebe (Wakitani et al. 1995; Prockop 1997; Young et al. 1998; Pittenger et al. 1999). Da all diesen Geweben die embryonale Herkunft aus dem mittleren Keimblatt, dem Mesoderm, gemeinsam war, nahm man zunächst an, dass die Differenzierungsfähigkeit dieser adulten Stammzellen beschränkt sei. Da alle bis dahin aus ihnen differenzierten Gewebe dem Mesoderm bzw. dem aus diesem hervorgegangenen embryonalen Bindegewebe, dem Mesenchym, entstammen, führte man den Namen „Mesenchymale Stammzelle“ (mesenchymal stem cell, MSC) für diesen neu entdeckten Zelltypus ein.

Zur Abgrenzung gegenüber der Toti-/Omnipotenz der Blastomeren sowie der Pluripotenz des Embryoblasten, definierte man ihr Differenzierungspotential zunächst als multipotent, um die Fixierung auf ein Keimblatt bzw. eine Differenzierungsrichtung zu definieren. Daher wird die Abkürzung MSC häufig auch mit *multipotent (mesenchymal/ stromal) stem cell* übersetzt.

Nachfolgende Untersuchungen zeigten jedoch, dass MSC sehr wohl in der Lage sind, sich auch in Gewebe der anderen Keimblätter zu differenzieren (Kopen et al. 1999; Sanchez-Ramos 2002; Rojas et al. 2005; Popp et al. 2006). Diese Fähigkeit zur Differenzierung über die Keimblatt-Barriere hinaus wurde der Begriff der Transdifferenzierung zugeordnet, d.h. MSC sind in der Lage ihre Fixierung auf ein Keimblatt zu überwinden und sich Gewebe anderer Keimblätter zu umzuwandeln (Phinney et al. 2007).

Während man zu Beginn ihrer Entdeckung davon ausging, MSC seien nur im Knochenmark beheimatet und würden Friedenstein's Theorie zufolge ins Blut freigesetzt, so weiß man heute, dass nahezu jedes Gewebe seinen eigenen Stammzellpool besitzt. MSC konnten bei Mensch und Maus in den vergangenen Jahren aus einer Vielzahl an Geweben wie Fett, Nabelschnurblut, Muskel, Haut und anderem mehr isoliert werden (Erices et al. 2000; Zuk et al. 2002; Young et al. 2001). Die Tatsache, dass man insbesondere in auf der extraluminale Seite von Blutgefäßen Zellen findet, die den aus Geweben isolierten MSC stark ähneln, führte in den letzten Jahren zunehmend zu der Überzeugung, dass nahezu jedes durchblutete Gewebe einen MSC-Pool in Form von derartigen Perizyten besitzt (Crisan et al. 2008; Meirelles et al. 2009). Im Folgenden soll nun auf die Quellen von MSC beim Hund und ihre denkbaren Anwendungsmöglichkeiten näher eingegangen werden.

3. CANINE MESENCHYMALE STAMMZELLEN

3.1 MSC aus dem Knochenmark (KM-MSC)

Bereits 1997 beschrieben Kadiyala et al. erstmalig die Isolierung spindelförmiger, sich in Kultur schnell anheftender Zellen aus dem Knochenmark des Hundes (Kadiyala et al. 1997). Aufgrund ihrer Fähigkeit sich *in vitro* und *in vivo* in Knorpel- und Knochengewebe zu differenzieren, postulierte die Gruppe, dass es sich hierbei um mesenchymale Stammzellen handeln müsse, wie sie analog bereits bei diversen anderen Spezies isoliert worden waren. Da das Interesse der Gruppe nicht dem Hund als Patienten, sondern vielmehr als klinisches Modell für humanmedizinische Studien galt, blieb eine eingehende Charakterisierung der Zellen jedoch aus. Dennoch beschrieben sie bereits einige grundlegende Eigenschaften der caninen KM-MSC wie die kurze Populationsverdopplungszeit und das besondere Verhalten während der osteogenen Differenzierung *in vitro*, die sich teilweise grundlegend von den KM-MSC anderer Spezies unterscheiden. Insbesondere die lange Kultivierungsdauer zur osteogenen Differenzierung sowie die dabei auftretende flächenhafte Ablösung der KM-MSC von der Zellkulturschale wurde hier erstmalig beschrieben. Dieser Erstbeschreibung schlossen sich eine Reihe prä-klinischer

Studien zur Knochen- und Knorpelregeneration der gleichen Gruppe am Modell Hund an, die teilweise sehr vielversprechende Ergebnisse erzielten und auf die später noch näher eingegangen werden soll (Bruder et al. 1998; Arinzeh et al. 2003; Kraus et al. 2006).

Das Interesse der Veterinärmedizin erweckten diese Zellen jedoch erst gut 10 Jahre später, woraufhin eine eingehende Charakterisierung der caninen MSC aus dem Knochenmark erfolgte (Csaki et al. 2007). Csaki und ihre Gruppe definierten canine KM-MSC als Fibroblasten-artige, Kolonie-formende Zellen, die an ihrer Oberfläche die für andere Spezies typischen MSC-Markerproteine CD105 und CD90 exprimieren (Dominici et al. 2006). Gleichzeitig wiesen sie nach, dass canine KM-MSC negativ für klassische Marker der Zellen der hämatopoetischen Linie, CD45 und CD34, sind. Neben dem bereits durch Kadiyala et al. gezeigten osteogenen Differenzierungspotential konnten sie auch ein chondrogenes und adipogenes Differenzierungspotential bei den KM-MSC nachweisen und untersuchten die differenzierten Zellen zusätzlich auf ultrastruktureller und molekularbiologischer Ebene. Kamishina et al. wiesen darüber hinaus die Differenzierungsfähigkeit der KM-MSC in die neuronale Richtung und damit in ein Gewebe ektodermaler Herkunft nach (Kamishina et al. 2006)

3.2 MSC aus dem Fettgewebe (Fett-MSC)

Die Charakterisierung von caninen MSC aus dem Fettgewebe erfolgte nur wenige Zeit später. In Anlehnung an ein humanes Protokoll isolierten Neupane et al. erfolgreich Fett-MSC aus Fettgewebe verschiedener Lokalisationen beim Hund (Neupane et al. 2008). Während sie bezüglich der Expression der Stammzellmarker und der Differenzierungsfähigkeit in die chondrogene, osteogene und adipogene Linie keine Unterschiede zwischen den Fett-MSC von verschiedenen Lokalisationen feststellen konnten, fanden sie jedoch deutliche Unterschiede in der Zellausbeute. Sie stellten fest, dass die Ausbeute an MSC pro Gramm Fett in subkutanem Fettgewebe deutlich höher ist als im Fettgewebe des großen Netzes, die geringste Ausbeute lieferte inguinales Fett. Ähnlich wie Kadiyala et al. bei den KM-MSC konnten auch sie bei den Fett-MSC des Hundes einen Verlust der Zelladhärenz unter

dem Einfluss der osteogenen Differenzierung feststellen (Kadiyala et al. 1997). Neu hingegen war, dass sich die caninen Fett-MSC unter dem Standardprotokoll refraktär gegenüber der adipogenen Differenzierung verhielten, die sich erst durch ein modifiziertes Differenzierungsprotokoll wiederherstellen ließ. Diese Besonderheit konnte durch eine weiterführende Charakterisierung caniner Fett-MSC durch Viera et al. jedoch nicht bestätigt werden (Vieira et al. 2010). Neben dem Differenzierungspotential, das die Gruppe um die myogene Differenzierung erweiterte, wiesen sie auch eine Reihe typischer MSC-Oberflächenmarker auf den Fett-MSC nach und zeigten die Abwesenheit hämatopoetischer Oberflächenmarker. Interessanterweise konnten sie im Gegensatz zu den KM-MSC den typischen MSC-Marker CD105 nicht nachweisen. In Ermangelung eines hundespezifischen Antikörpers sowie einer passenden Positivkontrolle bleibt es allerdings fraglich, ob der negative Nachweis nicht auf die mangelnde Bindung des verwendeten Antikörpers zurückzuführen war.

Ähnlich wie bei den KM-MSC wurden bereits vor und während der Charakterisierung der Fett-MSC klinische Studien an Versuchshunden durchgeführt, welche interessante Ergebnisse lieferten und auf die teilweise später noch näher eingegangen werden soll (Li et al. 2007; Ryu et al. 2009). Erste klinische Studien unter Anwendung von Fett-MSC in der Veterinärmedizin zeigten darüber hinaus vielversprechende Ergebnisse zum Einsatz bei der Osteoarthritis des Hundes und werden im Folgenden ausführlich erläutert.

3.3 MSC anderer Herkünfte

Wie bei anderen Versuchstieren und dem Menschen konnten auch aus dem Nabelschnurblut des Hundes MSC isoliert werden (Lim et al. 2007; Seo et al. 2009; Zucconi et al. 2010). Zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Dissertation wurde zudem die Isolierung aus dem Periost, dem Muskel, dem Periodontal-Ligament und der Wharton-Sulze bereits beschrieben (Ryu et al. 2012; Seo et al. 2012; Wang et al. 2012)

4. ANSÄTZE THERAPEUTISCHER ANWENDUNGSMÖGLICHKEITEN VON MSC BEIM HUND

Die Möglichkeiten der therapeutischen Anwendungen von MSC beim Hund erscheinen zunächst vielfältig. Sowohl die Differenzierbarkeit in verschiedene Gewebe als auch die Fähigkeit zur Sekretion immunmodulatorischer Faktoren machen eine Vielzahl an therapeutischen Ansätzen denkbar. Durch die Nutzung des Hundes als Modell für die Humanmedizin existieren bereits eine Reihe von Studien, deren Ergebnisse teilweise auch für die Tiermedizin einen Nutzen erkennen lassen. Während Veröffentlichungen zum Einsatz von MSC bei Myokardinfarkten und bei Verletzung des zentralen Nervensystems beim Hund eher von wissenschaftlichem Interesse sein dürften (Vulliet et al. 2004; Perin et al. 2008; Jung et al. 2009a; Ryu et al. 2009), so haben die Studien zum Einsatz bei orthopädischen Erkrankungen einen deutlichen stärkeren Bezug zur tiermedizinischen Praxis. Nicht zuletzt wurden auf Basis dieser bereits erste veterinärmedizinische Studien zum Einsatz von MSC beim Hund veröffentlicht (Black et al. 2007; Black et al. 2008; Crovace et al. 2008). Aus diesem Grunde wurde das Hauptaugenmerk dieser Arbeit auf die Differenzierung in Knochen und Knorpel gelegt.

4.1 Einsatz bei der Osteoarthritis und Knorpelregeneration

Bei der Osteoarthritis des Hundes kommt es zu einer Schädigung des hyalinen Gelenkknorpels, der selbst weder innerviert ist, noch eine eigene Blutversorgung besitzt. Diese Schädigung hat zur Folge, dass die degenerierenden Chondrozyten vermehrt pro-inflammatorische und Gewebe-zerstörende Zytokine und Mediatoren (Prostaglandine, Proteasen, freie Radikale) freisetzen, während die Sekretion von inhibitorischen Zytokinen abnimmt. Damit schreitet die Zerstörung von gesundem Knorpelgewebe weiter voran (Mortellaro 2003). Weiterhin betrifft die Osteoarthritis auch den darunterliegenden Knochen, in dem es durch die Entzündung zu Mikrofrakturen, Sklerosierung, zur Bildung von subchondralen Knochenzysten und häufig von Osteochondrophyten kommt, welche teilweise als sogenannte „Gelenksmäuse“ zusammen mit oberflächlichen Knorpelfragmenten in den Gelenkspalt freigesetzt werden. Durch die Erhöhung der mechanischen Reibung

LITERATURÜBERSICHT

und die freigesetzten Entzündungsmediatoren und freien Radikale kommt es schließlich zu einer reaktiven Entzündung der Synovialmembran, die zur Freisetzung weiterer gewebezerstörender Botenstoffe führt und den Prozess der Degeneration weiter vorantreibt (Johnston 1997; Mortellaro 2003). Die Folge sind zunehmende Schmerzen und Lahmheiten beim Patienten. Schätzungen zufolge sind bis zu 20% aller Hunde im Alter von über einem Jahr von einer fortschreitenden Osteoarthritis betroffen. Derzeit steht für diese Erkrankungen keine kausale Therapie zur Verfügung. Die therapeutische Herangehensweise besteht primär aus dem Einsatz von nicht-steroidalen Antiphlogistika und Analgetika, häufig in Kombination mit Futterzusatzstoffen, Physiotherapie und alternativen Therapien wie Akkupunktur. Chirurgische Ansätze finden sich in der Beseitigung von Knorpel- und Knochendissekaten oder, soweit möglich, im Rahmen des kompletten Gelenkersatzes (Sanderson et al. 2009).

Der Einsatz von MSC im Bereich der Osteoarthritis des Hundes kann daher gleich zwei Ziele verfolgen: Zum einen die Regeneration von Chondrozyten selbst, zum anderen die Modulation der Entzündung, welche den Prozess der Degeneration vorantreibt.

Black et al. veröffentlichten bereits zwei klinische Studien zum Einsatz von Fett-MSK bei chronischen Osteoarthritis der Hüft- und der Ellbogengelenke beim Hund mit sehr vielversprechenden Ergebnissen (Black et al. 2007; Black et al. 2008). Hierbei muss jedoch erwähnt werden, dass die Gruppe in beiden Studien lediglich die durch einen Verdau mit Kollagenase und Hyaluronidase gewonnene und anschließend aufgereinigte Zellsuspension in das Gelenk applizierte. Diese durch das Zerkleinern und den enzymatischen Verdau von Fettgewebe gewonnene Zellpopulation wird allgemein mit dem Terminus „stromal vascular fraction“ (SVF) bezeichnet und enthält ein noch heterogenes Zellgemisch, welches eine Mischung aus Fibroblasten, Perizyten, Endothelzellen, zirkulierenden Blutzellen und Fett-MSK darstellt (Zuk et al. 2002). Die Gruppe ging dabei davon aus, dass in Analogie zu humanmedizinischen Studien, die SVF des Hundes bis zu 30% aus Fett-MSK besteht. Eine Kultivierung und/oder eingehende Charakterisierung bezüglich der Differenzierungsfähigkeit, der Expression typischer MSC-Marker und der Homogenität der Zellpopulation blieb

daher aus. Dennoch beobachteten die Forscher in der doppelt-blind durchgeführten randomisierten und Placebo-kontrollierten Studie zur Osteoarthritis des Hüftgelenks eine signifikante Verbesserung der Lahmheit, wie auch der Schmerzhaftigkeit bei Manipulation und der Beweglichkeit des Gelenks bei allen 18 untersuchten Hunden (Black et al. 2007). Ähnliches gilt für die zweite Studie zum Einsatz bei Osteoarthritis des Ellbogengelenks (Black et al. 2008). Fraglich bleibt jedoch, ob die beobachteten positiven Effekte auf die durch die MSC sezernierten Zytokine, ihren direkten Beitrag an neu regeneriertem Knorpel oder aber einem synergistischen Effekt aus beiden Komponenten zurückzuführen ist. Kang et al. zeigten, dass canine Fett-MSC in Co-Kultur mit Leukozyten über die Sekretion von transforming growth factor beta (TGF β) und Prostaglandin E2 eindeutig immunmodulatorische Eigenschaften besitzen. Diese Faktoren verhindern die Proliferation von Leukozyten und hemmen die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen (Kang et al. 2008). Somit könnte die von Black et al. beobachteten Effekte auch allein auf diese Zytokin-Produktion zurückzuführen sein. In anderen Spezies konnte jedoch nachgewiesen werden, dass MSC auch aktiv an der Knorpelregeneration beteiligt sein können. So zeigte eine Studie an Kaninchen, dass die Injektion von aufgereinigten mononukleären Zellen aus dem Knochenmark, zur deutlich verbesserten Regeneration eines künstlich hergestellten Knorpeldefektes führte (Chang et al. 2008). Gegenüber den Kontrollgruppen kam es hier zur Bildung von deutlich mehr und höherwertigem neuen Knorpelgewebe, was eine direkte Beteiligung der MSC an dem regenerierten Gewebe zunächst wahrscheinlich erscheinen ließ. Ebenso ist es jedoch denkbar, dass die sezernierten Zytokine die Proliferation und Regeneration lokaler Chondroblasten positiv beeinflusste. Die Frage lässt sich letztlich nur über eine entsprechende Markierung implantierter MSC mit anschließendem *in vivo* Nachweis beantworten. Einen solchen Versuch unternahm Murphy et al. (2003). Die Gruppe konnte in einem Ziegenmodell zur Osteoarthritis des Kniegelenks GFP-markierte KM-MSC vor allem im teilweise regenerierten Meniskus, in der Synovia und den synovialen Membranen, nicht jedoch im Gelenkknorpel nachweisen. Dennoch zeigten KM-MSC behandelte Tiere zumindest im Frühstadium der experimentell induzierten Osteoarthritis deutlich weniger Entzündungsanzeichen und eine Regeneration des zerstörten Meniskus konnte beobachtet werden (Murphy et al.

2003). Eine Studie zur Gonarthrose an Minipigs, bei welcher nur Gelenkknorpeldefekte erzeugt und der Meniskus intakt gelassen wurden, konnte demgegenüber jedoch die Integration von vorkultivierten Fluoreszenz-markierten KM- MSC nach Injektion ins osteoarthritische Gelenk nachweisen (Lee et al. 2007). Auch in dieser Studie zeigte sich eine im Vergleich zu den Kontrollgruppen deutlich verbesserte Knorpelregeneration durch die Injektion von KM- MSC. Zu einem ähnlichen Ergebnis kommt auch eine Studie an Eseln, die die Integration von GFP-markierten KM- MSC selbst in tieferliegende Knorpelregionen nachweisen konnten (Mokbel et al. 2011). Auch hier zeigte die MSC-behandelte Gruppe einen deutlich protrahierten Verlauf bei der Entwicklung der Osteoarthritis im Vergleich zu den Kontrollen.

Insgesamt mehren sich die Hinweise, dass die beobachteten Effekte intraartikulärer Injektionen von MSC synergistischer Natur sind und sowohl auf die Differenzierbarkeit in Chondroblasten als auch auf die Zytokin-Produktion der MSC zurückzuführen sind. Es bleibt jedoch die Frage offen, ob es für den therapeutischen Erfolg eine Rolle spielt, welchem Gewebe die applizierten MSC entstammen.

4.2 Einsatz bei der Frakturheilung und Knochenregeneration

Der Einsatz von MSC bei der Knochenheilung ist besonders bei großen oder schlechtheilenden Knochendefekten denkbar. Solche Defekte kommen in der Tiermedizin zum einen nach Unfällen im Rahmen von Frakturen mit großen Knochenverlusten oder großflächigen Knochentrümmerfrakturen vor sowie nach der chirurgischen Entfernung von Knochtumoren und Knochenzysten. Darüber hinaus treten größere Knochendefekte bei der verspäteten oder fehlenden Frakturheilung auf, wie sie beispielsweise nach verspäteter oder fehlerhafter Frakturversorgung oder nach weitreichenden Ostitiden und Nekrosen vorkommen (Harasen 2011). Eine besonders große chirurgische Herausforderung stellen Defekte sogenannter „kritischer Größe“ dar („critical size defect“). Bei diesen Defekten ist nicht zu erwarten, dass eine vollständige Heilung innerhalb der restlichen für das Tier zu erwartenden Lebenszeit auftritt (Vertenten et al. 2010).

LITERATURÜBERSICHT

Für eine zügige Knochenheilung ist neben einer ausreichenden Vaskularisierung ein möglichst intensiver Kontakt der Knochenenden notwendig, um das Zusammenwachsen der Osteone beider Enden zu fördern. Fehlt ein solcher Kontakt, so bleibt die spontane Heilung häufig aus. Aus diesem Grunde bedient man sich in der Regel Transplantaten um bestehende Lücken aufzufüllen und vorübergehend zu überbrücken (Vertenten et al. 2010). Dabei wünscht man sich von einem Transplantat drei grundlegende Eigenschaften: Zum Einen das Einbringen osteogener Zellen selbst (Osteogenese), wie es bisher vor allem über die Spongiosatransplantate erreicht wurde, zum Zweiten die Stimulation des Einwanderns von Osteoblasten aus dem umliegenden Gewebe (Osteoinduktion) und die Bereitstellung einer Matrix, welche als Gerüst für den sich neubildenden Knochen dient (Osteokonduktion) (Kraus et al. 2006). Als Goldstandard gelten in der Tiermedizin derzeit noch immer Transplantate aus autologer Spongiosa, da sie durch die in ihnen enthaltenden Osteoblasten und mesenchymalen Vorläufer hervorragende osteogene und osteoinduktive Eigenschaften besitzen. Die mangelnde Osteokonduktion versucht man dabei teilweise durch das Zusetzen von autologer Corticalis zu kompensieren. Die Gewinnung erfolgt dabei in der Regel aus dem dorsalen Darmbeinkamm, der proximalen Tibia oder dem proximalen Femur (Harasen 2011). Damit macht die Gewinnung der Spongiosa neben der Frakturbehandlung einen weiteren chirurgischen Eingriff notwendig, welcher mit zusätzlichen Schmerzen für das Tier verbunden ist. Limitierend ist darüber hinaus häufig die Menge zu gewinnender Spongiosa, insbesondere wenn es sich um sehr kleine oder sehr alte Patienten handelt. Dies macht den Einsatz allogener und xenogener Transplantate notwendig, die mittlerweile auch für den tiermedizinische Bereich kommerziell angeboten werden. Es handelt sich dabei um allogene demineralisierte Knochenmatrix mit Spongiosabrustücken (Osteoallograft[®], Fa. Veterinary Transplant Services, Inc., Kent, Washington, USA) sowie um synthetischen Biomaterialien (Consil[®], Fa. Nutramax Laboratories, Edgewood, Maryland, USA; Cerasorb[®], Fa. Curasan AG, Kleinostheim, Deutschland), welche häufig auch in Kombination mit autologer Spongiosa eingesetzt werden (Vertenten et al. 2010). Gemeinsam ist den meisten jedoch, dass die osteokonduktiven Eigenschaften für die schnelle Überbrückung großer Defekte oft mangelhaft sind. Es

LITERATURÜBERSICHT

wurden daher experimentell eine Reihe weiterer Knochenersatzstoffe ausgetestet. Als natürliche Knochenersatzstoffe kommen dabei Produkte aus entproteinisierten Rinderknochen (Bio-Oss[®], Orthoss[®], Fa. Geistlich, Wolhusen, Schweiz) in Frage. Darüber hinaus existiert eine Vielzahl synthetischer Ersatzstoffe in Form von Keramiken, Keramik-Kollagen-Gemischen, Hydroxyapatit-Werkstoffen und resorbierbaren Polymeren, welche als Schwämme, Mikrofasern, Folien, poröse Zylinder und Membranen zusammen mit Titanimplantaten experimentell zu guten Ergebnissen bei der Knochenheilung führten (Berglundh et al. 1997; Hoffer et al. 2008). Da diese Ersatzstoffe selbst zwar eine gute Osteokonduktion aber wenig osteoinduktive und keine osteogenen Eigenschaften besitzen, war es ein logischer Schritt diese Eigenschaften durch die präimplantatorische Besiedlung mit Zellen zu verbessern. Mesenchymale Stammzellen boten sich hierbei als ideale Kandidaten an, da sie neben ihrer osteogenen Eigenschaft als natürliche Osteoblastenvorläufer über die von ihnen sezernierten Zytokine und Wachstumsfaktoren hervorragende osteoinduktive Eigenschaften besitzen und dadurch die Ersatzstoffe in idealer Weise ergänzen. Derartige Transplantat-MSC-Kombinationen wurden experimentell auch bereits am Hund getestet.

Bruder et al. testeten ein mit vorkultivierten, autologen KM-MSC beladenes Transplantat in einem experimentell hergestellten Knochendefekt von kritischer Größe beim Hund und konnten eine nahezu vollständige Frakturheilung nachweisen, während der Verschluss bei den Kontrollgruppen ohne bzw. mit zellfreiem Implantat vollständig aus- oder unzureichend blieb (Bruder et al. 1998). Sie verwendeten dabei ein poröses Keramikimplantat aus Hydroxyapatit (65%) und β -Tricalcium-Phosphat (35%), welches sich im Rahmen des Experimentes jedoch als suboptimal erwies, da es dazu neigte, brüchig zu werden und vom Körper nicht schnell genug resorbiert werden konnte. Dennoch konnten sie zeigen, dass das MSC beladene Implantat zügig von neuem Knochengewebe durchsetzt wurde und sich ausgiebig Kallus um das Implantat bildete, welcher den gesetzten Defekt schnell vollständig überbrückte. Demgegenüber wuchsen die Zellen und Gefäße in den zellfreien Implantaten nur langsam aus den Knochenenden in das Implantat ein und eine Kallusbildung blieb vollständig aus. Dies zeigt, dass MSC in der Lage sind, die Schwächen osteokonduktiver Werkstoffe aufzufangen und eine zügige Knochenheilung auch bei

großen Defekten herbeizuführen. Arinze et al. (2003) zeigten in einem Wiederholungsversuch darüber hinaus, dass aufgrund der nicht-immunogenen Eigenschaften der MSC, die gleichen Effekte mit Transplantaten erreicht werden, die mit allogenen KM-MSCs beladen wurden, ohne dass es Anzeichen einer Entzündung oder Transplantatabstoßung gibt (Arinze et al. 2003). Dies eröffnet weitreichendere Möglichkeiten, da dem Patienten nicht zeitgleich Knochenmark entnommen werden muss und macht aufgrund der Vermehrbarkeit und der Kryokonservierbarkeit eine Vorratslagerung von MSC für therapeutische Zwecke denkbar. Noch weniger invasiv wäre die Gewinnung und Verwendung von MSC aus dem Fettgewebe. Ob diese allerdings das gleiche osteogene und osteoinduktive Potential besitzen wie die KM-MSCs, die ohnehin die natürlichen Osteoblasten-Vorläufer darstellen, erscheint zunächst fraglich. Li et al. (2007) konnten in ihrer Studie zur Verwendung von caninen Fett-MSCs in einem Defekt kritischer Größe der Ulna nachweisen, dass das osteogene und osteoinduktive Potential der Fett-MSCs dem der KM-MSCs *in vivo* unterlegen ist (Li et al. 2007). Zwar verwendete die Gruppe im Gegensatz zu Bruder et al. ein reines β -Tricalciumphosphat-Transplantat in granulärer statt in Zylinder-Form, jedoch zeigten die Ergebnisse bis zur 16. Woche post Transplantation keinen nennenswerten Unterschied zwischen den besiedelten und nicht besiedelten Transplantaten. Die Gruppe unternahm daraufhin Versuche, die osteogenen und osteoinduktiven Eigenschaften der Fett-MSCs zu verbessern, indem sie die Zellen zum einen osteogen vordifferenzierte und zum anderen mit dem BMP-2 Gen, einem wichtigen Wachstumsfaktor der Osteogenese, transduzierte. Beide Ansätze trugen zur signifikanten Verbesserung der Frakturheilung bei, wobei die BMP-2 Gen-modifizierten Fett-MSCs das beste Ergebnis erzielten. Dennoch war auch hier das Endergebnis nicht vergleichbar mit den KM-MSCs.

Generell erscheint der Einsatz von MSC zur Knochenregeneration verheißungsvoll, jedoch zeigen die vorgestellten Versuche auch die Unterschiede zwischen KM-MSCs und Fett-MSCs und damit die Notwendigkeit des Vergleichs der beiden Zellpopulationen.

H. MATERIAL UND METHODEN

1. PROBENGWINNUNG

1.1 Gewinnung adulter mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark

Zur Gewinnung von Knochenmark dienten Femurköpfe sowie Wirbelkörperbruchstücke von Hunden, welche an der Klinik für Kleintiere, Abteilung Chirurgie, des Fachbereiches Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Operation vorgestellt wurden. Es handelte sich hierbei um Patienten, denen aufgrund einer degenerativen oder traumatischen Erkrankung der Femurkopf reseziert werden musste bzw. bei denen aufgrund eines Bandscheibenvorfalles eine Hemilaminektomie vorgenommen wurde. Patienten mit Verdacht auf oder nachgewiesener tumoröser Erkrankung sowie Morbus Legg-Calve-Perthes wurden von der Gewinnung ausgeschlossen.

Insgesamt wurden aus Femurköpfen und Wirbelbruchstücken von insgesamt 29 Hunden im Alter von 0,5 - 9 Jahren ($\bar{\text{Ø}} = 3,5$ Jahre) Stammzellen isoliert. Aufgrund unterschiedlicher initial zu isolierender Mengen an MSC und unterschiedlicher Vermehrbarkeit, konnten jedoch nur 13 Proben für Versuche selbst herangezogen werden.

Die Femurköpfe und Wirbelfragmente wurden direkt nach der Entnahme zunächst in einem sterilen Gefäß mit 30 ml gekühltem, sterilen Phosphatpuffer (Phosphate buffered saline = PBS)(PAA) überführt und bis zu ihrer weiteren Verarbeitung, die spätestens 24 Stunden nach Entnahme erfolgte, bei 4°C aufbewahrt. Zur Isolierung der MSC wurde die Probe unter eine Sterilbank verbracht und das im Knochen vorhandene Mark mittels einer 19G Kanüle und insgesamt 30-50ml PBS aus dem Knochen heraus gespült. Die Knochenmark-haltige Suspension wurde anschließend zur Entfernung von Knochensplintern und Blutkoageln durch einen 70 µm Filter in ein 50ml Falcon-Tube überführt. Es folgte eine Zentrifugation bei 200g für 15 min. Anschließend wurde der Überstand abpipettiert und das Pellet je nach Größe in 3-20ml alpha-MEM-Medium (αMEM) (PAA) resuspendiert. Zur Separation kernhaltiger Zellen aus dem Zellgemisch wurde nun in einem 15 bzw. 50ml Falcon-Tube eine

äquivalente Menge Ficoll-Separationslösung (LSM1077, PAA) vorgelegt und die Zellsuspension vorsichtig darüber geschichtet. Die anschließende Zentrifugation bei 1200g für 20min bei deaktivierter Bremsfunktion führte zu einer Auftrennung der in der Suspension enthaltenen Zellen im Sinne einer Dichtegradientenzentrifugation. Dabei sammeln sich Erythrozyten am Boden des Tubes, gefolgt von einer Ficoll-haltigen Phase. Darauf folgt eine Interphase, welche die kernhaltigen Zellen beinhaltet und schließlich ein Thrombozyten-haltiger Überstand. Zur Gewinnung der kernhaltigen Zellen wurde nun nach vorsichtigem Entfernen des Überstandes die Interphase abgesaugt und zum Waschen in 8-30ml frischem Medium resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 200g für 8min wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet für einen weiteren Waschschrift in 10ml α MEM gelöst. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 120g für 8 min wurde das Pellet nun in 1-2 ml Kulturmedium (α MEM, 20% FBS Gold, 2% Penicillin/Streptomycin) resuspendiert und eine kleine Menge zur Bestimmung der Zellzahl in eine Neubauer improved-Zählkammer überführt. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen mit einer Zahl von mindestens 200.000 Zellen/cm² in ein entsprechend großes Zellkulturgefäß ausplattiert. Anschließend wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO₂ in einem CO₂-Brutschrank bei maximaler Luftfeuchte inkubiert. Der erste Medienwechsel erfolgte 3-5 Tage nach dem Ausplattieren. Die folgenden Medienwechsel erfolgten jeden 2. - 3. Tag mit vorherigem Waschen mit PBS, um nicht adhärenente Zellen der hämatopoetischen Linie zu entfernen.

1.2 Gewinnung adulter mesenchymaler Stammzellen aus dem Fettgewebe

Zur Isolierung von adulten mesenchymalen Stammzellen aus dem Fettgewebe diente subkutanes oder intraabdominales Fettgewebe, das im Rahmen von Routine-Operationen, vornehmlich Kastrationen, an der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie des hiesigen Fachbereiches entnommen wurde. Einige Proben wurden darüber hinaus durch die Klinik für Kleintiere, Abteilung Chirurgie im Rahmen von Standard Weichteil-OPs gewonnen.

Insgesamt wurde Fettgewebe von 14 verschiedenen Tieren im Alter von 0,5-11 Jahren ($\bar{\varnothing}$ = 5,5 Jahre) gewonnen. Das Fettgewebe wurde nach der Gewinnung

MATERIAL UND METHODEN

zunächst in steriler PBS-Lösung bei 4°C maximal 24 Stunden bis zur Isolierung der MSC gelagert. Anschließend wurde das Fettgewebe unter die Sterilbank verbracht und im Mengenverhältnis 1:2 mit frischer PBS Lösung gewaschen. Es folgte eine Zentrifugation bei 260g für 5min. Anschließend wurde das Fettgewebe in eine sterile Petrischale überführt und mittels Skalpell so stark wie möglich zerkleinert. Das zerkleinerte Fettgewebe wurde in ein neues 15ml Falcon überführt und erneut im Volumen-Verhältnis von mindestens 1:2 mit PBS-Puffer überschichtet. Nach intensivem Schütteln der Probe wurde diese erneut bei 260g für 5min zentrifugiert. Ein eventuell vorhandenes Pellet (bestehend vornehmlich aus Erythrozyten und anderen Blutzellen) sowie das gesamte PBS wurde im Anschluss abgesaugt und gegen neue PBS-Lösung ausgetauscht. Im Anschluss wurde der Zentrifugationsschritt noch einmal wiederholt. Dies diente dem Auswaschen von potentiell kontaminierenden Blutzellen aus den das Fettgewebe durchziehenden Gefäßen. Nach dem Absaugen wurde das zerkleinerte Fettgewebe im Volumenverhältnis von ca. 1:1 mit einer Digestionslösung bestehend aus PBS mit 1mg/ml Collagenase I (Biochrom AG) und 10mg/ml Bovinem Serum Albumin (BSA) (PAA) gemischt. Die Mischung wurde nun unter permanentem Rütteln auf einem Labor-Rüttler für 30-60min bei 37°C im Wärmeschrank verdaut bis die Lösung weitgehend homogene Konsistenz angenommen hatte. Nach Zentrifugation bei 300g für 5min bestand die Lösung nun aus einem Zellpellet und einem milchigen Überstand und darüber schwimmendem Fettgewebe und kollagenen Fasern. Das die Stammzellen enthaltende Pellet wurde vorsichtig aufsuspendiert, mit der Pipette abgezogen und über einen 70µm Filter (BD) in ein neues 50ml Falcon-Tube filtriert. Das Pellet wurde mit warmem PBS auf 15ml aufgefüllt und bei 260g für 5min zentrifugiert. Der Überstand wurde dann abpipettiert, das Pellet in neuem PBS resuspendiert und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Nun wurde das Pellet in Kultivierungsmedium bestehend aus Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) (PAA) mit 10% FBS Gold und 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung gelöst und die Zellen nach Zellzahlbestimmung mittels Neubauer improved Zählkammer mit mind. 250.000 Zellen/cm² ausplattiert. Anschließend wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO₂ in einem CO₂-Brutschrank bei maximaler Luftfeuchte inkubiert. Der erste

Medienwechsel erfolgte am darauf folgenden Tag, die weiteren Medienwechsel erfolgten alle 2-3 Tage.

2. ZELLKULTUR

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerk-Bank der Stufe II durchgeführt.

2.1 Passagieren

Durch stetige Zellteilung nimmt in einer adhärennten Zellkultur die zur Verfügung stehende Fläche ab. Dies führt zu einer Kontaktinhibition zur Behinderung des Wachstums der Zellen und damit zu einer Abnahme der Proliferation. Hinzu kommt die Tatsache, dass MSCs bei hoher Dichte dazu neigen, spontan zu differenzieren und damit ihre Multipotenz zu verlieren. Eine Passagierung, d.h. ein Ablösen der Zellen vom Kulturgefäß und ein Umsetzen in ein neues größeres Kulturgefäß bzw. ein Aufsplitten auf mehrere Kulturgefäße ist daher in regelmäßigen Abständen nötig. Dies wurde daher immer dann durchgeführt, wenn der Boden des Kulturgefäßes zu 80% mit Zellen bewachsen war (= 80% Konfluenz).

Durchführung

Dazu wurde zuerst das Medium abgesaugt und die Schale für 1-2 min mit PBS-Lösung gespült, um tote und nicht adhärennte Zellen zu entfernen. Nach Absaugen des PBS wurden je 25 cm² Zellkulturfläche 2ml Accutase (PAA) zugegeben und das Gefäß für 2-8 min in den Brutschrank zurückgestellt. Ein leichtes Beklopfen der Kulturflasche diente der mechanischen Ablösung sich bereits lösender Zellen. Sobald die Zellen mikroskopisch sichtbar abgelöst waren, wurden sie in ein Falcon-Röhrchen mit mindestens der doppelten Menge an serumhaltigen, vorgewärmten Kulturmedium überführt. Das serumhaltige Kulturmedium diente hierbei der Inaktivierung der Accutase-Enzymlyösung. Es folgte eine Zentrifugation bei 120g für 5 min, wonach der Überstand abgesaugt und das entstandene Zellpellet mit 1 ml frischem Medium resuspendiert wurde. Nach Bestimmung der Zellzahl pro ml Medium wurden die Zellen dann mit einer Dichte von 2000 Zellen/cm² (Bestimmung der Populationsverdopplungszeit) bzw. mit 5000 Zellen/cm² zur weiteren Vermehrung

ausplattiert. Die erste Passage nach der Isolierung der Zellen wurde mit P1 benannt. Alle weiteren Passagen wurden analog in Folge durchgehend nummeriert (P2, P3, etc.)

2.2 Bestimmung der Populationsverdopplungszeit

Die Populationsverdopplungszeit (PVZ) gibt das Zeitintervall an, in dem sich in der logarithmischen Wachstumsphase die Zellpopulation verdoppelt. Sie ist ein Maß für die Proliferationsgeschwindigkeit einer Zellpopulation und damit eine wichtige Kenngröße für die Zellkultur, da sie die Vermehrbarkeit und die Passagierhäufigkeit für die jeweilige Zellpopulation bestimmt. Da die primäre Frage war, wie schnell sich frisch gewonnene MSC aus den beiden verschiedenen Geweben vermehren und damit eine für therapeutische Zwecke ausreichende Zellzahl erreichen, wurden hierfür Zellen der Passage 1 genutzt.

Durchführung

Zellen der Passage 1 wurden nach ihrer Ablösung mit einer Dichte von 2000 Zellen/cm² in 24-Well-Schalen ausplattiert und weiterkultiviert. Nach einer Erholungszeit von 2 Tagen, die der Anheftung und Erholung der Zellen nach dem Ablösung dienen sollte, wurden dann täglich die Zellen aus je 3 Wells abgelöst und die Zellzahl mittels Neubauer improved Zählkammer bestimmt. Die Zellzahl wurde anschließend logarithmiert und gegen die Zeit halblogarithmisch für jedes Tier in einen Graphen aufgetragen. Durch die entstehende Punktwolke wurde eine Regressionsgerade gelegt und die PVZ über die Steigung der Regressionsgeraden nach folgender Gleichung bestimmt:

$$\text{PVZ (in Stunden)} = \log_{10} 2 / m$$

wobei m = Steigung der Regressionsgeraden (Geradengleichung: $y = m \times x + b$)

Die statistische Auswertung des ermittelten Unterschiedes zwischen KM-MSK und Fett-MSK erfolgte mittels BDMP Statistical Software (Firma Statistical Solutions Ltd., Cork, Irland).

2.3 Kryokonservierung

Aufgrund des unregelmäßigen Eingangs von Proben wurden die Zellen nach Passage 1 zur Akquirierung eines gewissen Probenumfangs kryokonserviert, um später zeitgleich für die eigentlichen Versuch aufgetaut und eingesetzt zu werden (Ausnahme: Populationsverdopplung). Zunächst wurden die Zellen hierzu gewaschen und abgelöst wie unter Abschnitt 2.1 (Passagieren) beschrieben. Nach Bestimmung der Zellzahl und einer weiteren Zentrifugation bei 120g für 5 min, wurde das Pellet in 1-2 ml Freezing Medium resuspendiert. Das Freezing Medium setzte sich je nach Zelltyp aus α MEM (KM-MSC) oder DMEM (Fett-MSC) mit 30% FBS und 5% DMSO (Sigma) zusammen. Die Zellen wurden mit einer Dichte von $1-2 \times 10^6$ Zellen/ml in 1ml Kryoröhrchen (Greiner-Bio One) eingefroren. Hierzu wurden sie zunächst nach Zugabe des kalten Freezing Mediums für 15 min bei 7°C im Kühlschrank inkubiert, um anschließend in ein spezielles, mit Isopropanol gefülltes Freezing-Gefäß („Mr. Frosty“, Nalgene®) in den Tiefkühlschrank (-20°C) umgesetzt zu werden. Dieses spezielle Gefäß gewährleistete einen regelmäßigen und langsamen Einfrierprozess von -1°C/min. Nach 1-2 Stunden bei -20°C wurde das Gefäß samt Röhrchen dann über Nacht in einen -80°C Tiefkühlschrank gestellt und die Röhrchen dann am folgenden Tag in einen Flüssigstickstoff-Container zur endgültigen Lagerung bei -196°C überführt.

2.4 Das Auftauen von Zellen

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen aus dem Stickstoff-Container zunächst in ein 37°C warmes Wasserbad verbracht, um den Inhalt möglichst zügig aufzutauen. Sobald der Inhalt des Röhrchens vollständig aufgetaut war, wurde der noch kühlen Zellsuspension tropfenweise 1ml des jeweiligen Kultivierungsmediums zimmerwarm zugegeben. Anschließend wurde vorsichtig gemischt und die Suspension langsam in ein Falcon-Tube mit 8ml Kulturmedium überführt. Es folgte eine Zentrifugation für 5min bei 120g, in deren Anschluss der Überstand abpipettiert und das Pellet in 1ml frischem, gewärmten Kulturmedium resuspendiert wurde. Nach der Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen dann in der für den jeweiligen Versuch benötigten Dichte ausplattiert.

3. WUNDHEILUNGS-ASSAY (WOUND-HEALING CELL MIGRATION ASSAY)

Der Wundheilungs-Assay ist nach Liang et al. (2007) (hier auch als ‚*In vitro scratch assay*‘ bezeichnet) eine einfache Methode um das Migrationsverhalten von Zellen *in vitro* zu evaluieren. Zeitgleich ahmt der Assay in gewissem Umfang die Wundheilung *in vivo* nach und kann damit wichtige Hinweise für den therapeutischen Einsatz der Zellen geben.

Durchführung

Die Zellen wurden hierfür mit Passage 3 mit einer Dichte von 2×10^4 Zellen/cm² in 35mm Zellkulturschalen ausplattiert und bis zu 80-90%iger Konfluenz weiterkultiviert. War die gewünschte Dichte erreicht, wurde mittels einer 1000µl Pipettenspitze ein Kratzer (Scratch) in den Zellrasen gezogen (Abb. 1A). Die dadurch abgetragenen Zellen wurden mittels zweimaligen Waschens mit PBS-Puffer entfernt und frisches Medium zugegeben. Die Zellkulturschale wurde anschließend in ein Live cell imaging System (PM S1 Inkubator in Verbindung mit Axio Observer Z1, Zeiss, Jena) eingebracht und unter den bekannten Bedingungen (37°C, 5% CO₂) weiterkultiviert. Die an das System angeschlossene Kamera wurde so eingestellt, dass sie alle 5 min ein Bild des Scratches machte (Abb. 1A,B). Der sich sukzessive schließende Scratch wurde über 24-48 Stunden (je nach „Heilungszeit“) beobachtet und anschließend mittels spezieller Software (Image J, NIH, USA) ausgewertet. Der Verschluss des Scratches wurde halblogarithmisch gegen die Zeit in einen Graphen aufgetragen und wiederum anhand der Geradensteigung der Regressionsgeraden die Geschwindigkeit des Verschlusses ermittelt. Dazu diente die gleiche Formel wie bei der PVZ:

$t = \log_{10} 2/m$ (mit m = Steigung der Geraden; Geradengleichung $y=mx+b$)

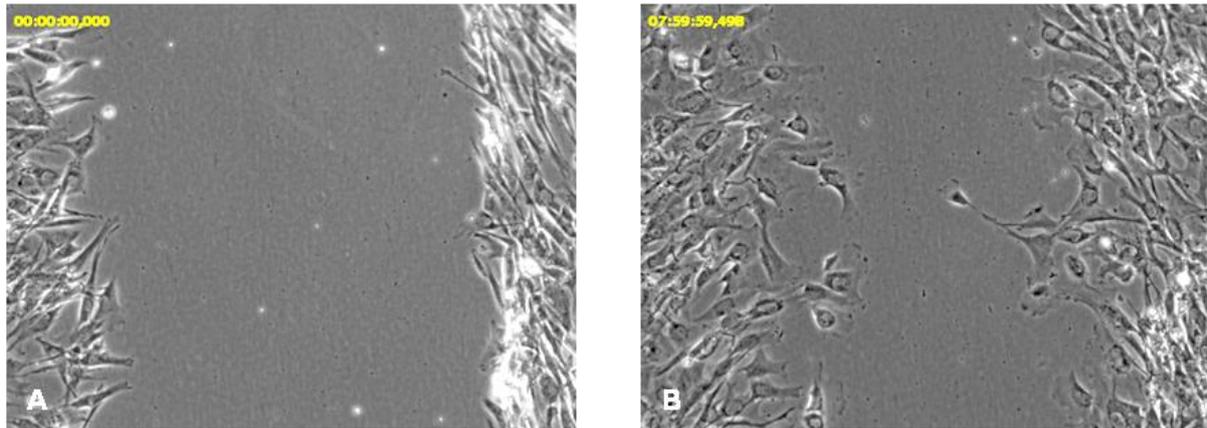


Abb. 1 Wundheilungsassay

(A) Scratch zum Zeitpunkt 0 Stunden; (B) Scratch nach 8 Stunden

4. DURCHFLUSSZYTOMETRIE (FACS)

Der Vorteil der Durchflusszytometrie ist die Tatsache, dass sie die Möglichkeit bietet, einzelne Zellen in großer Zahl objektiv hinsichtlich ihrer Größe und Granularität zu analysieren und damit eine Zellpopulation zu charakterisieren. Darüber hinaus bietet das Durchflusszytometer die Möglichkeit, Fluoreszenzsignale auf einzelnen Zellen zu messen. Über die Verwendung von Fluorophor-markierten Antikörpern, lassen sich so auch Zellen hinsichtlich der Expression bestimmter Oberflächenproteine analysieren. Die Zellsuspension wird dabei durch eine Pipette gepresst, die von einer schneller fließenden Mantelflüssigkeit umgeben ist. Durch einen Prozess, der hydrodynamische Fokussierung genannt wird, kommt es dabei zu einer perlschnurartigen Aufreihung der Zellen in der Flüssigkeit. Dieser Einzel-Zellstrom passiert dann einen Laserstrahl, der in Abhängigkeit von der Größe und Granularität der Zelle gestreut wird. Das Vorwärts-Streulicht (forward scattered light, FSC) wird vor allem von der Größe der Zelle beeinflusst, während das Seitwärts-Streulicht (sideward scattered light, SSC) vor allem durch Partikel im Zellinneren, also ihre Granularität bestimmt wird. Beide Größen werden durch entsprechende Detektoren aufgenommen und gespeichert. Je nach Ausstattung des Durchflusszytometrie-Gerätes können noch weitere Detektoren für verschiedene Fluorophore nachgeschaltet sein. Mit ihnen ist es durch eine Fluoreszenzmarkierung von Oberflächenantigenen mittels spezifischer Antikörper möglich, Aussagen über die Antigen-Expression der untersuchten Zellen zu machen.

Durchführung

Zellen von je fünf verschiedenen Tieren wurden je Herkunftsort untersucht. Zunächst wurden die Zellen (P1 oder P2) gewaschen und mittels Accutase abgelöst. Nach der Zentrifugation bei 120g für 5min wurde das Pellet dann in 500-1000µl Kulturmedium gelöst, die Zellzahl bestimmt und auf Eis in einem Röhrchen ins Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Labor AG Prof. Bauerfeind transportiert. Hier wurden je 2×10^5 Zellen/ Well nach einem vorab festgelegten Belegungsplan in eine 96 Well-Platte pipettiert. Nach Zentrifugation in einer gekühlten Plattenzentrifuge (4°C) bei 400g für 5min wurde der Überstand entfernt und 50 µl des Erst-Antikörpers (Erst-AK) gegen den caninen CD90 bzw. der Isotypenkontrolle oder des Waschpuffers zu pipettiert und vorsichtig gemischt. Bei der sogenannten Isotypenkontrolle handelt es sich um einen Antikörper der gleichen Isogruppe (hier: IgG2b) des Erst-AK, der jedoch gegen ein unspezifisches Antigen gerichtet ist. Diese Kontrolle soll sicher stellen, dass die Bindung des eigentlichen Erst-Antikörpers spezifisch ist und die verwendete Immunglobulin-Isogruppe nicht unspezifische Antigene auf der Zelloberfläche bindet. Die Waschpuffer-Kontrolle dient als Kontrolle für den Zweit-Antikörper und stellt sicher, dass dieser nicht ohne vorherige Bindung des Erst-Antikörpers auf der Oberfläche binden kann. Nach dem Mischen wurde die Platte für 15min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und anschließend erneut wie oben zentrifugiert. Die Zellpellets wurden nun zwei Mal mit Waschpuffer gewaschen und anschließend wieder zentrifugiert. Danach wurde der mit dem Fluorophor R-Phycoerythrin-markierte Zweit-AK bzw. Waschpuffer zugegeben und 15 min im Dunkeln inkubiert. Nach weiteren zwei Waschschritten, wurde das Pellet in 50µl PBS Puffer gelöst und in ein spezielles FACS Röhrchen mit weiteren 150µl Puffer überführt. Anschließend erfolgte die Messung von mindestens 10.000 Zellen (Ereignissen)/ Probe im Durchflusszytometer FACScalibur™ (BD).

Die Analyse erfolgte mittels des Cell Quest Pro Programms (BD) und die anschließende Auswertung mit dem Programm FCS Express 2 (De Novo Software). Hierfür wurden zunächst Grenzwerte, sogenannte Gates, für die Zellen die tatsächlich in die Messung eingehen sollen, festgelegt. Dies ist nötig, da der Laserstrahl auch zerfallene Zellen, Detritus und Fremdpartikel im Medium mit misst. Es wurde für alle Proben anschließend das gleiche Gate verwendet. Für die

Darstellung von Größe und Granularität der Zellen wurde ein sog. zweidimensionaler Dot plot gewählt. Hierbei entspricht jede analysierte Zelle einem Punkt in einer 2-Achsen Darstellung von FSC (Größe) und SSC (Granularität) (Abb. 4). Für die Darstellung der Fluoreszenzmarkierung CD90-positiver Zellen diente ein Zwei-Farben-Histogramm, bei dem zwei Fluoreszenzkanäle gegeneinander aufgetragen werden. Die Grenzen (Gates) wurden anhand der Negativkontrollen (Isotypenkontrolle und Sekundär-AK-Kontrolle) gesetzt. CD90-positive Zellen wurden so durch eine Verschiebung von unten links (lower left) nach unten rechts (lower right) detektierbar, da der Fluoreszenzkanal, der R-Phycoerythrin detektiert auf der x-Achse dargestellt wurde (Abb. 7).

5. DIFFERENZIERUNGEN

5.1 Anlegen von Monolayer-Kulturen

Zur Differenzierung im Monolayer, also im zweidimensionalen Zellrasen, wurden aufgetaute Zellen der Passage 1 zunächst zwischenkultiviert und vermehrt. Anschließend wurden sie abgelöst und mit einer Dichte von ca. 2×10^4 Zellen/cm² in 24-Well-Platten ausplattiert. Die Platten wurden solange weiterkultiviert bis die Zellen zu ca. 70-80% (osteogene Differenzierung) bzw. 90-100 % konfluent (Hochdichte-Monolayer für die chondrogene Differenzierung) waren. Ab diesem Zeitpunkt wurde dann zu den als Positivkontrolle markierten Wells das jeweilige unter Kapitel 5.3 und 5.4 angegebene Differenzierungsmedium zugegeben und die Zellen über den angegebenen Zeitraum weiterkultiviert. Negativkontrollen erhielten über den gleichen Zeitraum das normale Kulturmedium.

5.2 Anlegen von Pelletkulturen

Zum Erstellen von dreidimensionalen Pelletkulturen wurden die nach dem Auftauen zwischenkultivierten Zellen mittels Accutase abgelöst und gezählt. Anschließend wurden jeweils $1,5 \times 10^5$ bis 2×10^5 Zellen in sterile 1,5 ml Eppendorf-Gefäße pipettiert und bei 120g für 5min zentrifugiert. Mittels steriler 14G Kanüle wurden 2-3 Löcher zur Belüftung in den Deckel des Eppendorf-Gefäßes gestochen und die

Zellen im Eppendorf-Gefäß über Nacht im Brutschrank kultiviert. Dabei bilden die Zellen über Nacht aus dem nicht aufsuspendierten Pellet ein solides dreidimensionales Pellet, das am nächsten Tag in Gruppen von 3-5 Pellets (chondrogene Differenzierung) oder einzeln (osteogene Differenzierung) in Wells eines 24-Wells umgesetzt werden können. Positivkontrollen erhielten ab diesem Tag das jeweilige Differenzierungsmedium während Negativkontrollen in normalem Kulturmedium weiterkultiviert wurden.

5.3 Chondrogene Differenzierung

Die chondrogene Differenzierung wurde für die histologischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen in Pelletkultur über 10 Tage und 23 Tage durchgeführt. Zusätzlich wurde für die molekularbiologischen Untersuchungen eine Hochdichte-Monolayer Kultur angelegt. Da die chondrogene Differenzierung spezifisch DMEM Low Glucose erfordert, wurden beide Zelltypen (KM- und Fett-MSK) im gleichen Medium kultiviert.

Zusammensetzung des Differenzierungsmediums

Komponente	Endkonzentration Differenzierungsmedium	Konzentration Stammlösung	Menge pro 50ml Medium (µl)
DMEM LG			45.970
FBS Gold	1%	100%	500
Pen/Strep	1%	100%	500
ITS	0,05x	100x	25
Ascorbinsäure	50µM	1mM	2500
Dexamethason	100nM	1mM	5
(TGFβ1)	10ng/ml	1µg/ml	500)

Der Medienansatz erfolgte immer für den Verbrauch einer Woche. TGFβ1 wurde dem Differenzierungsmedium aufgrund seiner kurzen Haltbarkeit in der

entsprechenden Konzentration immer erst beim Medienwechsel selbst zugesetzt. Die Medienwechsel erfolgten alle 2-3 Tage.

5.4 Osteogene Differenzierung

Die osteogene Differenzierung erfolgte mit einem Standardprotokoll in Anlehnung an Pittenger et al. (1999). Angepasst an die unterschiedlichen Basis-Kulturmedien wurden für KM-MSC und Fett-MSC jeweils eigene Differenzierungsmedien angelegt. Da die Monolayer-Kulturen in der osteogenen Differenzierung zur Ablösung von der Schale neigten, wurde zusätzlich die Differenzierung in Pelletkultur durchgeführt. Die Differenzierung im Monolayer wurden für den histologischen Nachweis mittels von Kossa über 21 Tage durchgeführt. Die Differenzierung in der Pelletkultur erfolgte über 14 Tage. Da eine intensivere Kalzifizierung für die Bearbeitung der elektronenmikroskopischen Proben weniger problematisch ist als für die lichtmikroskopischen Proben, wurde die Pelletkultur für die TEM-Proben über weitere 14 Tage auf insgesamt 28 Tage ausgedehnt. Hierbei wird eine weiterreichende Differenzierung und Kalzifizierung erreicht.

Zusammensetzung des Differenzierungsmediums

KM-MSC

Komponente	Endkonzentration Differenzierungsmedium	Konzentration Stammlösung	Menge pro 50ml Medium (µl)
αMEM			33.395
FBS Gold	20%	100%	10.000
Pen/Strep	2%	100%	1.000
β-Glycerolphosphat	10mM	100mM	5.000
Ascorbinsäure	60µM	5mM	600
Dexamethason	100nM	1mM	5

Fett-MSK

Komponente	Endkonzentration Differenzierungs- medium	Konzentration Stammlösung	Menge pro 50ml Medium (μ l)
DMEM LG			38.895
FBS Gold	10%	100%	5.000
Pen/Strep	1%	100%	500
β-Glycerolphosphat	10mM	100mM	5.000
Ascorbinsäure	60 μ M	5mM	600
Dexamethason	100nM	1mM	5

Das Medium wurde jede Woche neu angesetzt. Die Medienwechsel erfolgten alle 2-3 Tage.

5.5 Osteogene Differenzierung unter Zusatz von Calciumchlorid

Da die osteogene Differenzierung nach dem Standardprotokoll für humane MSC zu teilweise wechselhaften Ergebnissen führte, wurde zusätzlich eine osteogene Differenzierung unter Zusatz von Calciumchlorid (CaCl_2) durchgeführt. CaCl_2 soll die Aufnahme von anorganischem Phosphat sowie die Proliferation von Osteoblasten fördern (Sugimoto et al. 1994; Schmid et al. 1998). Die osteogene Differenzierung unter Ca^{2+} -Zusatz wurde in einer Pelletkultur durchgeführt, beide Zelltypen erhielten hier das gleiche Medium. Die Differenzierung erfolgte über 2 Wochen.

Zusammensetzung des Differenzierungsmediums

Komponente	Endkonzentration Differenzierungs- medium	Konzentration Stammlösung	Menge pro 50ml Medium (μ l)
DMEM LG			33.895
FBS Gold	10%	100%	5.000
Pen/Strep	1%	100%	500

β-Glycerolphosphat	10mM	100mM	5.000
Ascorbinsäure	60μM	5mM	600
Dexamethason	100nM	1mM	5
CaCl₂ Dihydrat	7,5mM*	5,9mM*	5000

* DMEM LG enthält bereits 1,6mM CaCl₂

Das Medium wurde jeweils für den Verbrauch einer Woche angesetzt. Die Medienwechsel erfolgten alle 2-3 Tage.

6. HISTOLOGIE

6.1 Fixation und Vorbereitung der Proben

Monolayer-Kulturen wurden nach Ende der Differenzierung zunächst mit 2x mit PBS gewaschen, um Reste von Differenzierungsmedium zu entfernen. Nach Transport unter den Abzug wurden die Zellen dann mit 4% Paraformaldehyd überschichtet, für 10min im Well fixiert und anschließend mit Aqua bidest gewaschen. Danach erfolgte direkt die jeweilige Färbung. Im Anschluss an die jeweilige Färbung wurden die Zellen mit Kaiser's Glycerin-Gelatine und Glasdeckgläschen eingedeckelt.

Pelletkulturen wurden nach der Differenzierung ebenfalls mit PBS gewaschen und anschließend von Hand für eine Paraffin-Einbettung vorbereitet. Dazu wurden sie zunächst einzeln in PCR-Tubes umgesetzt und mit 600μl 4%igem Paraformaldehyd (PFA) für 30 min fixiert. Anschließend wurde das PFA abpipettiert und jeweils wiederum für 30 min aufsteigende Konzentrationen von Alkohol zugegeben, um die Probe zu entwässern (50%, 70% und 90%iger Alkohol in Aqua bidest.). Nach der Inkubation in 100%igem Alkohol über 30min, folgte eine zweimalige Inkubation in Xylol für 20min. Anschließend wurde das Pellet mit einer Pipette vorsichtig in ein Bleiwännchen umgesetzt, zur Herstellung eines Paraffinblöckchens mit Paraffin übergossen und nach Erkalten ausgebettet.

Zur Herstellung von Paraffinschnitten für die histologischen Färbungen wurden die Blöckchen in ein Schlittenmikrotom eingespannt. Nach Anschnitt des Pellets wurden möglichst aus der Pelletmitte Schnitte von 4-6μm Dicke gefertigt, in einem ca. 50°C

warmen Wasserbad (Aqua bidest.) gestreckt und auf SuperFrost Plus Objektträger aufgezogen. Nach Trocknung der Schnitte über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank, wurden die Schnitte vor der Färbung entparaffiniert und rehydriert. Dazu wurden sie zunächst zweimal 10min in Xylol inkubiert und anschließend zur Rehydrierung für je 3min in absteigende Konzentrationen von vergälltem Alkohol getaucht (100%, 96%, 70% und 50%iger Alkohol). Vor Beginn der Färbung wurden die Schnitte dann noch einmal Aqua bidest. gewaschen. Am Ende der Färbung erfolgte ein Entwässern durch die gegenläufige Alkoholreihe und Xylol mit abschließender Eindeckung mit VitroGlud[®] und Glasdeckgläschen.

6.2 Häkalaun-Färbung

Der basische Farbstoff Häkalaun färbt Zellkerne und Kalk blau an.

Durchführung

- a) Färben in Häkalaun nach Mayer für 1 min (native Zellen) bzw. 5 min (Paraffinschnitte)
- b) spülen mit Leitungswasser 3 x 5 min („bläuen“)

6.3 Alcianblau-Färbung

Die Alcianblau-Färbung dient dem Nachweis von sauren und sulfatierten Mukopolysacchariden wie Hyaluronsäuren und Glycosaminoglycanen. Die Mukosubstanzen werden durch die Färbung leuchtend blau dargestellt. Zellkerne werden durch eine Gegenfärbung mit Kernechtrot hellrot angefärbt. Färbelösungen wurden auf die Zellen im Well direkt aufpipettiert, Paraffinschnitte wurden in der Küvette gefärbt.

Durchführung

- a) 30min Färben in 0,5% Alcianblau 8GX
- b) 5min Spülen mit Aqua dest.
- c) 5min Gegenfärbung mit frisch filtriertem Kernechtrot

- d) kurzes Spülen mit Aqua dest.
- e) Eindeckeln bzw. aufsteigende Alkoholreihe (Paraffinschnitte) und anschließendes Eindeckeln

6.4 von Kossa-Färbung

Die von Kossa-Färbung dient dem Nachweis einer mineralisierten Matrix. Hierbei wird das in der Matrix in Form von Carbonaten und Phosphaten gebundene unlösliche Calcium durch eine Behandlung mit Silbernitrat gegen Silberionen ausgetauscht. Diese werden durch 5%iges Natriumcarbonat zu elementarem Silber reduziert, welches braun oder schwarz erscheint.

Durchführung

- a) 5min Waschen mit Aqua bidest. (Entfernen von Ca^{2+} -Salzen aus Medium/PBS)
- b) 30min Inkubation in 5%iger Silbernitratlösung (Austausch von Calcium gegen Silberionen)
- c) gründliches Spülen in Aqua bidest. (2 x 3 min)
- d) 5min Inkubation in 5% Natriumcarbonat-Formaldehyd (Reduzieren)
- e) gründliches Spülen in Aqua bidest. (2 x 3 min)
- f) 30sek Inkubation in Farmers Reducer (Differenzieren)
- g) gründliches Spülen in Aqua bidest. (2 x 3 min)
- h) Gegenfärben mit Kernechtrot oder Hämalaun für 5 min
- i) gründliches Spülen in Aqua bidest. bis das Wasser klar ist
- j) Eindeckeln bzw. aufsteigende Alkoholreihe und anschließendes Eindeckeln

7. ELEKTRONENMIKROSKOPIE

7.1 Fixation und Einbettung der Proben

Für Untersuchungen mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wurden die Pelletkulturen aus der Differenzierung mit PBS gespült und anschließend für 2 Stunden in Yellow Fix-Lösung (2% Paraformaldehyd, 2% Glutaraldehyd, 0,02% Pikrinsäure in 0,1M Cacodylatpuffer) fixiert. Anschließend wurden die Proben mehrfach mit 0,1M Cacodylatpuffer gespült und mit 1%iger Osmiumsäure in Cacodylatpuffer für 3 Stunden bei 4°C nachfixiert. Nach wiederum mehrfachen Spülen der Proben mit 0,1M Cacodylatpuffer wurden die Proben durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und in den Kunstharz Epon 812 eingebettet. Die Polymerisation fand im Wärmeschrank über 16h bei 60°C statt.

7.2 Anfertigen der Schnitte und Vorbereitung für die TEM

An einem Ultramikrotom wurden zunächst Semidünnschnitte von ca. 500nm Dicke angefertigt, um die Mitte des Pellets aufzufinden. War die Mitte des Pellets erreicht, wurden Ultradünnschnitte von ca. 70nm Dicke gefertigt, auf Kupfernetze aufgezogen und mittels 1% Uranylacetat und 1% Bleicitrat kontrastiert. Die Untersuchung erfolgte am Elektronenmikroskop EM 109 (Carl Zeiss, Jena).

8. MOLEKULARBIOLOGIE

8.1 Gewinnung und Aufbewahrung der Proben

Die Gewinnung und Lagerung der Proben für die RNA-Extraktion erfolgte mit TRI Reagent® (Sigma), einer Lösung, die auf Basis der Methode nach Chomczynski et al. (1987) der Ein-Schritt-Extraktion der Gesamt-RNA dient. Die Lösung führt zur Lyse der Zellmembran, inhibiert zelleigene RNAsen und erhält die Integrität der RNA bis zu ihrer Isolierung.

Durchführung

Die Zellen wurden nach dem Waschen entweder vor Versuchsbeginn (Negativkontrollen) oder nach Beendigung der Differenzierung (Positivkontrollen) direkt mit TRI Reagent Lösung[®] (Sigma) vom Wellboden abgelöst und in ein 1,7ml Kryoröhrchen überführt. In der Regel wurden je fünf gut bewachsene Wells eines 24 Wells (je 1,9 cm²/Well) mit insgesamt 500µl Tri Reagent[®] abgelöst. Für den Nachweis der Expression von MSC-Markergenen und den Markern früher Differenzierungswege wurde alternativ das nach Ablösen mit Accutase entstandene zentrifugierte Pellet mit 500µl Tri Reagent[®] aufgenommen und ebenfalls in ein Kryoröhrchen überführt. Die Röhrchen wurden anschließend direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur späteren Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

8.2 RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion erfolgte in Anlehnung an das Protokoll des Herstellers der TRI Reagent[®] Lösung. Die Proben wurden zunächst auf Eis langsam aufgetaut und anschließend für 5 min auf dem Vortexer geschüttelt. Nach kurzem Abzentrifugieren wurde jeder Probe 100µl eiskaltes Chloroform zugegeben und nach kurzem Schütteln für 5min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 14.000 RPM für 15 min bei 4°C, die der Auftrennung in drei Phasen dient. Die obere wässrige Phase enthält dabei die RNA, die Interphase die DNA und die untere Phase die Proteine der Probe. Die wässrige, RNA-haltige Phase wurde nun vorsichtig abpipettiert und anschließend die RNA durch Zugabe einer äquivalenten Menge eiskalten Isopropanols über Nacht bei -20°C gefällt. Nach Zentrifugation bei 4°C und 14.000 RPM für 10 min wurde der Überstand verworfen, das RNA-Pellet mit 70%igem Alkohol in DEPC-Wasser gewaschen und anschließend im Wärmeschrank bei 37°C für max. 20 min getrocknet. Das Pellet wurde dann je nach Größe in 9-25 µl sterilem Aqua bidest. gelöst und nach 10 min im 70°C warmen Wasserbad der Konzentrationsbestimmung zugeführt.

Die Bestimmung der Gesamt-RNA-Konzentration erfolgte mittels UV-Spektrophotometer (BioPhotometer, Eppendorf AG) über Extinktion bei 260nm. Die Messung des 260nm / 280nm Quotienten diente dabei als Qualitätskontrolle für die

gewonnene RNA (Kontamination mit Alkohol oder Phenol). Alle Proben wurden anschließend auf eine RNA-Konzentration von 100ng/µl eingestellt und direkt in cDNA umgeschrieben. Die restliche RNA wurde bei -80°C gelagert.

8.3 DNase Behandlung und Reverse Transkription (RT)

Bei der reversen Transkription wird die isolierte mRNA mit Hilfe eines Enzyms, der reversen Transkriptase, in DNA umgeschrieben. Die dadurch gewonnene, der mRNA entsprechende DNA wird dann als complementary DNA (cDNA) bezeichnet und im nächsten Schritt zum Nachweis der Expression spezifischer Gene in einer Polymerase-Kettreaktion (polymerase chain reaction, PCR) vervielfältigt. Da auch die sauberste Pipettierarbeit nicht garantieren kann, dass die isolierte RNA nicht mit geringen Mengen genomischer DNA kontaminiert ist, wird vor der Umschreibung ein enzymatischer Verdau der DNA mittels DNase Enzym vorgeschaltet. Dabei wird zum Schutz der RNA ein RNase Inhibitor zugesetzt. Zur Kontrolle dieses Verdau wird bei der anschließenden RT zu jeder Probe eine sogenannte Minus-RT-Probe mitgeführt. In diesen Proben wird die Reverse Transkriptase durch eine äquivalente Menge steriles Aqua bidest. ersetzt. Wurde die genomische DNA erfolgreich verdaut, zeigt die Minus-RT Probe in einer anschließenden PCR kein Produkt.

Durchführung

Die Durchführung erfolgte in leichter Abwandlung des Hersteller-Protokolls der Firma Applied Biosystems.

Ansatz des DNase-Mix:

pro Ansatz	Reagenz	Stamm-Konzentration	End-Konzentration
1 µl	MgCl ₂	10 mM	1 mM
1 µl	PCR-Puffer	500 mM	50 mM
1 µl	DNase I, RNase frei	10 U/µl	1U/µl
0,25 µl	RNase-Inhibitor	40 U/µl	1 U/µl

MATERIAL UND METHODEN

Zu je 3,25 µl des oben angegebenen Mix wurden 6,65 µl der RNA-Lösung gegeben, die Proben kurz an zentrifugiert und in einem Thermocycler folgendem Programm unterzogen:

- 1) 10 min bei 37°C (Verdau der genomischen DNA)
- 2) 5 min bei 75°C (Deaktivierung der DNase I)
- 3) abkühlen auf 4°C

Direkt im Anschluss erfolgte die RT. Als Startprimer für die Reverse Transkriptase dienten sogenannte Random Hexamers, die aus je sechs verschiedenen, zufällig zusammengesetzten Nukleotiden bestehen und sich so der mRNA willkürlich anlagern können. Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs) dienten dabei als Bausteine für cDNA und wurden im Überschuss zugesetzt, so dass sie auch als Bausteine für die anschließende PCR zur Verfügung standen. Der RT-Mix wurde nach folgendem Protokoll zusammengesetzt:

pro Ansatz	Reagenz	Stamm-Konzentration	End-Konzentration
2 µl	MgCl ₂	25 mM	5mM
1 µl	10 x PCR-Puffer	10 x	1 x
4 µl	Nukleotide Mix	10 mM	1 mM
0,5 µl	Random Hexamers	50 µM	2,5 µM
0,5 µl	RNAse-Inhibitor	20 U/µl	1 U/µl
0,5 µl	MultiScribe Reverse Transkriptase	50 U/µl	2,5 U/µl

Für die Minus-RT-Proben wurde der gleiche Mix angesetzt, jedoch 0,5 µl Reverse Transkriptase mit 0,5 µl Aqua bidest. ersetzt. Zu je 8,5 µl dieses Mixes wurden dann 1,5 µl DNase-behandelte RNA pipettiert und folgendem Thermocycler-Programm unterzogen:

- 1) 8 min bei 21°C (Anlagerung der Random Hexamer Primer)
- 2) 15 min bei 42°C (cDNA Synthese)
- 3) 5 min bei 99°C (Inaktivierung der Reversen Transkriptase)

- 4) 5 min bei 5°C (Abkühlung)
- 5) abkühlen auf 4°C (Kühlung bis zur Entnahme)

Die so erzeugte cDNA wurde bis zu ihrer weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

8.4 Qualitative Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) werden mit Hilfe der DNA-abhängigen DNA-Polymerase spezifische DNA-Abschnitte vermehrt, um sie anschließend mittels Gel-Elektrophorese sichtbar zu machen. Durch die Auswahl spezifischer Primer als Startpunkte, lässt sich der jeweilige DNA-Bereich, d.h. das Gen, bestimmen, der amplifiziert und damit nachgewiesen werden soll. Da im vorliegenden Falle cDNA als Produkt einer vorangegangenen RT als Ausgangsmaterial dient, spricht man hier auch von RT-PCR. Weil das Ergebnis der einfachen PCR abschließend keinen Rückschluss mehr auf die Ausgangsmenge an vorhandener cDNA liefert, bezeichnet man dies als qualitative PCR. Neben dem jeweiligen Zielgen wird bei jeder PCR ein sogenanntes Referenzgen (auch: ‚housekeeping gene‘ oder ‚housekeeper‘) mitamplifiziert, um auch bei Nicht-Expression des Zielgenes, den Erfolg der Reaktion nachweisen zu können. Darüber hinaus wird für jedes Primer-Paar eine sogenannte „no template control“ (NTC) mitgeführt, in der die cDNA mit Aqua bidest. ersetzt wird. Diese dient zum Ausschluss möglicher Kontaminationen der Reagenzien mit Fremd-DNA. Alle Primer wurden mit dem Beacon Designer™ (Fa. PREMIER Biosoft International) erstellt und von der Fa. Eurofins MWG Operon synthetisiert. Die Sequenzen und Genbank accession Nummern sind in Tabelle 1 wiedergegeben.

Tab. 1 Primersequenzen qualitative PCR

Primer	Sequence (5'-3')	Accession Nr.	Amplicon-Länge	Annealing-Temperatur
GAPDH	for GCTGCCAAATATGACGACATCA rev GTAGCCCAGGATGCCTTTGAG	NM_001003142	75 bp	60°C
Oct4	for AGAGGCAACCTGGAGAACATG rev GGGCAATGTGGCTGATCTG	XM_538830	71 bp	60°C
PPARγ2	for TGGTTGACACAGAGATGCCATT rev GTGGTCATCCATTACGGACAGA	AJ972913	77 bp	60°C
Runx2	for TGTCATGGCGGGTAACGAT rev TCCGGCCCACAAATCTCA	AY738265	107 bp	60°C
Sox 9	for AGTACCCGCACCTGCACAAC rev CGCTTCTCGCTCTCGTTCAG	NM_001002978	79bp	60°C

Durchführung

Zunächst wurde die folgende Menge Prämix pro verwendetem Primerpaar angesetzt:

pro Primerpaar	Reagenz	Stamm-Konzentration	End-Konzentration
2 μ l	MgCl ₂	25 mM	5 mM
4 μ l	10 x PCR-Puffer	10 x	1 x
32,75 μ l	Aqua bidest.		

Anschließend wurde für jedes Primerpaar je zu untersuchender Probe (cDNA) folgender Mix zusammen pipettiert:

pro Probe	Reagenz	Stamm-Konzentration	End-Konzentration
38,75 µl	Prä-Mix		
0,5 µl	forward Primer	20 pmol/µl	10 pmol/µl
0,5 µl	reverse Primer	20 pmol/µl	10 pmol/µl
0,25 µl	GOLD Amplitaq® Polymerase	5 U/µl	0,025 U/µl

Zu je 40 µl dieses Mixes wurden dann 10µl der zu untersuchenden cDNA pipettiert und nach folgendem Programm im Thermocycler inkubiert:

- 1) 10 min bei 95°C (Aktivierung der Polymerase)
- 2) 1 min bei 94°C (Denaturierung des DNA-Stranges)
- 3) 1 min bei 60°C (Anlagerung der Primer)
- 4) 1 min bei 72°C (Amplifikation durch die Polymerase)
- 5) 10 min bei 72°C (abschließende Amplifikation)
- 6) Abkühlen auf 4°C (Kühlung bis zur Entnahme)

8.5 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Visualisierung der Produkte diente ein 2%iges Agarose-Gel, welches mit SYBR Green I vorgefärbt wurde („Prestaining“). Hierzu wurden 1g Agarose in 50ml TAE Puffer gelöst und in einer Mikrowelle kurz aufgeköcht. Nach Abkühlen des Gemisches auf ca. 60-70°C wurden 5 µl SYBR Green I zugegeben, gemischt und das Gel in einen horizontalen Gelträger gegossen. Zur Erstellung der Geltaschen (slots) für den Probeneintrag wurde ein entsprechender Gel-Kamm eingehängt.

Nach Überführen des Gels in die Elektrophorese-Kammer, wurden pro slot je 12 µl PCR-Produkt mit 2 µl Loading dye gemischt und in den slot eingebracht. Als Marker diente eine 50 bzw. 100 bp Leiter. Die Elektrophorese wurde dann bei 125 Volt über 35 min durchgeführt, das Gel anschließend entnommen und die Banden mittels UV-Transilluminators (Biometra) visualisiert.

8.6 Quantitative RT-PCR (qRT-PCR)

Da die qualitative RT-PCR nur eine Aussage über die Expression oder Nicht-Expression eines Genes im Sinne einer Ja-/Nein-Antwort geben kann, wurde für die chondrogene Differenzierung zusätzlich eine quantitative PCR durchgeführt. Im Gegensatz zur qualitativen PCR, bei der die Agarose-Gelelektrophorese nur eine Endpunktaufnahme der Amplifikation liefert, wird die Amplifikation bei der qRT-PCR quasi „live“ beobachtet. Daher wird die qRT-PCR auch als Realtime-(RT-)PCR bezeichnet. Es kommen hierbei mit doppelsträngiger DNA interkalierende Farbstoffe wie SYBR Green oder auch fluoreszierende Sonden zum Einsatz, um den Amplifikationsfortschritt durch die Zunahme an Fluoreszenz sichtbar machen. Zur Auswertung wird dann ein sogenannter Schwellenwert-Zyklus (threshold cycle = Ct) festgelegt, bei der das Fluoreszenzsignal einen gewissen Basiswert überschreitet, die Amplifikation aber noch exponentiell verläuft. Eine Evaluation in diesem exponentiellen und dadurch nahezu linearen Bereich der PCR, lässt einen ein sehr viel genaueren Rückschluss auf die Ausgangsmenge des Templates zu als die Endzeitpunktbestimmung. Dies liegt daran, dass die Effizienz einer jeden PCR durch Verbrauch an Reagenzien und Zunahme an Inhibitoren im PCR-Ansatz zum Ende hin abnimmt. Bei der Auswertung der qRT-PCR unterscheidet man absolute und relative Quantifizierung. Während bei der absoluten Quantifizierung die Ausgangsmenge DNA oder cDNA exakt anhand einer vorher erstellten Eichkurve bestimmt wird, wird bei der relativen Quantifizierung das Ziel-Gen mit einem stabil exprimierten sogenannten Housekeeping Gen verglichen. Solche Housekeeping Gene sind in der Regel für die Zelle überlebenswichtig und daher immer relativ gleichmäßig exprimiert.

Durchführung

Primerpaare für die qRT-PCR wurden zunächst in der qualitativen PCR ausgetestet. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe mit einer in 1:1 bis 1:10.000 Verdünnung in Zehner-Schritten erstellt und eine erste Realtime-PCR durchgeführt, um die Effizienzen der PCR Reaktionen von Housekeeper und Ziel-Gen zu vergleichen. Die Liste der verwendeten Primer findet sich in Tabelle 2. Als Housekeeper diente das Gen Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH).

MATERIAL UND METHODEN

Die Realtime wurde mit cDNA von je 3 MSC-Proben aus Fett und KM nach chondrogener Differenzierung in der Hochdichte-2D-Kultur durchgeführt und mit Negativkontrollen des jeweils gleichen Tieres vor der Differenzierung verglichen. Der DNase-Verdau und die RT wurden zunächst wie in Kapitel 8.3 beschrieben durchgeführt. Die qRT-PCR wurden dann in Triplikaten durchgeführt. Der Reaktionsansatz lautet dabei wie folgt:

pro Ansatz	Reagenz	Stamm-Konzentration	End-Konzentration
10 µl	IQ SybrGreen SuperMix	2x	1x
0,6 µl	forward Primer	10 pmol/µl	300 nM
0,6 µl	reverse Primer	10 pM/µl	300 nM
6,8 µl	Aqua bidest (steril)		

Für jeden Ansatz wurden dann 2 µl der jeweiligen cDNA bzw. steriles Aqua bidest. (no template control) in ein Well einer 96-Well Platte vorgelegt und dann jeweils die 18 µl Reaktionsmix zupipettiert. Nach Verschluss der Platte wurde diese unter folgenden Bedingungen in einem Realtime-Cycler inkubiert:

- 1) 3 min bei 95°C (Aktivierung der Polymerase)
- 2) 15 s bei 95°C (Aufschmelzen des DNA-Doppelstranges)
- 3) 1 min bei 60°C (Primer-Anlagerung und DNA-Synthese)

Die Schritte 2) bis 3) wurden dabei 39mal wiederholt und nach jedem Schritt 3) die Fluoreszenz mittels CCD-Kamera detektiert. Im Anschluss an die PCR erfolgte dann noch eine Schmelzkurve durch langsames Aufschmelzen der Produkte von 65°C auf 95°C in 0,5°C-Schritten über jeweils fünf Sekunden. Das Aufschmelzen führt dabei zu einem Fluoreszenzabfall am produktspezifischen Schmelzpunkt und dient so zur Verifikation der spezifischen Amplifikation nur eines einzigen PCR-Produktes. Die Auswertung der qRT-PCR erfolgt mit der CFX Manager[®] Software der Fa. BioRad.

Tab. 2 Primersequenzen qRT-PCR

Primer	Sequence (5'-3')	Accession Nr.	Amplicon-Länge	Annealing-Temperatur
GAPDH	for GCTGCCAAATATGACGACATCA rev GTAGCCCAGGATGCCTTTGAG	NM_001003142	75 bp	60°C
Sox 9	for AGTACCCGCACCTGCACAAC rev CGCTTCTCGCTCTCGTTCAG	NM_001002978	79bp	60°C
Coll2A1	for GGTGGAGCAGCAAGAGCAA rev GTGTTGGGAGCCAGGTTGTC	NM_001006951	103 bp	60°C

9. STATISTISCHE AUSWERTUNG

Zur statistischen Auswertung der Populationsverdopplungszeiten wurde aufgrund der relativ hohen Standardabweichung innerhalb der jeweiligen Gruppe ein sog. Welch-Test (t-Test mit einzeln geschätzten Varianzen) durchgeführt. Für das Auswerten der Daten aus dem Wundheilungs-Assay wurde ein t-Test mit den zuvor logarithmierten Daten herangezogen. Die Realtime-Ergebnisse wurden im Falle von Sox9 mittels zweifaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) mit wiederholten Messungen ausgewertet. Für Coll2A1 diente ein t-Test mit verbundenen Stichproben (paired t-test) zur Auswertung der Ergebnisse der KM-MSK. Zuvor wurden hier wiederum die Daten logarithmiert um eine Normalverteilung zu erzielen. Aufgrund der relativen starken individuellen Unterschiede dürfen die Realtime-Ergebnisse jedoch nur als Tendenzen gewertet werden. Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm BMDP Statistical Software (Firma Statistical solutions, Cork, Irland) durchgeführt.

I. ERGEBNISSE

1. ISOLIERUNG, MORPHOLOGIE UND KULTUREIGENSCHAFTEN VON CANINEN MSC AUS KNOCHENMARK UND FETTGEWEBE

1.1 Mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark (KM-MSC)

Insgesamt wurde von 29 verschiedenen Hunden im Alter von 0,5 - 9 Jahren Knochenmark aus chirurgisch entfernten Femurköpfen oder aber Wirbelbruchstücken gewonnen. Eine genaue Auflistung ist Tabelle 3 zu entnehmen. Einem Hund wurden mit zeitlichem Abstand beide Hüftköpfe entnommen, weshalb sich die Gesamt-Probenzahl auf 30 Proben beläuft. Aufgrund der verschiedenen Größe der Knochenfragmente, der unterschiedlichen (v.a. auch rassebedingte) Größe und des unterschiedlichen Alters der Tiere sowie der variablen Qualität der Proben, waren die gewonnenen Mengen an Knochenmark sehr variabel. Dies führte unter anderem dazu, dass letztlich nur aus 13 dieser Proben ausreichend MSC für die eigentlichen Versuche gewonnen werden konnten.

Tab. 3 Proben KM-MSC

Nr.	Laborbuch-Nummer	Herkunft	Rasse	Alter (gerundet auf 0,5 Jahre)
1	01/08	KM	Deutscher Schäferhund-Rottweiler Mischling	5,5 Jahre
2	02/08	KM	großer Mischling	9 Jahre
3	03/08	KM	American Staffordshire	4,5 Jahre
4	04/08	KM	Altdeutscher Schäferhund	1 Jahr
5	05/08	KM	Zwerg-Pudel	9 Jahre
6	07/08	KM	mittelgroßer Mischling	1 Jahr
7	08/08	KM	mittelgroßer Mischling	2 Jahre
8	16/08	KM	Beagle	2,5 Jahre
9	19/08	KM	Pudel	11 Jahre

ERGEBNISSE

10	21/08	KM	Border Collie-Mischling	1 Jahr
11	23/08	KM	Coton de Tulear	2 Jahre
12	27/08	KM	Labrador Retriever	3 Jahre
13	30/08	KM	Mops	0,5 Jahre
14	03/09	KM	mittelgroßer Mischling	3 Jahre
15	08/09	KM	Fox Terrier	1 Jahr
16	12/09	KM	Welsh Terrier	0,5 Jahre
17	34/09	KM	Golden Retriever	1 Jahr
18	49/09*	KM	Golden Retriever	1 Jahr
19	56/09	KM	Jack Russel Terrier	4,5 Jahre
20	59/09	KM	Berner Sennenhund	3,5 Jahre
21	60/09	KM	Epaneul Breton	1 Jahr
22	64/09	KM	Labrador Mischling	1 Jahr
23	10/10	KM	Jack Russel Mischling	1 Jahr
24	45/10	KM	Labrador	1 Jahr
25	64/10	KM	mittelgroßer Mischling	0,5 Jahre
26	10/08	Wirbel	Franz. Bulldogge	4 Jahre
27	12/08	Wirbel	Deutsche Bracke	4 Jahre
28	18/08	Wirbel	Dobermann	5,5 Jahre
29	20/08	Wirbel	mittelgroßer Mischling	7,5 Jahre
30	22/08	Wirbel	Altdeutscher Schäferhund	6 Jahre

* gleiches Tier wie 34/09

Erste angeheftete, spindelförmige Zellen waren in der Regel nach drei bis fünf Tagen sichtbar. Die sich nicht anheftenden kernhaltigen Zellen der hämatopoetischen Linie wurden durch die regelmäßigen Medienwechsel nach und nach entfernt. Die KM-MSK gingen daraufhin in Proliferation über und bildeten schnell konfluierende Kolonien Fibroblasten-artiger Zellen (Abb. 2A). Der Zeitraum bis zur ersten Passage, d.h. zur 80%igen Konfluenz variierte dabei, wahrscheinlich auf Grund des

unterschiedlichen Gehaltes an MSC und unterschiedlich starker Proliferation, zwischen 7 und 21 Tagen.

Wurde bei 80-90%iger Konfluenz keine Passage durchgeführt, zeigten die Zellen in der Regel ein dreidimensionales Wachstum (Abb. 2C). Dabei wuchsen sie entweder in Fischschwarm-artiger Form lagenweise übereinander oder bildeten fokale Hügel, die allgemein als spontane Differenzierungsherde angesehen werden (Abb. 2E).

Einige länger kultivierte KM-MSCs zeigten eine von der typischen fibroblastoiden Form zunehmend abweichende Morphologie mit sehr flächigen, polygonalen Zellen mit deutlich sichtbarem Zytoskelett (Abb. 2G). Zellen mit derartiger Morphologie zeigten eine deutlich schlechtere Proliferation und ließen sich schlechter oder nur mit deutlich verlängerter Inkubationszeit in der Accutase-Lösung ablösen. Ihre Vermehrung stagnierte in der Regel innerhalb kürzester Zeit. Solche Veränderungen wurden als Seneszenz-Zeichen gewertet und Zellen mit dieser Morphologie nicht weiter für Versuche verwendet.

1.2 Mesenchymale Stammzellen aus dem Fettgewebe (Fett-MSCs)

Insgesamt wurde von 14 verschiedenen Tieren Fettgewebe zur Gewinnung von Fett-MSCs gewonnen. Dabei handelte es sich um Fettgewebe aus der Bauchhöhle sowie aus der Unterhaut. Auch hier variierte die Probenmenge stark, je nach durchgeführter OP und Größe des Tieres. Die Gewinnung von MSCs zeigte sich jedoch aufgrund der in der Regel deutlich größeren Menge an Gewebe insgesamt als sehr viel zuverlässiger als bei den Knochenmarkproben. Aus diesem Grunde konnten hier mit einem deutlich kleineren Probenumfang ausreichend Zellen für alle Versuche gewonnen werden. Im Gegensatz zu den KM-MSCs lieferten alle gewonnenen Proben eine ausreichend große Zellausbeute um für die Versuche genutzt werden zu können. Eine Übersicht über die gewonnenen Proben gibt Tabelle 4.

Tab. 4 Proben Fett-MSC

Nr.	Laborbuch-Nummer	Herkunft	Rasse	Alter (gerundet auf 0,5 Jahre)
1	14/08	abdominal	Langhaar-Teckel	0,5 Jahre
2	15/08	abdominal	Groenendael	3,5 Jahre
3	24/08	subkutan	mittelgroßer Mischling	9 Jahre
4	25/08	abdominal	russischer Terrier	6,5 Jahr
5	26/08	abdominal	Border Collie	1,5 Jahre
6	28/08	abdominal	kleiner Mischling	7 Jahr
7	29/08	subkutan	Labrador	10 Jahre
8	31/08	abdominal	Altdt. Schäferhund	4,5 Jahre
9	01/09	abdominal	Setter	11 Jahre
10	13/09	subkutan	Welsh Terrier	0,5 Jahr
11	20/09	subkutan	Dackel-Mischling	1,5 Jahre
12	24/08	subkutan	Labrador-Mischling	5,5 Jahre
13	25/09	subkutan	Malteser-Mischling	10,5 Jahre
14	27/09	abdominal	Langhaar-Teckel	7,5 Jahre

Die Proben aus Unterhaut und Abdomen unterschieden sich makroskopisch teilweise deutlich: Das Unterhaut-Fettgewebe war deutlich fester und stärker bindegewebig durchsetzt, während das abdominale Fettgewebe einen deutlich höheren Anteil an Adipozyten aufwies. Dennoch bestand hinsichtlich der gewonnenen Zellen nach der Isolation kein Unterschied und die gewonnenen Fett-MSC wurden aufgrund ihrer hohen Homogenität im weiteren Versuchsverlauf nicht mehr nach ihrer Herkunft unterschieden. Unabhängig von der Proben-Ausgangsmenge und dem Herkunftsort war die Gewinnung von MSC aus dem Fettgewebe deutlich zuverlässiger als die aus dem Knochenmark.

ERGEBNISSE

Bereits 24 Stunden nach der Isolation waren erste adhärente, fibroblastoide Zellen zu finden, die dank ihrer starken Proliferation binnen fünf bis sieben Tagen 80-90%ige Konfluenz erreichten und somit passagiert werden konnten.

Die rapide konfluierenden Zellkolonien zeigten mit ihrer großen, spindelförmigen Gestalt mikroskopisch große Ähnlichkeit mit den KM-MSC (Abb. 2B). Diese subjektive Beobachtung konnte mittels Durchflusszytometrie objektiviert und bestätigt werden (Abb. 4A und C). Führte man bei 80%iger Konfluenz keine Passage durch, zeigten auch die Fett-MSC Tendenzen zur Ausbildung großer dreidimensionaler Differenzierungsherde (Abb. 2F). Einige Proben zeigten mit zunehmender Konfluenz auch eine mehr kopfsteinpflasterartige polygonale Morphologie mit einem hohen Reichtum an Zellorganellen (Abb. 2D). Eine ähnlich polygonale Morphologie zusammen mit langen Zellausläufern konnte auch dann beobachtet, wenn die Proliferation stagnierte (Abb. 2H). Diese Veränderungen der Morphologie wurden daher als Seneszenz-Anzeichen gewertet. Betroffene Proben wurden von den weiteren Versuchen ausgeschlossen. Die Seneszenz-Anzeichen unterschieden sich damit morphologisch deutlich von denen der KM-MSC.

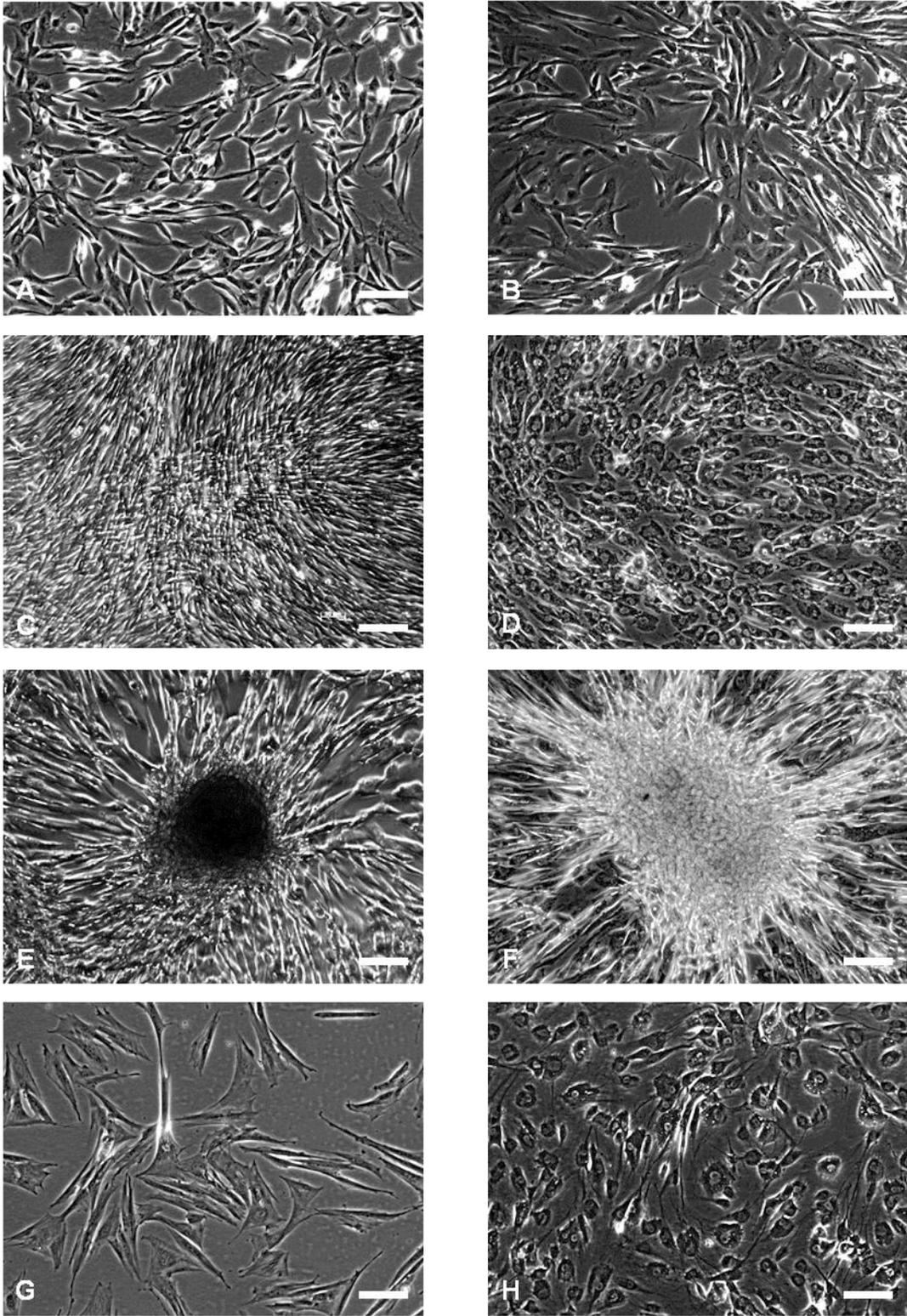


Abb. 2 Vergleichende Morphologie von KM-MSC (A,C,E,G) und Fett-MSC (B,D,F,H)
(A) Vitale KM-MSC mit typischer fibroblastoider Zellmorphologie (Passage 2)

- (B) Vitale Fett-MSC mit typischer fibroblastoider Zellmorphologie (Passage 3)
 - (C) Fischschwarm-artiges Verhalten hochdichter KM-MSC Kulturen (Passage 0)
 - (D) Kopfsteinpflaster-artiges Erscheinungsbilder einzelner hochdichter Fett-MSC (Passage 2)
 - (E) Differenzierungsknötchen in hochdichter KM-MSC Kultur (Passage 3)
 - (F) Typischer Differenzierungsherd in hochdichten Fett-MSC Kulturen (Passage 3)
 - (G) Flächige Morphologie mit deutlich sichtbarem Zytoskelett bei KM-MSC mit stagnierender Proliferation (Seneszenz, Passage 5)
 - (H) Polygonale Morphologie mit vielen intrazytoplasmatischen Granula bei Fett-MSC mit stagnierender Proliferation (Seneszenz, Passage 2 nach Kryokonservierung)
- Balken = 100µm

1.3 Kryokonservierung

Grundsätzlich zeigten die Zellen beider Herkünfte unter dem angewendeten Verfahren eine gute Konservierbarkeit in flüssigem Stickstoff, selbst über Monate hinweg. Abbildung 3 zeigt, dass die Zellen bis auf wenige Ausnahmen morphologisch keine sichtbaren Veränderungen im Vergleich vor und nach der Kryokonservierung zeigten. Dies bestätigte auch die Untersuchung mittels Durchflusszytometrie (Abb. 4). Auch auf die Expression der stammzellspezifischen Marker hatte die Kryokonservierung keinen Einfluss. Vereinzelt gab es jedoch bei beiden Herkünften Proben, die nach dem Auftauen die bereits oben beschriebenen, herkunftstypischen Seneszenz-Anzeichen zeigten und bei denen die Proliferation stagnierte (Abb.2G und H). Da es sich hierbei aber in der Regel um einzelne Proben handelte, wird davon ausgegangen, dass es sich um zufällige Gefrierschäden handelte. Solche Gefrierschäden könnten beispielsweise durch ein undichtes Kryogefäß, Eindringen von Stickstoff in einzelne Gefäße oder Fehler beim Einfrieren oder Auftauen entstanden sein.

ERGEBNISSE

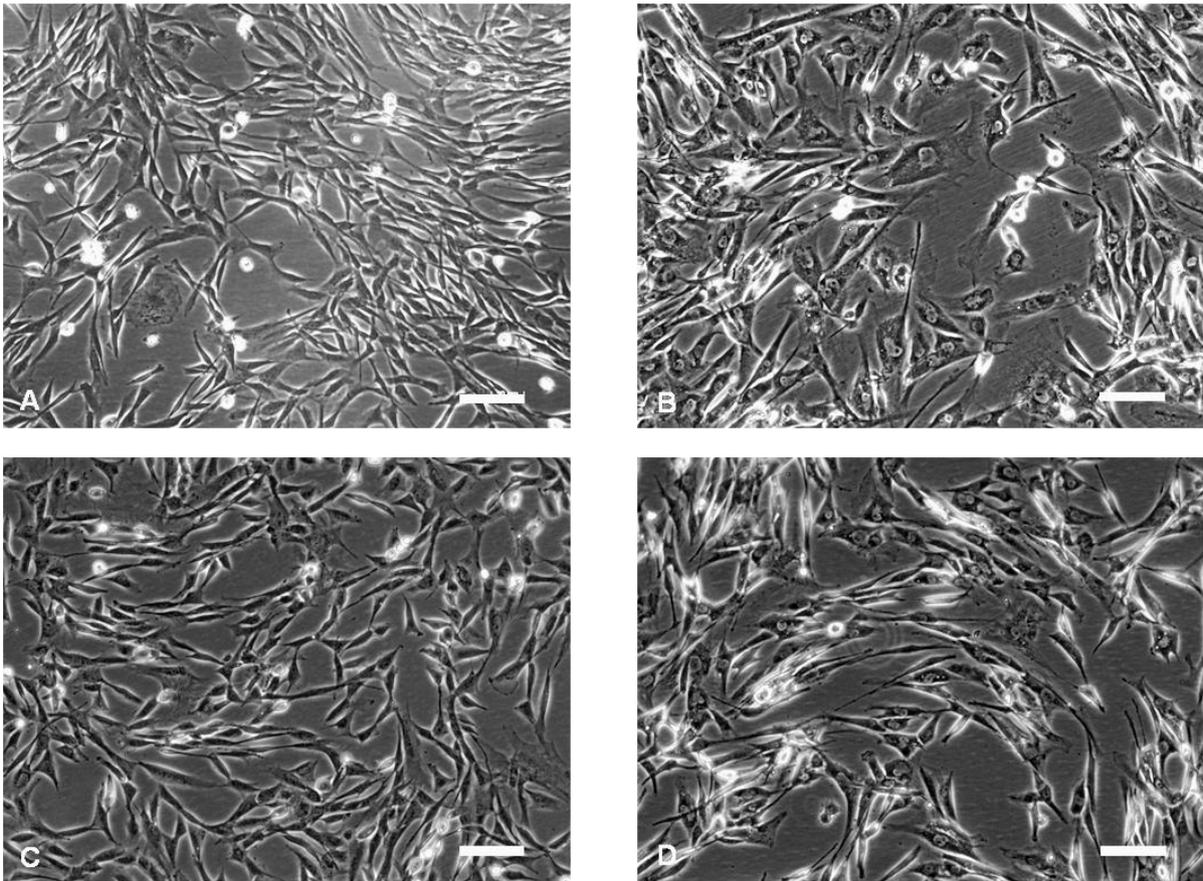


Abb. 3 Vergleich prä und post Kryokonservierung von KM-MSC (A,C) und Fett-MSC (B,D)

(A) KM-MSC 07/08 Passage 0 und **(B)** Fett-MSC 26/08 Passage 1 vor Kryokonservierung
(C) KM-MSC 07/08 Passage 2 und **(D)** Fett-MSC 26/08 Passage 2 nach Kryokonservierung
(Balken=100 μ m)

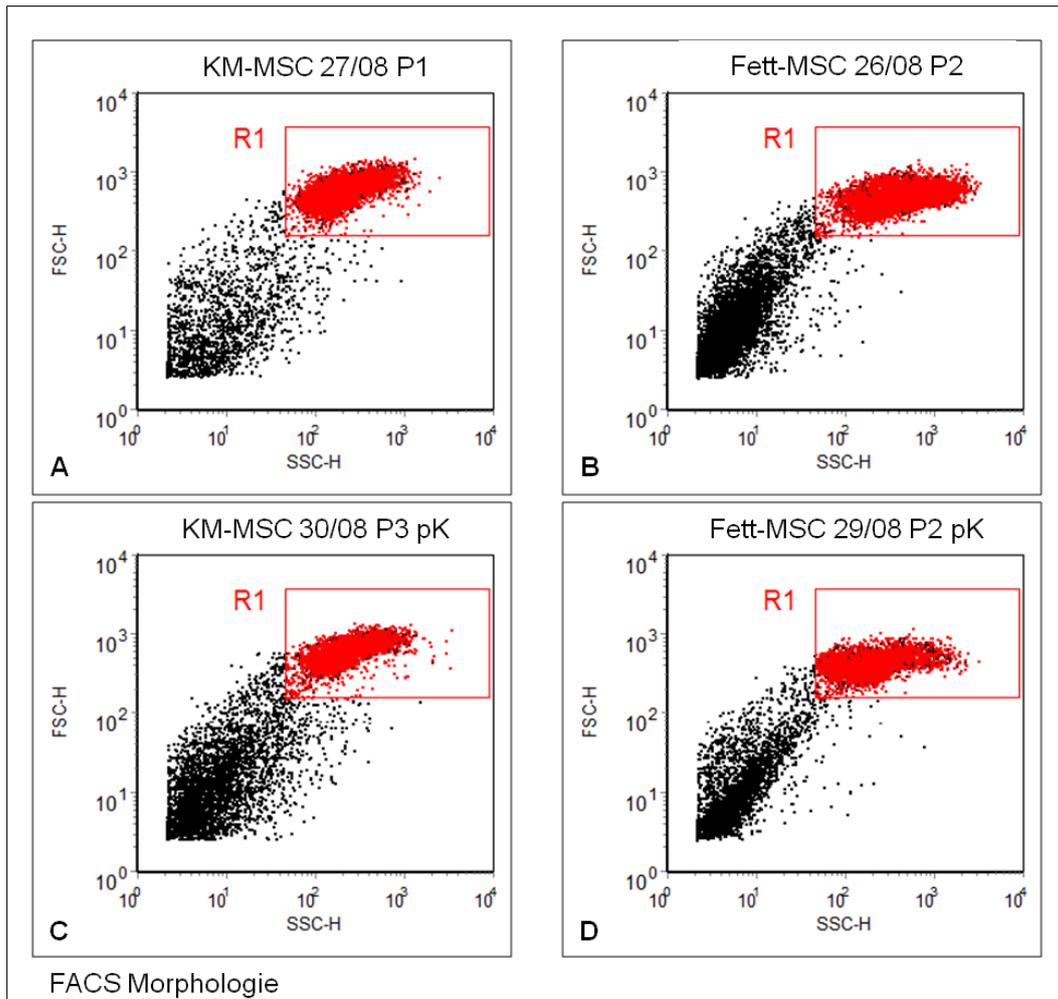


Abb. 4 Vergleichende Zellmorphologie in der Durchflusszytometrie

(A) KM-MSC der Passage 1 vor und (C) Passage 3 nach der Kryokonservierung

(B) Fett-MSC der Passage 2 vor und (D) Passage 2 nach der Kryokonservierung

FSC = forward scattered light, Vorwärtsstreulicht; SSC = sideward scattered light, Seitwärtsstreulicht

Die Gates (R1, rot) grenzen die eigentliche Zellpopulation gegenüber dem Zelldetritus ab. Jeder Punkt im Diagramm symbolisiert eine Zelle. Die Homogenität der Punktwolke innerhalb der verschiedenen Gates zeigt eine sehr homogene Zellpopulation hinsichtlich Zellgröße und Granularität in allen vier Proben.

1.4 Populationsverdopplungszeit

Die Bestimmung der Populationsverdopplungszeit ist ein Kriterium zur Bewertung der *in vitro*-Kultivierbarkeit der Zellen. Für eine potentielle therapeutische Anwendung ist sie eine wichtige Größe zur Bewertung der Zeitdauer von Gewinnung bis zur Applikation der Zellen und damit auch für die potentiell entstehenden Kosten. Zudem ist von ihr auch maßgeblich die durch eine Kultivierung zu gewinnende Menge an Zellen abhängig. Analysiert wurde dabei das Wachstum der Zellen nach der ersten

Passage (P1), das heißt nach der Isolierung und initialen Anzucht. Es wurden hierzu bei den Fett-MSK je drei, bei den KM-MSK aufgrund der größeren Streuung innerhalb der Gruppe je sechs verschiedene Proben untersucht. Dabei zeigten sich bei den Fett-MSK ein Populationsverdopplungs-Intervall von durchschnittlich $29,1 \pm 4,5$ Stunden. Demgegenüber brauchten KM-MSK mit $45,6 \pm 11,9$ Stunden deutlich länger für eine Verdopplung (Abb. 5A). Zur statistischen Auswertung wurde aufgrund der unterschiedlichen Standardabweichungen ein sog. Welch-Test für unterschiedliche Varianzen herangezogen. Dieser bestätigte eine eindeutige Signifikanz für den Unterschied zwischen den beiden Gruppen ($p=0,02$).

2. WOUND HEALING ASSAY (WUNDHEILUNGS-ASSAY)

Im Wundheilungs-Assay zeigten MSK beider Herkünfte ein zügiges Einwandern („healing“) in das artifiziell hergestellte Wundgebiet. Die Analyse der Migrationsgeschwindigkeit zeigte dabei keine signifikanten Unterschiede zwischen den Fett- und KM-MSK ($p=0,12$) (Abb. 5B). Vielmehr war die Streuung in beiden Gruppen relativ breit, so dass Unterschiede in der Migrationsgeschwindigkeit eher vom Spender als vom Gewebe abzuhängen scheinen. Alle untersuchten Proben waren in der Lage binnen 24 bis 36 Stunden den Scratch vollständig zu schließen.

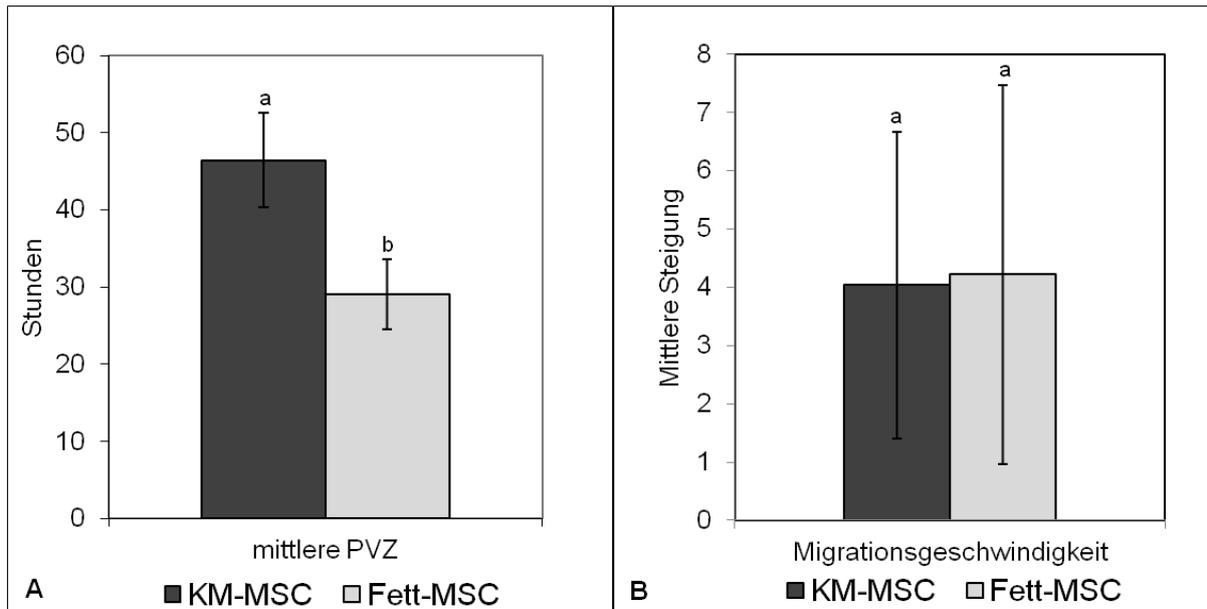


Abb. 5 Populationsverdopplungszeit und Migrationsgeschwindigkeit im Vergleich

(A) Mittlere Populationsverdopplungszeit von KM-MSK (n=6) und Fett-MSK (n=3) im Vergleich. Die Populationsverdopplung benötigte bei den KM-MSK im Schnitt mit $45,6 \pm 11,9$ Stunden signifikant länger als bei den Fett-MSK mit $29,1 \pm 4,5$ Stunden ($p=0,02$).

(B) Mittlere Migrationsgeschwindigkeit von KM-MSK (n=3) und Fett-MSK (n=5) im Vergleich. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen ($p=0,12$). Verschiedene Buchstaben (a,b) symbolisieren signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$)

3. EXPRESSION STAMMZELLSPEZIFISCHER MARKER UND MARKER FRÜHER DIFFERENZIERUNG

3.1 Stammzellspezifische Marker

Zur Verifizierung der isolierten Zellen als Stammzellen wurden aufgrund des Mangels an spezifischen Antikörpern sowie an Positivkontrollgewebe für die Spezies Hund zunächst der mRNA Nachweis für den Pluripotenzmarker Oct4 gewählt. Oct4 reguliert die Pluripotenz und Fähigkeit zur Selbsterneuerung in mesenchymalen wie in embryonalen Stammzellen (Pan et al. 2002). Zur Wahl der Primer dienten dabei sog. „predicted“ Sequenzen aus der Gen-Bank des National Center for Biotechnology Information (NCBI), welche automatisch auf Basis von Genom-Analysen des Haushundes erstellt werden.

Es wurden repräsentativ jeweils vier verschiedene Proben je Gruppe untersucht. Die Expression des Pluripotenzmarkers Oct4 konnte in allen untersuchten Proben aus

ERGEBNISSE

Fett und Knochenmark nachgewiesen werden (Abb. 6A). Auffällig war jedoch, dass die Bandenstärke individuell variierte, obwohl der RNA-Gehalt der Proben vor der Umschreibung auf 100ng/ μ l RNA eingestellt worden war und die Bandenstärke des Housekeeping Genes GAPDH sich homogen darstellte. Zwar handelt es sich um eine qualitative PCR, welche anfällig für Pipettierfehler ist, dennoch könnten diese unterschiedlichen Bandenstärken auf einen wahren Unterschied in der Expression hindeuten. Dabei lässt sich allerdings nicht unterscheiden, ob innerhalb einer Probe einzelne Zellen oder Zellklone das untersuchte Gen überhaupt nicht exprimierten oder aber ob die Menge an exprimierter mRNA insgesamt zu- oder abnahm, das heißt, dass pro Zelle einfach mehr bzw. weniger Transkripte vorlagen.

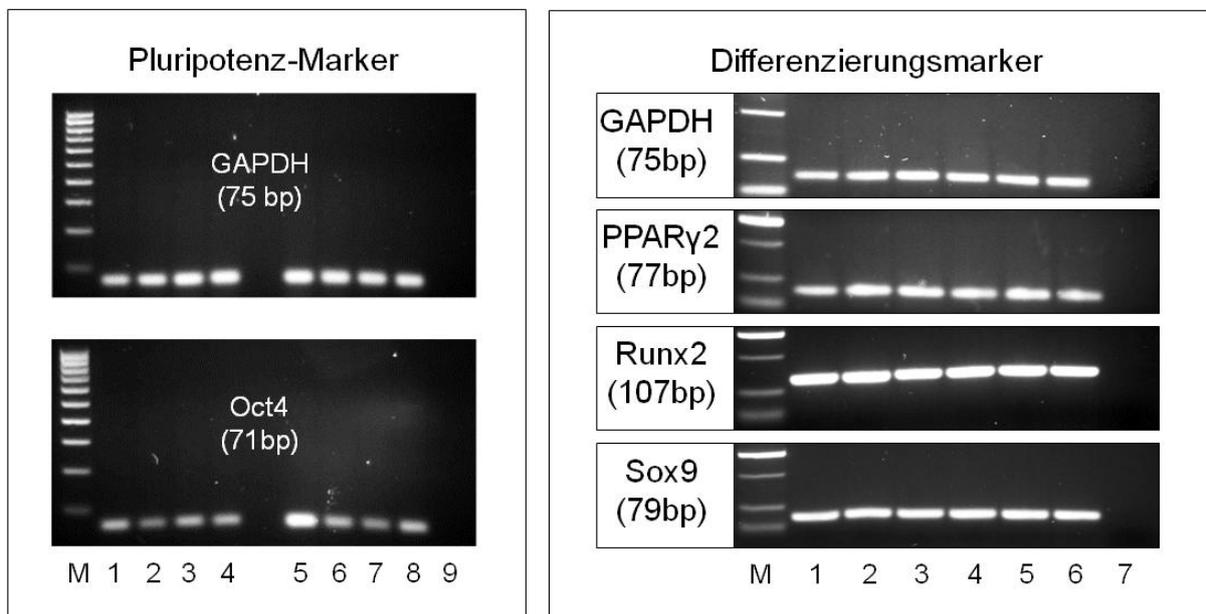


Abb. 6 Vergleichende mRNA-Expression des Pluripotenzmarkers Oct4 und früher Marker der Differenzierung in Fett, Knochen und Knorpel

(A) Nachweis von mRNA des Pluripotenz-Markers Oct4 in jeweils vier verschiedenen Proben beider Gruppen. Housekeeper GAPDH.

(1-4): KM-MSK; (5-8): Fett-MSK; (9): NTC; M: 100bp Marker;

(B) Nachweis von mRNA der frühen Differenzierungsmarker für Fett (PPA γ 2), Knochen (Runx2) und Knorpel (Sox9) in jeweils 3 verschiedenen Proben beider Gruppen. Housekeeper GAPDH.

(1-3): KM-MSK; (4-6): Fett-MSK; (7): NTC; M: 50bp Marker

Da neben den typischen Pluripotenzmarkern klassischerweise die Expression von bestimmten Oberflächenmarkern zur Charakterisierung der MSC herangezogen werden, wurde aufgrund des Vorliegens eines spezifischen Antikörpers zusätzlich die Expression von CD90 untersucht. Die Expression des Oberflächenantigens CD90

ERGEBNISSE

gehört dabei zu den am weitesten akzeptierten Oberflächenmarkern der MSC bei anderen Spezies (Dominici et al. 2006; Izadpanah et al. 2006). Aufgrund der Möglichkeit der Untersuchung mittels Durchflusszytometrie war hier im Gegensatz zur RT-PCR eine Analyse auf Einzelzell-Ebene möglich. In den jeweils fünf verschiedenen untersuchten Proben trugen dabei im Mittel bei den KM-MSC $96,1 \pm 0,6$ % der Zellen das CD90 Antigen auf ihrer Oberfläche, bei den Fett-MSC waren es $94,8 \pm 2,9$ % (Abb. 7). Zusammen mit der sehr homogenen Darstellung im Vorwärts- (FSC) und Seitwärts-Streulicht (SSC), das heißt der Zellgröße und Granularität, zeigte dieses Ergebnis, dass die vorliegenden Zellpopulationen sehr homogen waren (siehe auch Abb. 4). Dies trifft als Aussage sowohl auf die untersuchten Proben innerhalb der jeweiligen Herkunftsgruppe als auch auf den Vergleich zwischen den beiden Gruppen Fett und Knochenmark zu (vergl. Abb. 4). Das Vorliegen eines Zellgemisches und die potentielle Verunreinigung durch Zellen der hämatopoetischen Linie konnte damit so gut wie ausgeschlossen werden. Somit können die angewendeten Methoden zur Isolierung von MSC aus dem Fett und Knochenmark als geeignet angesehen werden, um in kurzer Zeit eine homogene MSC-Population aus dem jeweiligen Gewebe zu erhalten.

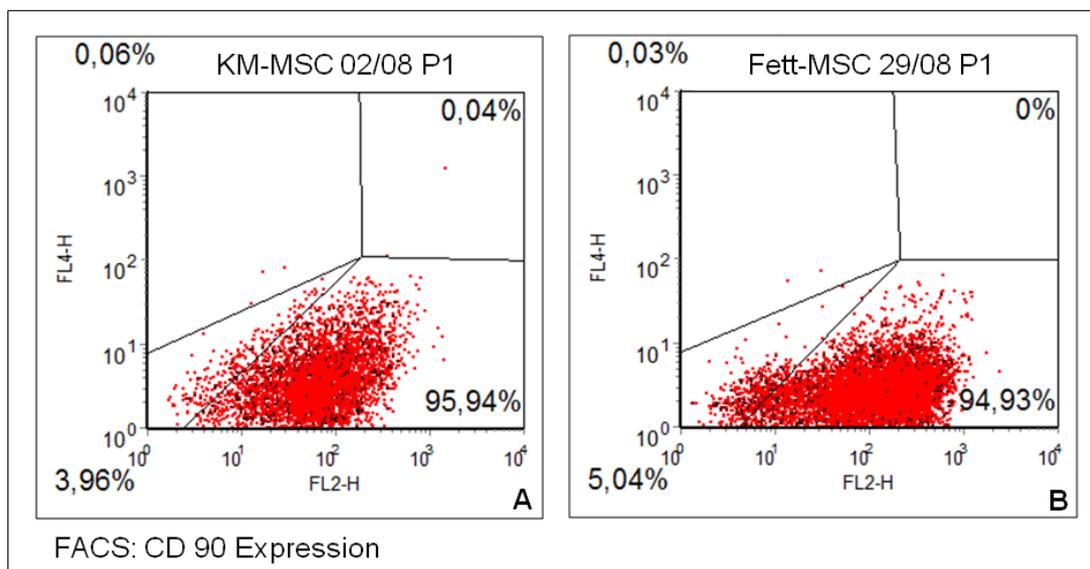


Abb. 7 CD90 Expression des Oberflächenmarkers CD90

- (A)** KM-MSC Hund 02/08 Passage1 exprimieren zu 95,94% das CD90 Antigen
- (B)** Fett-MSC Hund 29/08 Passage 1 exprimieren zu 94,93% das CD90 Antigen

3.2 Marker früher Differenzierungswege

Jeweils drei Proben der KM-MSC und Fett-MSC verschiedener Spender wurden auf die Expression von frühen Marker-Genen der klassischen mesenchymalen Differenzierungswege in Fett, Knorpel und Knochen untersucht.

Hierbei konnte festgestellt werden, dass KM-MSC wie auch Fett-MSC bereits konstitutiv die frühen Differenzierungsgene für Fettgewebe (PPAR γ 2), Knorpel (Sox9) und Knochen (Runx2) exprimieren (Abb. 6B).

4. CHONDROGENE DIFFERENZIERUNG

4.1 Histomorphologie

Die Pelletkulturen von MSC beider Herkünfte zeigten bereits nach 10 Tagen chondrogener Differenzierung die Produktion einer mit Alcianblau anfärbbaren Glycosaminoglycan-reichen Matrix (Abb. 8A,B und 9A,B). Negativkontroll-Pellets beider Zelltypen wurden zunehmend kleiner und waren am Ende der Differenzierungsperiode häufig nicht mehr nachweisbar (Abb. 8E und 9E).

Bei den KM-MSC nahm die Menge der Matrix bis zum Tag 23 deutlich zu, so dass die Zellen zunehmend auseinander rückten und sich zu Chondron-ähnlichen Gruppen formten (Abb. 8C und D). Diese Gruppen wiesen teilweise auch an typische Knorpel-Lakunen erinnernde Strukturen auf. Die extrazelluläre Matrix wirkte dabei lichtmikroskopisch gut organisiert. Die Oberfläche des Pellets war häufig von einem dünnen fibroblastenartigen Saum umgeben und das Zentrum des Pellets zeigte selten Anzeichen von Apoptose und Nekrose.

Im Gegensatz dazu blieben die Zellen der Fett-MSC auch nach 23 Tagen Differenzierung eher spindelförmig und fibroblastoid (Abb.9C und D). Das Pellet war in der Regel von einer mehrlagigen Schicht fibroblastoider Zellen umgeben. Zwar wurde auch hier eine Alcianblau-positive Matrix gebildet, jedoch weniger als bei den KM-MSC und die Matrix wirkte lichtmikroskopisch weniger hyalin. Das Zentrum des Pellets zeigte häufig degenerativen Veränderungen. Es kam zur Ausbildung einer Vielzahl von Fettvakuolen und die Zellen im Zentrum wurden zunehmend apoptotisch.

ERGEBNISSE

Insgesamt wirkte die gebildete Matrix deutlich weniger strukturiert und weniger knorpelähnlich als bei den KM-MSC.

Die Hochdichte-Monolayer-Kulturen hatten sich nach 10 Tagen chondrogener Differenzierung in der Regel vom Boden der Kulturschale abgelöst und leicht kontrahiert. Dies konnte für beide Zelltypen beobachtet werden. Im Gegensatz dazu blieben Monolayer-Kulturen der Negativkontrollen adhärent. Auch hier zeigte sich bei der repräsentativen Färbung einzelner Proben, dass die KM-MSC deutlich mehr Matrix gebildet hatten als die Fett-MSC (Abb.8F und 9F).

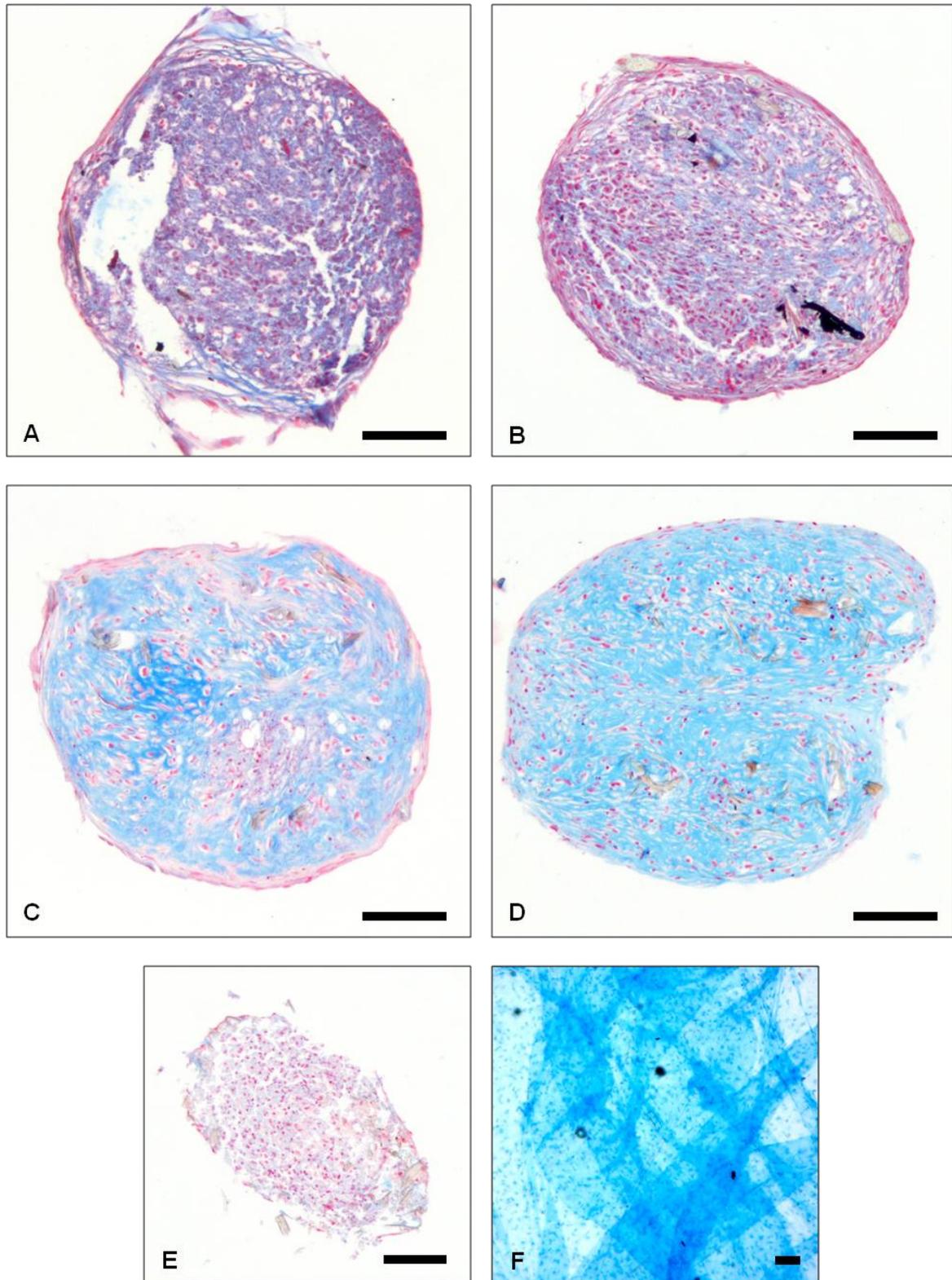


Abb. 8 Chondrogene Differenzierung KM-MSC nach 10 und 23 Tagen (Alcianblau-Färbung)

(A) Hd 34/09 und **(B)** Hd 02/08 nach 10 Tagen chondrogener Differenzierung

(C) Hd 07/08 und **(D)** Hd 04/08 nach 23 Tagen chondrogener Differenzierung

(E) Hd 04/08 Negativkontroll-Pellet

(F) Hd 12/09 nach 10 Tagen chondrogener Differenzierung in Hochdichte-Kultur; Balken=100µm

ERGEBNISSE

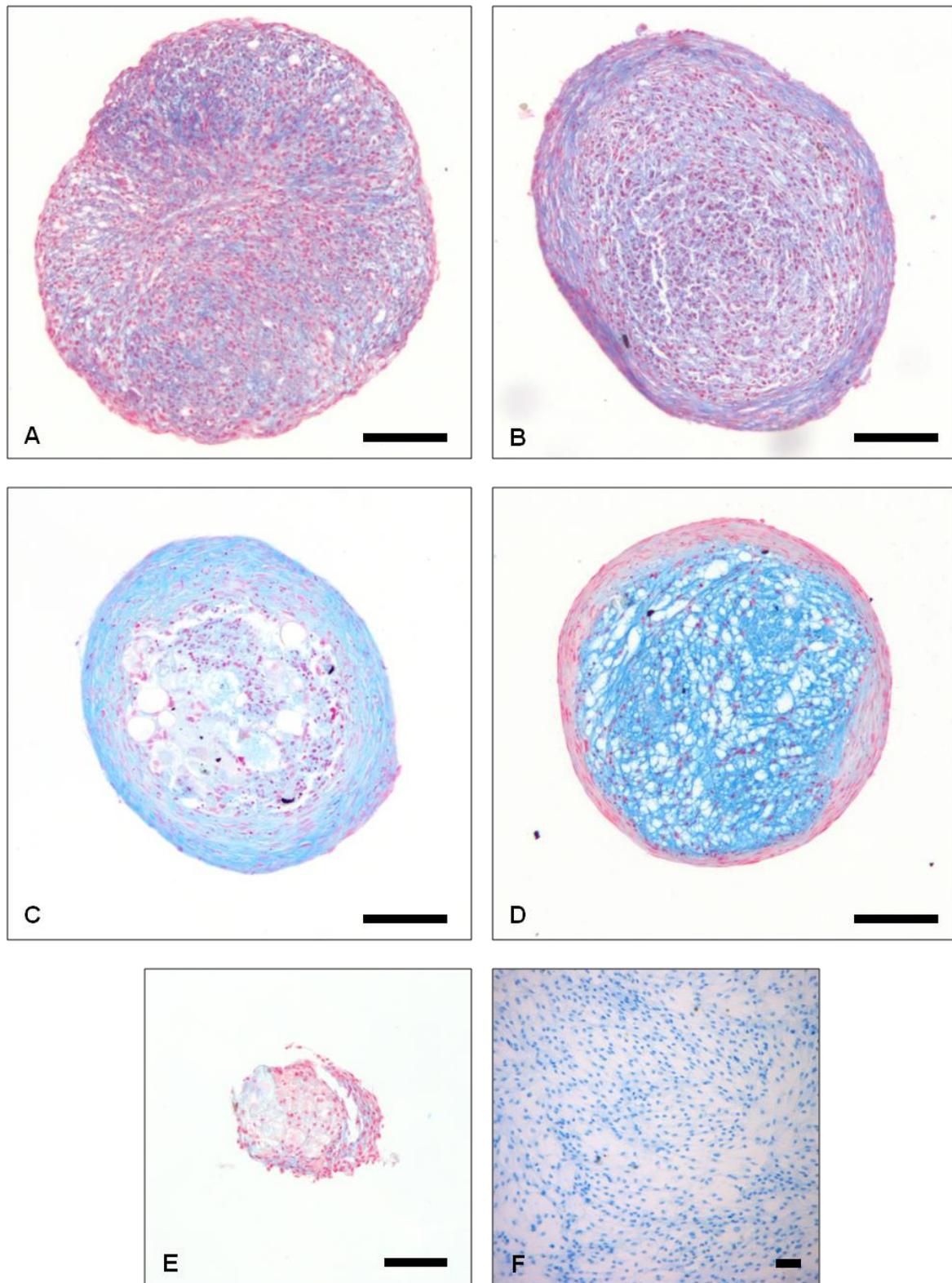


Abb. 9 Chondrogene Differenzierung Fett-MSC nach 10 und 23 Tagen (Alcianblau-Färbung)

(A) Hd 13/09 und **(B)** Hd 25/09 nach 10 Tagen chondrogener Differenzierung

(C) Hd 28/08 und **(D)** Hd 15/08 nach 23 Tagen chondrogener Differenzierung

(E) Hd 15/08 Negativkontroll-Pellet

(F) Hd 26/08 nach 10 Tagen chondrogener Differenzierung in Hochdichte-Kultur; Balken=100 μ m

4.2 Elektronenmikroskopie

Bei der Untersuchung der Pellets mittels Transmissionselektronenmikroskopie zeigten sich ebenfalls deutliche Unterschiede bezüglich der Zellmorphologie und der produzierten Matrix nach 21 Tagen chondrogener Differenzierung. Die KM-MSC bildeten lange Zellausläufer, welche mit einer wohlorganisierte Matrix in Verbindung standen. Die Matrix bestand aus dicht gepackten, parallel laufenden Fasern und feinen Fibrillen. Die Zellen selbst zeigten einen großen Reichtum an Zellorganellen, insbesondere ein aktives endoplasmatisches Retikulum.

Wie auch in der lichtmikroskopischen Beobachtung konnte demgegenüber bei den Fett-MSC deutlich weniger extrazelluläre Matrix gefunden werden. Die gebildete Matrix war weniger dicht und erschien unstrukturiert. Auch auf elektronenmikroskopischer Ebene ließen sich viele intrazelluläre Fettvakuolen nachweisen. Die Zellen selbst erschienen mit Ausnahme des Randbereiches häufig degeneriert und es fanden sich viele Residualkörperchen und Heterolysosomen innerhalb und ausserhalb der Zellen.

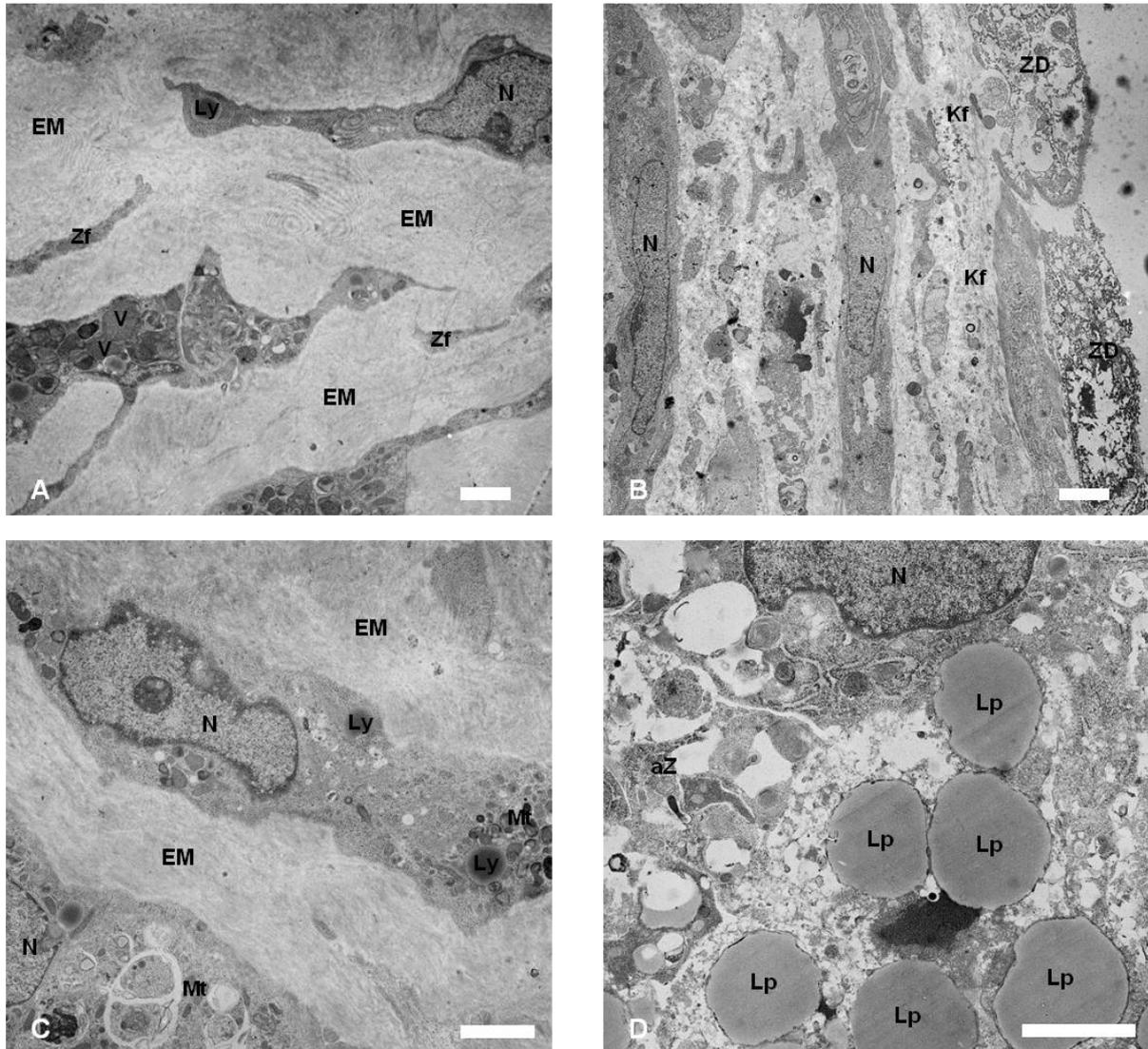


Abb. 10 Ultrastrukturelle Darstellung der chondrogenen Differenzierung

(A) und (C) KM-MSC nach 23 Tagen chondrogener Differenzierung

(B) und (D) Fett-MSC nach 23 Tagen chondrogener Differenzierung

EM=extrazelluläre Matrix; N=Nucleus; Ly=Lysosomen; Mt=Mitochondrien; Zf=Zellfortsätze;

V=(Sekret-)Vesikel; ZD=Zelldebris; Kf=kollagene Fasern; aZ=apoptotische Zelle; Lp=Lipidtropfen;

Balken=2,5μm

4.3 Quantitative Expression chondrogener Marker-Gene

Untersucht wurde die Genexpression von Sox9 und Collagen 2A1 (Coll2A1). Sox9 ist ein Haupttranskriptionsfaktor der chondrogenen Differenzierung, während Coll2A1 ein von ihm reguliertes Knorpelmatrixprotein ist. Die Analyse der quantitativen mRNA-Expression von Sox9 und Coll2A1 bestätigte dabei ebenfalls die bereits morphologisch auffallenden Unterschiede: Während sich in den KM-MSC eine 2- bis

ERGEBNISSE

6,25-fache Aufregulation der Sox9 mRNA nachweisen ließ, zeigten Fett-MSCs eine Down-Regulierung um das 7,3- bis 14-fache gegenüber den Negativkontrollen (Abb. 11A). Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen Fett und Knochenmark zeigte sich dabei als statistisch signifikant ($p=0,041$), ebenso wie der Unterschied zwischen Negativ- und Positivkontrollen ($p=0,025$). Gleichzeitig zeigte die Korrelation zwischen der Gruppenzugehörigkeit (KM oder Fett) und der Differenzierung eine sehr hohe Signifikanz, was bedeutet, dass der Effekt des Differenzierungsmediums auf die Zellen stark abhängig von der Zellherkunft war ($p=0,0064$).

Die mRNA für Collagen2A1, dem häufigsten Collagen im hyalinen Knorpel, wurde in den KM-MSCs unter dem Differenzierungseinfluss ebenfalls aufreguliert. Die Höhe schwankte jedoch extrem zwischen 14,4- bis zu 700-fach in den untersuchten Proben ($p=0,057$). Demgegenüber war Collagen2A1 in den Fett-MSCs entweder nicht reguliert oder gar nicht nachweisbar (Abb. 11B).

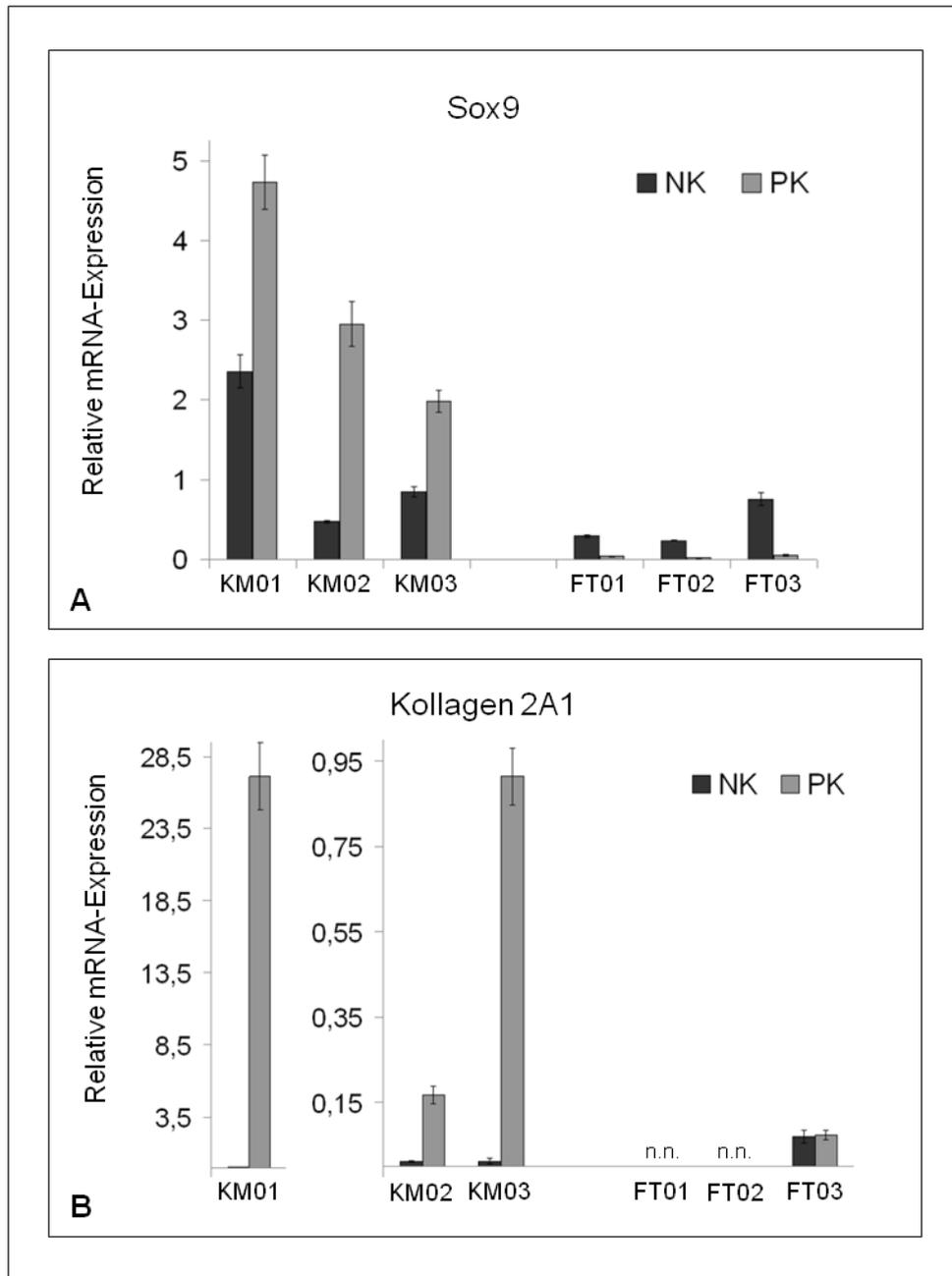


Abb. 11 Relative mRNA-Expression von Sox9 und Coll2A1

(A) Relative mRNA-Expression von Sox9 in je 3 verschiedenen Proben je Gruppe nach 10 Tagen chondrogener Differenzierung in Hochdichtekultur

(B) Relative mRNA-Expression von Collagen 2A1 (Coll2A1) in je 3 verschiedenen Proben je Gruppe nach 10 Tagen chondrogener Differenzierung

KM=KM-MSC; FT=Fett-MSC; PK=Positivkontrolle; NK=Negativkontrolle; n.n.=nicht nachweisbar

5. OSTEOGENE DIFFERENZIERUNG

5.1 Histomorphologie

In der Monolayerkultur über 3 Wochen neigten die Zellen beider Herkünfte dazu, sich unter dem Einfluss der osteogenen Differenzierung vom Kulturschalenboden abzulösen und durch Kontraktion selbständig eine Pelletform anzunehmen. Die Bildung einer Mineralisierung konnte dabei in einigen aber nicht in allen untersuchten Proben mittels der von Kossa-Färbung nachgewiesen werden. Die selbstgebildeten KM-MSC Pellets zeigten sich dabei deutlich besser organisiert als die Pellets aus den Fett-MSC (Abb.12A und B).

Die daraufhin in Pelletkultur durchgeführte osteogene Differenzierung zeigte für Zellen beider Herkünfte die Ablagerung von Calcium, während die Pellets der Negativkontrollen kein Calcium akkumulierten und ähnlich wie bei der chondrogenen Differenzierung zunehmend der Degeneration anheimfielen (Abb.12C-F). Eine Mineralisierung war jedoch nicht immer in allen Proben nachweisbar, dies traf für beide Gruppen in gleichem Maße zu. KM-MSC zeigten in der Regel eine Mineralisierung innerhalb des inneren Randsaumes des Pellets (Abb. 12C und E). Demgegenüber akkumulierten Fett-MSC Calcium vor allem im Pelletzentrum (Abb. 12D und E). Teilweise schienen die Fett-MSC jedoch unter der übermäßigen Kalzifizierung zu degenerieren (Abb. 12F).

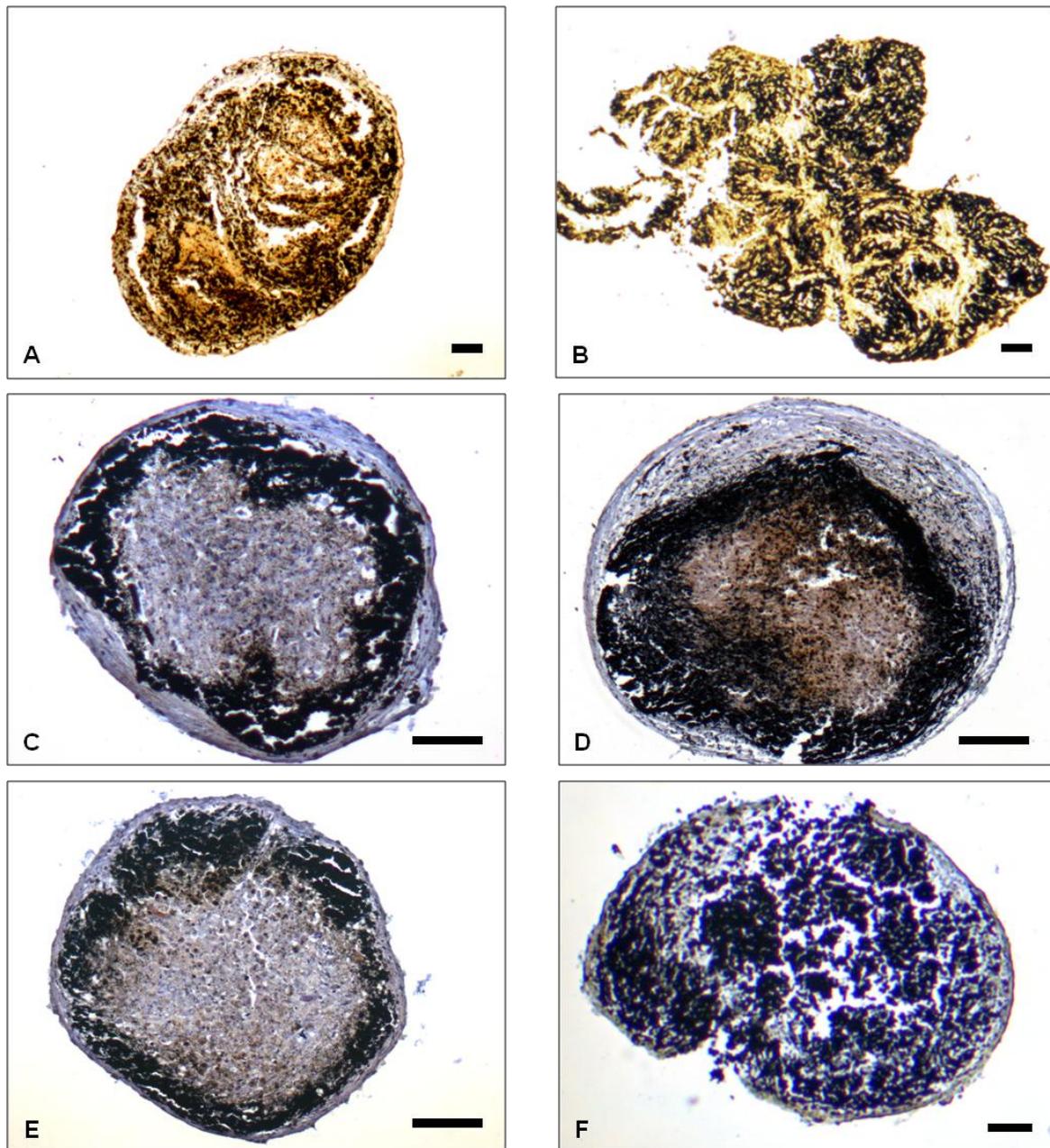


Abb. 12 Histomorphologie osteogene Differenzierung

(A) KM-MSC und **(B)** Fett-MSC selbstgeformte Pellets nach 21 Tagen osteogene Differenzierung im Monolayer (von Kossa-Färbung)

(C) und **(E)** KM-MSC nach 2 Wochen osteogener Differenzierung in Pelletkultur

(D) und **(F)** Fett-MSC nach 2 Wochen osteogener Differenzierung in Pelletkultur

(von Kossa-Färbung mit Hämalaun-Gegenfärbung); Balken=100µm

5.2 Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopische Untersuchung der Pellets nach der osteogenen Differenzierung zeigte deutliche Unterschiede zwischen den beiden Zelltypen. KM- MSC zeigten einen großen Reichtum an Zellorganellen (Mitochondrien, raues endoplasmatisches Retikulum) und Vesikeln (Abb. 13A,C) und zeigten eine große Zahl intrazellulärer Aktin- und Intermediärfilamente (Abb. 13A,C und D). Diese intrazellulären Filamente standen in intensiver Verbindung mit einer kollagenfaserreichen extrazellulären Matrix (Abb. 13B und D). Stellenweise zeigte die extrazelluläre Matrix partikuläre Ablagerungen wie sie mit einer frühen Kalzifizierung vereinbar sind sowie die Deposition einer Osteoid-ähnlichen Grundsubstanz (Abb. 13A). Im Gegensatz dazu zeigte sich die von den Fett-MSC gebildete Matrix deutlich ärmer an kollagenen Fasern und wenig strukturiert (Abb.14A und D). Viele Zellen zeigten degenerative Veränderungen mit zahlreichen Heterolysosomen (Abb. 14B,D). Es waren vielfach apoptotische und bereits degenerierte Zellen in Form von Zelldetritus aufzufinden (Abb. 14B,C und D).

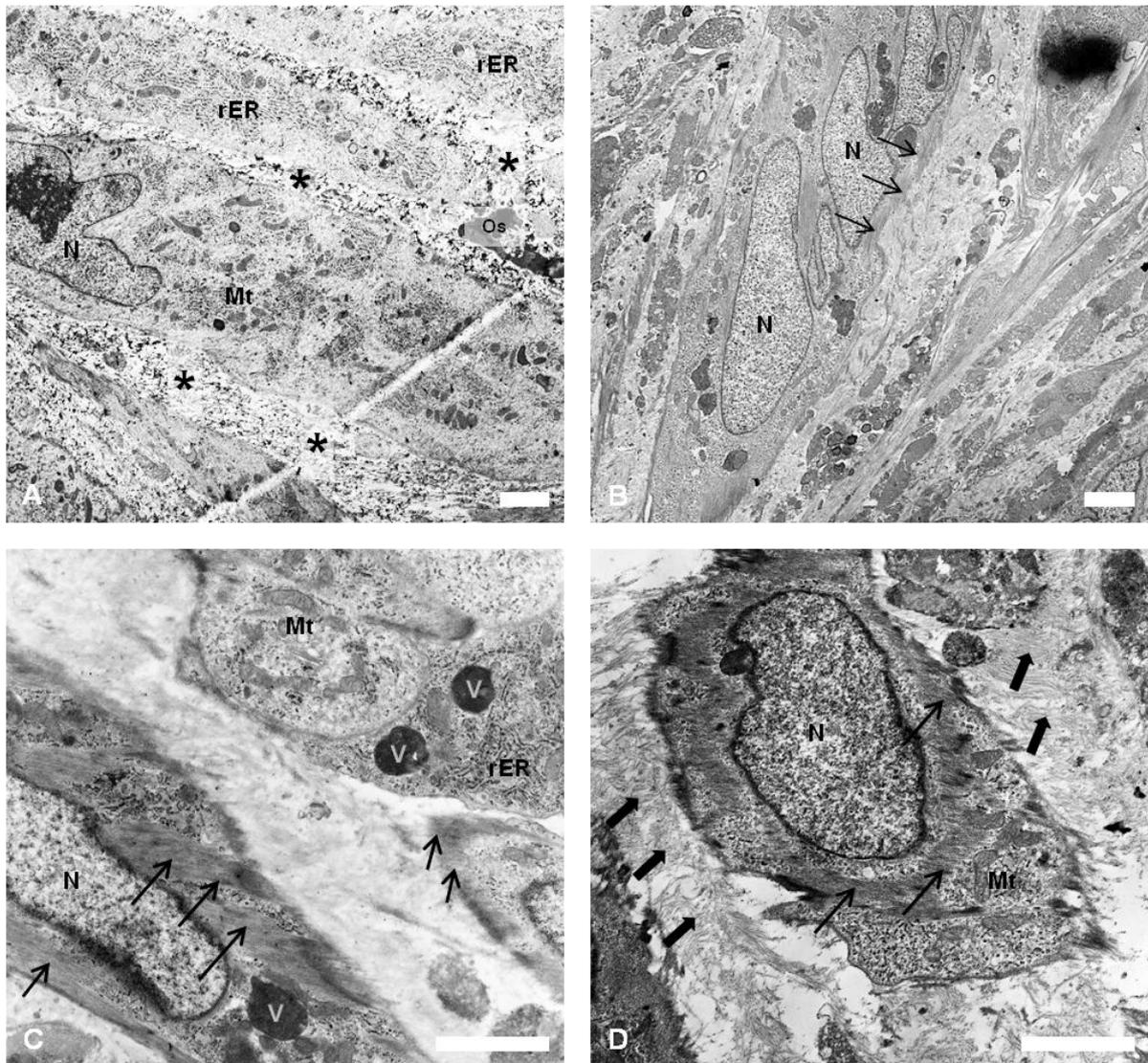


Abb. 13 Ultrastrukturelle Darstellung der osteogenen Differenzierung der KM-MSC

V= Sekret-Vesikel; rER=raues Endoplasmatisches Retikulum; Mt=Mitochondrien; N=Nucleus;
 Os=Osteoid-ähnliche Ablagerung; (→)=Aktin- und Intermediärfilamente; (↗)=kollagene Fasern;
 *=partikuläre Ablagerungen entlang kollagener Fasern;
 Balken=2,5µm.

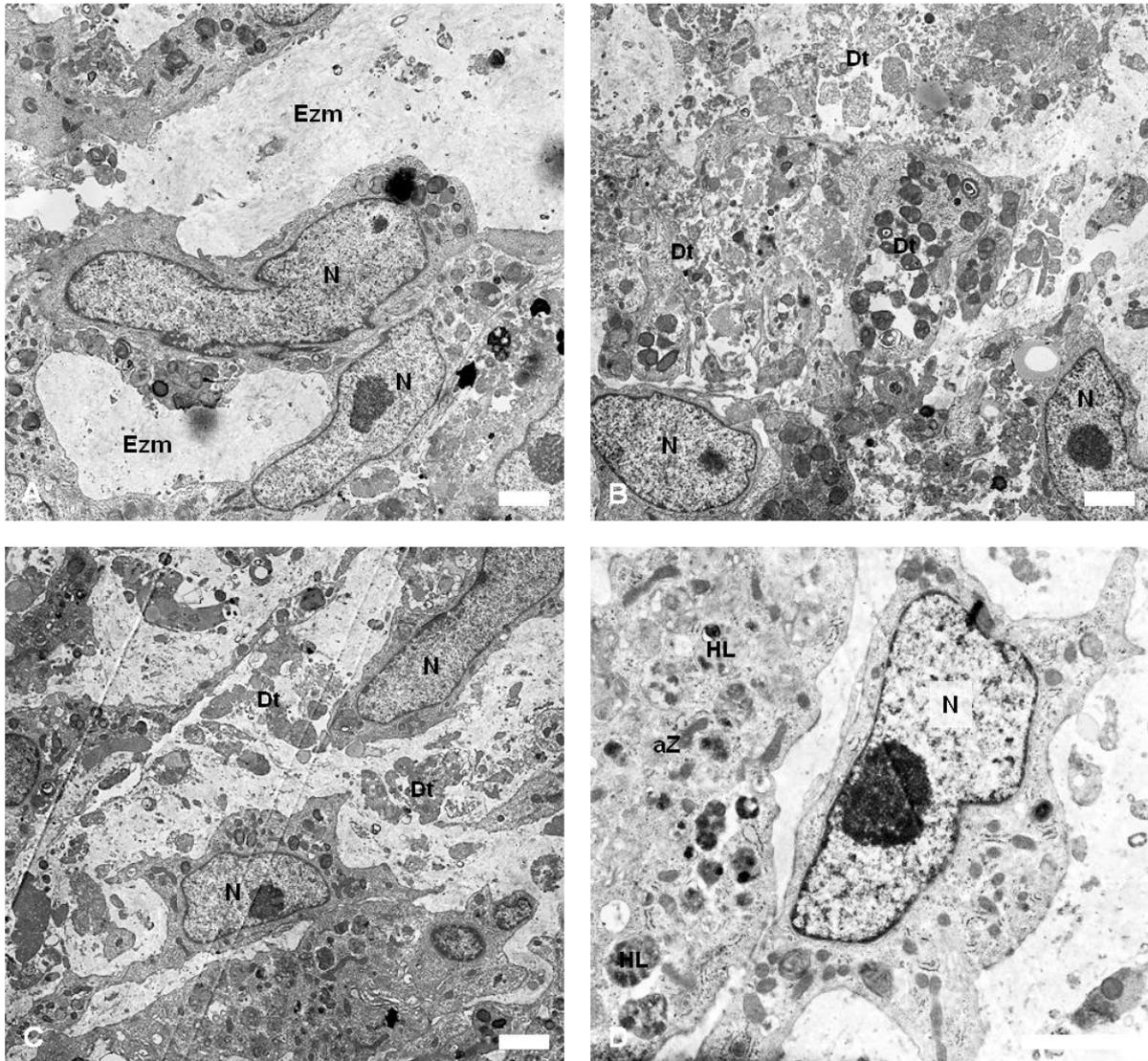


Abb. 14 Ultrastrukturelle Darstellung der osteogenen Differenzierung der Fett-MSC

Dt=Detritus, aZ= apoptotische Zelle; Ezm=Extrazelluläre Matrix; HL=Heterolysosomen;
N= Nucleus;
Balken=2,5µm.

6. OSTEOGENE DIFFERENZIERUNG UNTER ZUSATZ VON CALCIUMCHLORID

6.1 Histomorphologie

Alle unter dem Zusatz von 7,5mM Calciumchlorid kultivierte Pellets wiesen im Gegensatz zum Standardprotokoll eine zuverlässige Calciumdeposition auf, welche mittels von Kossa-Färbung nachgewiesen werden konnte. Es zeigten sich jedoch Unterschiede in der Menge des abgelagerten Calciums zwischen den beiden Gruppen Fett und Knochenmark. Während die KM-MSK Pellets nach 2 Wochen bereits komplett von der Calcium-reichen Matrix durchsetzt waren, zeigten die Fett-MSK nur eine fokale Calcium-Deposition. Die Alcianblau-Färbung der Pellets zeigte darüber hinaus eine deutlich stärkere Akkumulation von Glykosaminoglykanen in den KM-MSK im Gegensatz zu den Fett-MSK. Die in die Matrix eingebetteten KM-MSK zeigten zudem eine an Osteozyten oder Chondrozyten erinnernde Morphologie, während die sich die Fett-MSK weiterhin Fibroblasten-artig zeigten.

ERGEBNISSE

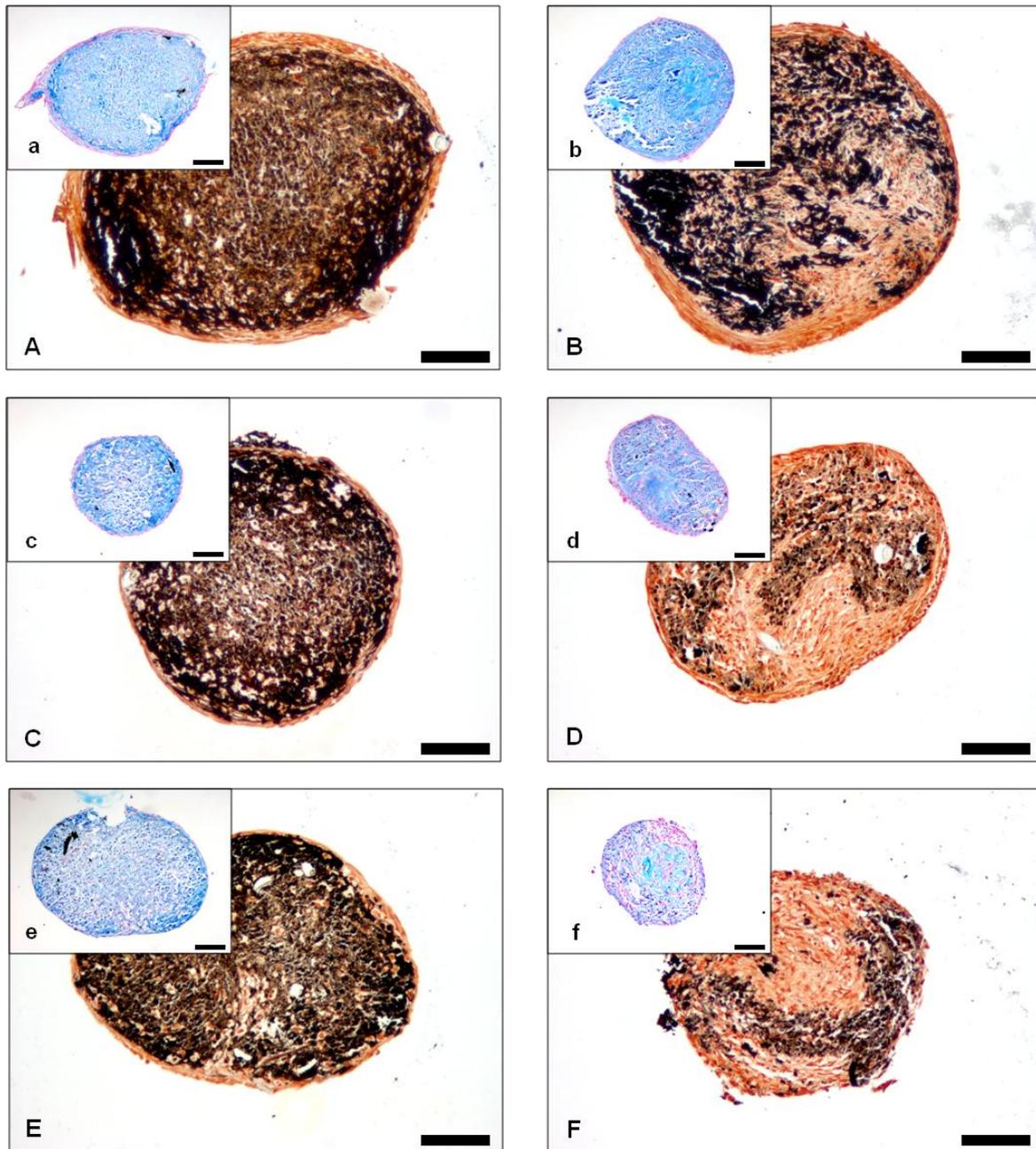


Abb. 15 Osteogene Differenzierung unter dem Zusatz von CaCl_2

(A), (C), (E) KM-MSC nach 14 Tagen Differenzierung, von Kossa-Färbung; Insets (a), (c), (e) gleiche Proben Alcianblau-Färbung;
(B), (D), (F) Fett-MSC nach 14 Tagen Differenzierung, von Kossa-Färbung; Insets (b), (d), (f) gleiche Proben, Alcianblau-Färbung
Balken=100 μm

J. DISKUSSION

1. CHARAKTERISIERUNG DER MSC DES HUNDES

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich sowohl aus dem Knochenmark als auch aus dem Fettgewebe des Hundes erfolgreich MSC isolieren und expandieren lassen. Die isolierten Zellen entsprachen in ihrer Morphologie den Beschreibungen der bereits bekannten Publikation über KM- und Fett-MSK des Hundes (Csaki et al. 2007; Neupane et al. 2008; Vieira et al. 2010). Neu sind jedoch die hier beschriebenen unterschiedlichen Anzeichen der Seneszenz bei den beiden Zellpopulationen. Ähnlich wie Neupane et al. (2008) konnten keine Unterschiede zwischen Fett-MSK aus der abdominalen und subkutanen Fettgewebe festgestellt werden, weshalb hierzu im weiteren Versuchsverlauf keine Unterscheidung mehr gemacht wurde. Im Vergleich zu den KM-MSK ist jedoch festzuhalten, dass die Isolation aus dem Fettgewebe hinsichtlich der Zuverlässigkeit und der Menge zu isolierender MSK deutliche Vorteile bietet. Dies liegt unter anderem an der größeren Menge und der leichteren Zugänglichkeit des Ausgangsgewebes. Wie Black et al. (2007; 2008) bereits gezeigt haben, kann dies einen entscheidenden Vorteil für die klinische Anwendung bringen und erzielt eine bessere Akzeptanz beim Tierbesitzer. Die Isolierung von KM-MSK wäre demgegenüber im Patienten ungleich aufwändiger und zudem schmerzhafter sowie mit einem höheren Infektionsrisiko behaftet.

Die vorliegende Arbeit bietet den ersten direkten Vergleich von KM- und Fett-MSK des Hundes. Die morphologische Analyse mittels FACS bestätigte die bereits in der mikroskopischen Untersuchung auffallend große Ähnlichkeit der beiden Zellpopulationen wie sie bereits durch die vorgenannten Autoren beschrieben worden war. Ähnlich homogen zeigten sich beide Populationen für die Expression des Pluripotenzmarkers Oct4, der bisher nur in caninen Fett-MSK nachgewiesen worden war, sowie für die Oberflächenexpression des MSK-typischen CD90-Antigens, das von über 90% der Zellen beider Populationen exprimiert wurde (Pan et al. 2002; Neupane et al. 2008; Dominici et al. 2006). Darüber hinaus konnten in verschiedenen Proben beider Gruppen die Expression früher Transkriptionsfaktoren der klassischen

DISKUSSION

mesenchymalen Differenzierungswege Knochen, Knorpel und Fett nachgewiesen werden (Chawla et al. 1994; Lefebvre et al. 1998; Marie 2008). Dies kann als Indikator für die Multipotenz und Plastizität der Zellen gewertet werden, wie sie auch in anderen Spezies gefunden wurde (Zuk et al. 2002; Kamishina et al. 2006; Liu et al. 2007).

Neben den Untersuchungen zu den Stammzeleigenschaften und der Morphologie der Zellen wurden auch Kultureigenschaften sowie die Populationsverdopplungszeit und das Migrationsverhalten untersucht. Nicht nur im Hinblick auf die einfachere Zugänglichkeit und der in der Regel größeren zu gewinnenden Gewebemenge zeigten sich die Fett-MSC hier den KM-MSC überlegen. Bezüglich der Kultivierung konnten Fett-MSC im Vergleich zu KM-MSC nach der ersten Aussaat in der Regel deutlich früher passagiert und damit weitervermehrt werden. Auch reichten deutlich weniger Proben insgesamt für Durchführung der verschiedenen Versuche aus, da sich die Isolation als zuverlässiger gestaltete. Dies könnte zum einen an einer höheren Anzahl von MSC in der aus dem Fett isolierten Zellfraktion (stromal vascular fraction = SVF) im Verhältnis zum Knochenmark liegen. Ähnliche Befunde liegen auch beim Menschen vor. Während die Häufigkeit von KM-MSC in einer mit Ficoll isolierten Zellpopulation beim Menschen mit 0,01 bis 0,001% angegeben wird, beträgt die Häufigkeit bei humanen Fett-MSC je nach Autor zwischen 2 – 30 % (Pittenger et al. 1999; Ugarte et al. 2003; Zhu et al. 2008). Für die KM-MSC des Hundes bestimmten Kadiyala et al. (1997) eine Häufigkeit von 0,004%, das heißt eine Stammzelle pro $2,5 \times 10^4$ kernhaltigen, mittels eines Ficoll-Gradienten isolierten Zellen. Eine Häufigkeitsangabe für die Fett-MSC des Hundes ist bisher noch nicht bekannt. Da jedoch auch bei anderen Spezies eine deutliche höhere Menge an Fett-MSC im Vergleich zu KM-MSC gefunden werden kann, liegt die Vermutung nahe, dass dies auch für den Hund zutrifft (Vidal et al. 2007). Die vorliegende Arbeit liefert hierfür Hinweise, obwohl weitere Untersuchungen notwendig sind, um diese Annahme zu verifizieren. Gemeinsam mit der in dieser Arbeit festgestellten deutlich kürzeren Populationsverdopplungszeit könnte dies jedoch der Grund sein, weshalb die Kultivierung caniner Fett-MSC deutlich erfolgreicher und schneller gelang als die der KM-MSC. In ähnlicher Weise konnte auch bei Mensch und Pferd eine deutlich kürzere Populationsverdopplungszeit von Fett-MSC im Vergleich zu KM-MSC gezeigt

DISKUSSION

werden (Lee et al. 2004; Colleoni et al. 2009; Raabe et al. 2011). Hinsichtlich der Kultureigenschaften gilt es darüber hinaus festzuhalten, dass für die Kultivierung und Expansion der Fett-MSK das Standardmedium DMEM und 10%FBS ausreichend waren, wie es auch für Fett-MSK anderer Spezies beschrieben wird (Zuk et al. 2002; Vidal et al. 2007). Demgegenüber machten Vorversuche mit den KM-MSK deutlich, dass sie das mit Aminosäuren-angereicherte α MEM Medium mit mindestens 20% FBS Zusatz benötigen, um eine angemessene und mit den Fett-MSK annähernd vergleichbare Proliferation zu zeigen. Diese Beobachtungen waren unserer Arbeitsgruppe von den KM-MSK des Menschen und des Pferdes bekannt und sind bereits beschrieben worden (Arnhold et al. 2006a; Arnhold et al. 2006b; Arnhold et al. 2007). Diese Tatsache spielt nicht nur für die Vermehrung der Zellen in Kultur eine Rolle, sondern könnte im Hinblick auf eine potentielle therapeutische Anwendung vor allem im Bezug auf die während einer Kultivierung entstehenden Kosten bedeutsam werden.

Ein weiterer wichtiger Faktor im Hinblick auf die therapeutische Anwendung ist die aktive Migration der Zellen in ein Wundgebiet. Verschiedene Autoren haben gezeigt, dass MSK, wenn sie in ein Wundgebiet appliziert werden, gezielt in die geschädigten Gewebe migrieren und dort aktiv zur Wundheilung beitragen (Murphy et al. 2003; Barry et al. 2004a). Um die Fähigkeit zur Migration zu untersuchen und zu vergleichen, entwickelten Liang et al. (2007) ein *in vitro* Wundheilungsassay, das auch in dieser Arbeit Anwendung fand. Hierbei zeigten beide Zellpopulationen ein zügiges Einwandern in das artifiziell angelegte Wundgebiet. Statistisch zeigte sich hier zwischen den beiden Gruppen kein Unterschied, wenn auch die KM-MSK tendenziell etwas schneller einzuwandern schienen. Dies ist bemerkenswert, da durch ihre längere Populationsverdopplungszeit eher mit einem langsameren Wundverschluss zu rechnen gewesen wäre. Vor diesem Hintergrund könnte die beobachtete Tendenz in unseren Versuchen für ein tatsächlich schnelleres Migrationsverhalten und damit in diesem Falle für eine Überlegenheit der KM-MSK gegenüber den Fett-MSK sprechen.

2. CHONDROGENE DIFFERENZIERUNG

Wie bereits in der Einleitung dieser Arbeit erwähnt, birgt der Einsatz von MSC bei der Osteoarthritis des Hundes sowie bei der Knorpelregeneration einen Erfolg versprechenden Ansatz. Erste Studien bei denen ein frisch aus dem Fettgewebe isoliertes, potentiell Fett-MSK enthaltendes Zellgemisch in die Gelenke von Hunden mit Osteoarthritis gespritzt wurde, zeigten vielversprechende Ergebnisse (Black et al. 2007; Black et al. 2008). Allerdings blieb die Frage offen, ob die positiven Effekte auf eine tatsächliche Integration der Zellen in den Knorpel oder aber die regenerationsfördernden und entzündungshemmenden Zytokine der MSC zurückzuführen war (Caplan et al. 2006). Studien bei anderen Spezies zeigten jedoch die erfolgreiche Integration von MSC in den neu gebildeten Knorpel und bewiesen damit die Differenzierungsfähigkeit der Zellen *in vivo* (Lee et al. 2007; Mokbel et al. 2011). Darüber hinaus zeigte eine Studie in Minipigs und eine klinische Studie im Menschen, dass kollagene Trägermaterialien, die mit MSC beladen sind, deutlich zur Verbesserung der Heilung tiefgreifender Knorpeldefekte beitragen können. In beiden Studien differenzierten die MSC in Knorpel und trugen deutlich zur Produktion neuer Knorpelmatrix bei (Kuroda et al. 2007; Jung et al. 2009b). Dies gibt Grund zu der Annahme, dass in einem nächsten Schritt Biomaterialien mit bereits vordifferenzierten MSC einen entscheidenden Beitrag zur schnelleren Regeneration von Knorpeldefekten leisten könnten.

Verschiedene Autoren zeigten bereits die *in vitro* Differenzierung von MSC in Knorpel durch Kultivierung in Low Glucose DMEM Medium unter Serumentzug und dem Zusatz von Dexamethason und Isoformen von TGF β . Dabei wurde die Differenzierung sowohl in Form einer Hochdichte-Kultur im Monolayer als auch in Pelletform beschrieben (Pittenger et al. 1999; Lin et al. 2005; Liu et al. 2007). Die Pelletform eignete sich gut für die histologische und elektronenmikroskopische Aufarbeitung. Durch die geringe Pelletgröße und Zellzahl bereitete sie für die RNA-Extraktion jedoch Probleme. Aus diesem Grund wurden beide Kultivierungsformen parallel angewendet.

Bereits nach 10 Tagen Differenzierung zeigten sich hier Unterschiede zwischen den KM- und Fett-MSK, die nach 24 Tagen deutlicher wurden. Die in dieser Arbeit

DISKUSSION

gezeigten morphologischen Unterschiede zwischen KM- und Fett-MSC stehen im Einklang mit den Ergebnissen von vergleichenden Studien bei Mensch und Pferd (Im et al. 2005; Liu et al. 2007; Vidal et al. 2008). In ähnlicher Weise zeigten auch hier Fett-MSC unter dem chondrogenen Standardprotokoll weiterhin eine Fibroblastenartige Gestalt und produzierten deutlich weniger Glycosaminoglycan-haltige Matrix als die KM-MSC. Ebenso wie beim Hund zeigten Vidal et al. (2008) beim Pferd mittels TEM, dass Fett-MSC deutlich weniger kollagene Fasern und Fibrillen bildeten. Sieht man diese morphologischen Unterschiede zusammen mit den Ergebnissen der quantitativen Genexpressionsanalyse des chondrogenen Haupttranskriptionsfaktors Sox9 sowie der Expression von Collagen 2A1 mRNA, wird klar, dass die chondrogene Differenzierung der Fett-MSC unter dem angewendeten Protokoll beeinträchtigt war. Während die KM-MSC Sox9 erwartungsgemäß aufregulierten, wurde die Expression in den Fett-MSC herunter reguliert. Da Sox9 als Transkriptionsfaktor die Expression von Collagen 2A1 direkt reguliert, liefert diese Tatsache zeitgleich auch die Erklärung für die fehlende Collagen 2A1 Expression bei den Fett-MSC im vorliegenden Versuch (Bell et al. 1997). Ähnliche Unterschiede in der Genexpression zwischen KM- und Fett-MSC nach chondrogener Differenzierung fanden Huang et al. beim Menschen (Huang et al. 2005). Im Gegensatz dazu waren Neupane et al. in ihrer Studie zur Isolation und Charakterisierung von caninen Fett-MSC in der Lage, eine Expression von Collagen 2A1 nach der chondrogenen Differenzierung nachzuweisen (Neupane et al. 2008). Gleichzeitig erreichten sie auch morphologisch deutlich bessere Ergebnisse. Ein wesentlicher Unterschied zu dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Protokoll besteht dabei darin, dass die Gruppe von Neupane et al. ein Protokoll ohne den Zusatz von Dexamethason verwendete. Da Dexamethason bekanntermaßen die Expression von Sox9 in Chondroblasten dosisabhängig verstärkt, wurde es bisher routinemäßig und erfolgreich in der chondrogenen Differenzierung von KM-MSC verwendet (Sekiya et al. 2001). Es mehren sich jedoch Hinweise, dass es sich auf die chondrogene Differenzierung von Fett-MSC eher hemmend auswirkt. Awad et al. untersuchten den Dosis-abhängigen Einfluss von Dexamethason auf die chondrogene Differenzierung von humanen Fett-MSC und konnten dabei nachweisen, dass bei Fett-MSC der Zusatz von Dexamethason einen hemmenden Effekt auf die Proteoglycan-Synthese hatte (Awad

DISKUSSION

et al. 2003). Dies könnte eine Erklärung für das deutlich schlechtere Ergebnis der chondrogenen Differenzierung auch in den vorliegenden Versuchen sein. Eine andere mögliche Begründung liefert eine Studie von Estes et al. (2006). Sie testeten verschiedene Protokolle zur chondrogenen Differenzierung von humanen Fett-MSCs mit und ohne Dexamethason sowie dem Zusatz verschiedener Wachstumsfaktoren. Dabei gelang es Ihnen nachzuweisen, dass die Expression von Collagen 2A1 in Fett-MSCs mit einem Protokoll unter Zusatz von BMP-6 ohne Dexamethason deutlich verstärkt werden konnte. Auch die Expression von Glycosaminoglycanen wurde unter diesem Protokoll deutlich verstärkt, was auch zu morphologisch besseren Ergebnissen führte. Die Erklärung für diese fulminante Verbesserung durch die Verwendung von BMP-6 gegenüber dem standardmäßig verwendeten TGF β 1, lieferte die Arbeit von Hennig et al. (2007). Sie konnten nachweisen, dass menschliche Fett-MSCs den TGF β 1-Rezeptor im Gegensatz zu KM-MSCs nicht konstitutiv exprimieren und damit auf den Zusatz von TGF β 1 allein nicht ansprechen können. Wie die Gruppe zeigte, war jedoch BMP-6 in der Lage, die Expression des TGF β 1-Rezeptors in den Fett-MSCs zu induzieren, und sie erzielten mit einer Kombination von TGF β 1 und BMP-6 die besten Ergebnisse. Ähnliche Verhältnisse könnten auch beim Hund vorliegen, so dass vor allem aufgrund der hervorragenden Kultureigenschaften der caninen Fett-MSCs weitere Versuche mit verschiedenen Wachstumsfaktoren und ohne den Zusatz von Dexamethason sinnvoll erscheinen.

Bezüglich der Expressionsergebnisse der KM-MSCs fielen in der vorliegenden Arbeit trotz der einheitlichen Grundtendenz bei der Differenzierung vor allem die großen interindividuellen Unterschiede auf. Derartige Unterschiede zwischen verschiedenen Patienten wurden ebenfalls bereits beim Menschen beschrieben (Huang et al. 2005). Worauf diese individuellen Unterschiede beruhen, ist leider bisher nicht bekannt. Weitere Studien, die die Unterschiede mit dem Alter der Spender und der genauen Herkunft der Zellen, insbesondere der Krankheitsvorgeschichte, in Verbindung bringen, erscheinen hier sinnvoll. In der vorliegenden Arbeit wurde mit Proben aus der Klinik gearbeitet. Hierbei ist es denkbar, dass die unterschiedliche Krankheitsvorgeschichte einen Einfluss auf die isolierten Zellen ausübte. MSCs, die aus einem Femurkopf in Folge einer Fraktur isoliert wurden könnten beispielsweise durch den Einfluss lokaler Zytokine und Entzündungsmediatoren bereits

vordifferenziert sein. Diese MSC könnten beispielsweise bessere Grundvoraussetzungen für die Differenzierung besitzen als MSC, die aus einem osteoarthritisch veränderten Femurkopf isoliert wurden. Im Zuge dieser Überlegungen stellt sich auch die Frage, ob das jeweilige Mikromilieu, aus dem die KM- und Fett-MSK entstammen, einen Einfluss auf ihre Differenzierungsfähigkeit ausübt. Entsprechende Studien haben Liu et al. mittels Microarray bei menschlichen MSC durchgeführt (Liu et al. 2007). Sie kamen dabei zu dem Ergebnis, dass KM-MSK unter Umständen auf Grund ihrer konstitutiven Genexpression bessere Voraussetzungen für die chondrogene und osteogene Differenzierung mitbringen, während Fett-MSK besser in Fettgewebe differenzieren. Aus biologischer Sicht macht diese Vordeterminierung auf das jeweilige Heimatgewebe natürlich Sinn, da sie die schnellstmögliche Regeneration des jeweiligen Gewebes ermöglicht, und erscheint nicht zuletzt deshalb plausibel. Die bereits erwähnten Studien von Awad et al. und Hennig et al. zeigen jedoch, dass die schlechteren Grundvoraussetzungen der Fett-MSK durch den Zusatz entsprechender Wachstumsfaktoren überwunden und die entsprechende Genexpression induziert werden kann. Dies gibt Grund zu der Hoffnung, dass man in weiteren Versuchen auch das chondrogene Potential der Fett-MSK des Hundes verbessern kann, um die positiven Kultureigenschaften dieser MSC Population ausnutzen zu können.

3. OSTEOGENE DIFFERENZIERUNG

Der Vergleich der osteogenen Differenzierung zeigte zunächst große Ähnlichkeit zwischen den KM- und den Fett-MSK des Hundes. In der dreiwöchigen Differenzierung als Monolayer zeigten beide Zellpopulationen ein ähnliches Verhalten, indem sie dazu neigten sich durch eine extensiv gebildete Matrix zu einer zusammenhängenden Zelllage zu verbinden, sich von der Kulturschale abzulösen und zu kontrahieren. Die gleiche Beobachtung machten bereits Kadiyala et al. in ihrer Erstbeschreibung der osteogenen Differenzierung caniner KM-MSK (Kadiyala et al. 1997). Neupane et al. beschrieben das gleiche Phänomen während der osteogenen Differenzierung von caninen Fett-MSK (Neupane et al. 2008). In den Wiederholungsversuchen zeigte sich darüber hinaus, dass dieses Zellverhalten unter der osteogenen Differenzierung mit hoher Beständigkeit auftrat, jedoch ein Nachweis

DISKUSSION

von Calcium mittels von Kossa-Färbung nicht immer gelang. Dies könnte mit der Kultivierungsdauer in der vorliegenden Arbeit zusammenhängen. So beschrieben ebenfalls Kadiyala et al., dass die Ablagerung einer Calcium-reichen Matrix bei den von ihnen untersuchten caninen KM-MSC frühestens nach 21 Tagen, zum Teil aber auch erst nach 28 Tagen mittels von Kossa nachgewiesen werden konnte (Kadiyala et al. 1997). Die Gruppe quantifizierte zudem die Aktivität der Alkalischen Phosphatase nach der Länge der osteogenen Differenzierung und konnte auch hier erst ab Tag 21 signifikante Unterschiede zur Negativkontrolle feststellen. Eine weitere Ursache für die nicht regelmäßig nachweisbare Kalzifizierung könnte ähnlich wie bei der chondrogenen Differenzierung im verwendeten Differenzierungsprotokoll liegen. In der vorliegenden Arbeit wurde ein weit verbreitetes Differenzierungsprotokoll verwendet wie es bei vielen Spezies erfolgreich Anwendung findet (Pittenger et al. 1999; Arnhold et al. 2007). Volk et al. konnten jedoch zeigen, dass canine KM-MSC unter einem modifizierten Protokoll besser osteogen differenzierten (Volk et al. 2005). Sie konnten zeigen, dass im Gegensatz zur osteogenen Differenzierung von KM-MSC des Menschen und der Ratte Dexamethason bei der osteogenen Differenzierung von KM-MSC des Hundes einen eher hemmenden Einfluss hat. Sie testeten darüber hinaus BMP-2 und Ascorbinsäure in Kombination oder allein zur osteogenen Differenzierung der Hunde- MSC und identifizierten die Kombination aus beiden Stoffen als effektivstes Protokoll. Interessanterweise zeigten sie aber auch, dass auch mit dem optimierten Protokoll große inter-individuelle Unterschiede in der osteogenen Induktion auftraten und dass der osteoinduktive Effekt von Ascorbinsäure beim Hund altersabhängig war. Neben dem eventuell nicht optimalen Differenzierungsprotokoll könnten also auch diese Effekte für die nicht ganz homogenen Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit verantwortlich sein.

Da die Zellen selbst ein dreidimensionales Wachstum anzustreben schienen, war es nahe liegend die osteogene Differenzierung bereits in 3-dimensionaler Form zu beginnen. In ähnlicher Weise hatten bereits Csaki et al. in ihren Studien an caninen KM-MSC die osteogene Differenzierung in einer von ihnen etablierten 3-D Kultur gezeigt (Csaki et al. 2007; Csaki et al. 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde hierfür die Pelletkultur aus der chondrogenen Differenzierung adaptiert (Johnstone et al.

DISKUSSION

1998; Sekiya et al. 2001). Bei der chondrogenen Differenzierung ist bekannt, dass die 3-dimensionale Kulturform die Differenzierung positiv beeinflusst, da die Zellen durch die intensive Interaktion mit der extrazellulären Matrix zur Differenzierung angeregt werden (Erickson et al. 2002). Dies trifft ebenfalls auf die osteogene Differenzierung zu. Auch im Monolayer ist die Kalzifizierung in der Regel nur in den während der osteogenen Differenzierung ausgebildeten Knötchen nachzuweisen (Neupane et al. 2008; Vidal et al. 2007; Pittenger et al. 1999). Weiterhin lieferten Untersuchungen zur Knochenmineralisierung durch Osteoblasten auf molekularer Ebene Hinweise, dass die 3-dimensionale Kultur essentiell ist, um die Expression osteogener Marker zu induzieren (Ogata 2008).

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass sich die Produktion einer Calcium-reichen Matrix durch Kultivierung in einer 3-dimensionalen Pelletkultur in beiden Zellpopulation bereits nach 2 Wochen induzieren ließ. Dies ist auf die intensivere Zell-Matrix-Interaktion in der 3-dimensionalen Kulturform zurückzuführen, welche bekanntermaßen die Kalzifizierung reguliert (Schneider et al. 2001). Eine Weiterentwicklung dieser Pelletkultur könnte die osteogene Differenzierung auf dreidimensionalen Matrices sein, um bereits vordifferenzierte MSC auf einem transplantierbaren Träger für die klinische Anwendung zur Verfügung zu haben. Wie schon in der Einleitung erwähnt, zeigten bereits Bruder et al. und Arinzeh et al., dass solche MSC-besiedelte Matrices, bei der Überbrückung großer Knochendefekt hilfreich sein können (Bruder et al. 1998; Arinzeh et al. 2003). Ein großes Problem war hier jedoch, dass die verwendeten Keramikzylinder nicht schnell genug resorbiert werden konnten und brüchig wurden. Einen Ausweg aus diesem Dilemma könnten neuartige resorbierbare Biomaterialien darstellen, deren Resorbierbarkeit an die Knochenregeneration angepasst ist. Studien an KM-MSK von Mensch und Kaninchen zeigten mittlerweile, dass heutzutage resorbierbare Biopolymere zur Verfügung stehen, die *in vitro* sogar in der Lage waren, die Osteogenese von MSC zu verbessern (Calvert et al. 2000; Chastain et al. 2006). Hierbei konnte gezeigt werden, dass Biopolymere wie Polylactid-co-glycolid (PLGA) nicht nur die extrazelluläre Matrix zu Beginn der Differenzierung ersetzen, sondern über die Zell-Matrix-Interaktion auch die Expression osteogener Marker einleiten können. Weitere

DISKUSSION

Versuche könnten zeigen, ob sich auch die osteogene Differenzierung caniner MSC mit Hilfe von Biopolymeren noch weiter verbessern und beschleunigen lässt.

Während sich makroskopisch sowohl in der Monolayer-Kultur als auch in der Pelletkultur zwischen den KM- und Fett-MSC zunächst wenige Unterschiede zeigten, waren die Unterschiede auf der ultrastrukturellen Seite sehr viel deutlicher. Wie auch bei der chondrogenen Differenzierung zeigten sich die KM-MSC hinsichtlich der Matrixproduktion und Mineralisation überlegen. Auch beim Menschen und beim Pferd wurden morphologische Unterschiede in der osteogenen Differenzierung der beiden MSC Typen beschrieben (Im et al. 2005; Vidal et al. 2007). Während Vidal et al. vor allem über eine zeitlich verzögerte osteogene Differenzierung der Fett-MSC gegenüber den KM-MSC des Pferdes berichtete, wiesen Im et al. bei menschlichen Fett-MSC auch eine verminderte Mineralisierung nach. Beide Gruppen untersuchten jedoch nicht auf ultrastruktureller Ebene. Die intensive Zell-Matrix-Interaktion, die die KM-MSC in den Untersuchungen mittels TEM in der vorliegenden Studie zeigen, spricht für eine deutliche bessere osteogene Induktion im Vergleich zu den Fett-MSC. Ebenso sind deutlich mehr kollagene Fasern nachweisbar. Neben dem bereits eingangs erwähnten suboptimalen Differenzierungsprotokoll, könnte auch die konstitutionelle Genexpression für die bessere Osteogenese der KM-MSC verantwortlich sein. So fanden Liu et al. in ihrer vergleichenden Microarray-Studie von humanen MSC eine unterschiedliche Genexpression von KM- und Fett-MSC vor und nach der Differenzierung (Liu et al. 2007). Diese korrelierte ebenfalls mit einem morphologisch schlechteren Ergebnis der osteogenen Differenzierung bei den Fett-MSC. Die Gruppe postulierte, dass trotz vieler Gemeinsamkeiten der beiden MSC-Populationen, sie durch ihre Herkunft bereits in gewisser Weise prädeterminiert seien. Aufgrund ihrer Analysen des Differenzierungspotentials auf molekularer Ebene, vermuteten sie, dass KM-MSC eine bessere osteogene und chondrogene, Fett-MSC jedoch eine bessere adipogene Differenzierbarkeit mitbrächten. Eine Prädeterminierung, die auch aus biologischer Sicht Sinn zu machen scheint.

Der Zusatz von CaCl_2 zur osteogenen Differenzierung zeigte in der vorliegenden Arbeit die Unterschiede zwischen KM- und Fett-MSC bereits histomorphologisch. Während die KM-MSC in der Lage waren auf das erhöhte Calciumangebot mit einer

DISKUSSION

verstärkten Matrixmineralisierung anzusprechen, zeigten die Fett-MSK eine im Vergleich deutlich geringere Reaktion. Erhöhte Calciumkonzentrationen fördern bekanntermaßen die Differenzierung und Proliferation von Osteoblasten sowie die Matrixmineralisierung (Sharan et al. 2008; Theman et al. 2009). Gleichzeitig hemmen sie die Differenzierung und Proliferation von Osteoklasten. Solche erhöhten Calciumkonzentrationen treten natürlicherweise bei Ab- und Umbau von Knochen auf wie sie im Rahmen des Remodelling zeitlebens beim Säuger stattfinden. Die dabei lokal auftretenden Ca^{2+} -Konzentrationen werden auf 8-40mM geschätzt (Dvorak et al. 2004a). Wie die Effekte von Calcium auf die Zellen während der Osteogenese vermittelt werden, ist jedoch noch unklar. Zwar konnte die Existenz des extrazellulären Calciumrezeptors (CaR) in verschiedenen Osteoblasten-Kulturen nachgewiesen werden, jedoch konnten mit Agonisten am CaR die Effekte nicht vollständig nachgeahmt werden. Dies spricht dafür, dass andere oder zusätzliche Mechanismen zur Calcium-Detektion durch die Zellen existieren oder Calcium in seiner ionisierten Form einen direkten Effekt vermittelt. Es wird postuliert, dass hohe Calciumkonzentrationen im Knochenkompartiment Stammzellen aus den benachbarten Kompartimenten (Knochenmark/ Periost) anlocken, welche sich dann vor Ort zu Osteoblasten differenzieren (Sugimoto et al. 1993). Es lag daher nahe anzunehmen, dass die Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration im osteogenen Medium auch einen positiven Effekt auf die osteogene Differenzierung der MSC hätte. Studien von Tryankowski et al. zum Zusatz verschiedener Konzentrationen von CaCl_2 zur osteogenen Differenzierung von equinen MSC zeigten einen solchen positiven Einfluss auf die Matrixmineralisierung (Tryankowski et al. 2010). Hierbei wurden Konzentrationen von 1mM, 5mM, 10mM und 20mM getestet und der positive Einfluss auf die Matrixmineralisierung zeigte sich dosisabhängig mit dem größten Effekt bei Zusatz von 20mM. Bei Konzentrationen von mehr als 10mM Ca^{2+} zeigte sich jedoch darüber hinaus ein antiproliferativer Effekt auf die MSC. Aus diesem Grunde wurde in der vorliegenden Arbeit eine mittlere Ca^{2+} -Konzentration von 7,5 mM gewählt. Mit diesem Zusatz konnte die osteogene Differenzierung der MSC beider Herkünfte deutlich beschleunigt und die Matrixmineralisierung verbessert werden. Die Fett-MSK sprachen jedoch deutlich geringer auf den Ca^{2+} -Zusatz an als die KM-MSK und zeigten im Vergleich eine geringer ausgeprägte

DISKUSSION

Matrixmineralisierung. Auch hier ist eine Prädeterminierung in Richtung adipogener Differenzierung bei den Fett-MSK wie sie bereits oben diskutiert wurde als Ursache denkbar (Liu et al. 2007). Es ist vorstellbar, dass den Fett-MSK aufgrund ihrer Herkunft aus einem eher Knochen-fernen Kompartiment eventuell konstitutionell die Expression von Calcium-Rezeptoren und damit die Ansprechbarkeit auf Calcium fehlt. Auffällig war darüber hinaus die deutlich stärkere Matrixproduktion durch die KM-MSK bei der osteogenen Differenzierung unter Ca^{2+} -Zusatz sowie die Lakunen-artige Einlagerung der induzierten MSK in die produzierte Matrix. Es konnte gezeigt werden, dass erhöhte Ca^{2+} -Konzentrationen in Osteoblasten sowohl die Expression von Collagen I wie auch die typischer Matrixproteine wie Osteocalcin und Osteopontin induzieren (Dvorak et al. 2004a; Dvorak et al. 2004b). Die reichliche Produktion von Matrix könnte damit ein weiterer Hinweis darauf sein, dass KM-MSK aufgrund ihrer Herkunft besser in der Lage sind auf die erhöhte Ca^{2+} -Konzentration anzusprechen. Die dabei gebildeten Lakunen erinnerten ebenso wie die stark hyaline Matrix in der Alcianblau-Färbung zunächst stark an die chondrogene Differenzierung. Jedoch enthält auch unmineralisiertes Osteoid in großen Mengen Mukopolysaccharide wie Chondroitinsulfat, welche sich ebenfalls mittels Alcianblau anfärben lassen (Toole et al. 1977). Es liegt dennoch der Gedanke an eine zunächst chondrogene Differenzierung der MSK mit einer anschließenden Mineralisierung und einem Umbau in Knochen im Sinne einer enchondralen Ossifikation nahe. Dem widerspricht jedoch, dass die Erhöhung der Calciumkonzentration die Expression von Aggrecan und Proteoglycanen in humanen Chondroblasten bekanntermaßen blockiert (Theman et al. 2009). Eine ähnliche Lakunen-Bildung fanden Eslaminejad et al. in ihrer Studie zur osteogenen Differenzierung caniner KM-MSK unter einem Standardprotokoll (Eslaminejad et al. 2010). Sie untersuchten die differenzierten Kulturen auf die Expression chondrogener Marker und konnten keinerlei Expression Knorpel-relevanter Gene nachweisen, weshalb sie eine desmale Ossifikation postulierten. Ultrastrukturelle, immunhistochemische und molekularbiologische Untersuchung könnten weiterhelfen, die Natur der gebildeten Matrix und den Differenzierungsweg weiter zu charakterisieren.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die vorliegende Arbeit weitreichende Unterschiede hinsichtlich der osteogenen Differenzierbarkeit der caninen MSK aus

DISKUSSION

Fett und Knochenmark aufdeckt. Dies steht im Einklang mit Beobachtungen aus klinischen Untersuchungen wie sie in der Einleitung Erwähnung fanden (Bruder et al. 1998; Li et al. 2007). Weitreichende molekularbiologische Untersuchungen der Gen- und Proteinexpression der beiden Zellen werden nötig sein, um die Ursachen dieser Unterschiede aufzuklären und Verbesserungen möglich zu machen.

K. ZUSAMMENFASSUNG

Adulte mesenchymale Stammzellen (MSC) können sowohl aus dem Knochenmark als auch aus dem Fettgewebe des Hundes isoliert werden. Ihre immunmodulatorischen Eigenschaften wie auch ihre Differenzierungsfähigkeit in Knochen und Knorpel machen dabei eine Vielzahl möglicher Einsatzgebiete am Patient Hund denkbar. Insbesondere ihr Einsatz bei Osteoarthritis wie auch bei Knochendefekten wurde bereits vielfach diskutiert und ihr heilungsfördernder Effekt in ersten klinischen Studien belegt.

Bisher wurde davon ausgegangen, dass sich MSC beider Herkünfte ebenbürtig seien. Für einen Einsatz in der tiermedizinischen Praxis scheinen MSC aus dem Fettgewebe gegenüber MSC aus dem Knochenmark zunächst viele Vorteile zu bieten: Fettgewebe ist leichter erreichbar, in größeren Mengen gewinnbar und die Entnahme ist weniger schmerzhaft. Jedoch belegen vergleichende Studien in anderen Spezies, dass insbesondere im Hinblick auf das Differenzierungspotential der MSC aus Fett und Knochenmark große Unterschiede vorliegen. Eine derartige Studie fehlte bisher beim Hund und sollte daher Gegenstand der vorliegenden Arbeit sein.

Die vorliegende Arbeit zeigte dabei Gemeinsamkeiten aber auch große Unterschiede zwischen den beiden Populationen auf. Während die sich die Zellen beider Gruppen in ihrer Morphologie, ihrem Migrationsverhalten und der Expression MSC-spezifischer Marker in hohem Maße ähnelten, zeigten sie deutliche Unterschiede bei der Populationsverdopplungszeit und bei der Differenzierung in Knochen- und Knorpelgewebe. Fett-MSC zeigten eine im Vergleich mit den KM-MSC deutlich verkürzte Populationsverdopplungszeit und konnten damit in kürzerer Zeit deutlich stärker vermehrt werden als die KM-MSC. Eine Eigenschaft, die sich aufgrund der Zeit- und Kostenersparnis vorteilhaft für eine klinische Anwendung erweisen könnte. Jedoch zeigten die Fett-MSC eine deutlich schlechtere Ansprechbarkeit auf klassische Protokolle zur chondrogenen und osteogenen Differenzierung. Während die KM-MSC unter der chondrogenen Differenzierung eine Chondroblasten-typische Morphologie annahmen und große Mengen typischer Matrix bildeten, blieben die

ZUSAMMENFASSUNG

Fett-MSCs fibroblastoid und akkumulierten nur wenig Matrix. Die Aufregulation chondrogener Marker blieb in den Fett-MSCs im Gegensatz zu den KM-MSCs vollkommen aus. In der osteogenen Differenzierung waren die Unterschiede histomorphologisch zunächst weniger deutlich, jedoch zeigten insbesondere die ultrastrukturellen Untersuchungen degenerative Veränderungen der Fett-MSCs unter der Differenzierung. Diese Unterschiede konnten mittels eines modifizierten osteogenen Differenzierungsprotokolls unter dem Zusatz von CaCl_2 noch weiter hervorgehoben werden. Während der Zusatz von CaCl_2 bei den KM-MSCs die Matrixmineralisierung deutlich verbesserte, zeigte sich kein solcher Effekt bei der Differenzierung der Fett-MSCs.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Fett-MSCs auf den ersten Blick zwar Vorteile hinsichtlich ihrer Gewinnung und ihrer Vermehrung bieten, sie aber im Vergleich mit den KM-MSCs eine deutlich schlechtere Differenzierbarkeit in Knorpel- und Knochengewebe zeigen. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in anderen Spezies gezeigt. Es ist zu vermuten, dass die MSC aufgrund ihrer Herkunft bereits eine gewisse gewebsspezifische Determinierung mitbringen. Weitere Untersuchungen zur Natur und den Ursachen dieser Determinierung erscheinen nun sinnvoll. Sie könnten helfen, herauszufinden, ob die eingeschränkte Differenzierungsfähigkeit der Fett-MSCs durch Wachstumsfaktoren oder Genmanipulationen überwunden werden kann.

L. SUMMARY

In the dog adult mesenchymal stem cells (MSC) can be isolated from bone marrow as well as from the adipose tissue. Due to their immunomodulatory properties and their capability to differentiate into bone and cartilage there are a multitude of conceivable application fields for MSC in veterinary medicine. In particular, their application in the treatment of canine osteoarthritis and large bone defects has been widely discussed and a few clinical studies already proofed their beneficial effect.

So far published studies were based on the assumption that MSC of both sources are equal. In respect of a clinical application adipose derived MSC (AD-MSC) seem to offer many advantages compared to bone marrow derived stem cells (BM-MSC): adipose tissue is more easily accessible, attainable in larger amounts and the harvest is less painful. However, comparative studies in other species provide evidence for differences in the chondrogenic and osteogenic differentiation potential of BM- and AS-MSC. So far, no equivalent study existed for canine MSC and was therefore the subject of this thesis.

The presented study revealed both, similarities and differences between canine BM- and AD-MSC. Cells of both groups displayed a remarkable resemblance in morphology, migration ability and expression of MSC-typical markers. In contrast, they showed considerable differences in population doubling time and differentiation capacity into cartilage and bone. Population doubling occurred significantly faster in AD-MSC compared to BM-MSC. This property seems to be advantageous for a clinical application as it could save time and money. However, their differentiation ability along the chondrogenic and osteogenic lineage was much weaker compared to BM-MSC. Whereas BM-MSC displayed a chondroblast-like morphology and accumulated an abundant amount of a well-structured hyaline matrix under chondrogenic differentiation, AD-MSC stayed spindle-shaped and showed only a sparse matrix accumulation. An up-regulation of chondrogenic gene expression was absent in AD-MSC in contrast to BM-MSC. Differences in the osteogenic differentiation ability were not so obvious at first glance. Anyhow, the ultramorphological study of both MSCs revealed degenerative changes in AD-MSC

SUMMARY

following osteogenic differentiation. Under a modified osteogenic differentiation protocol with addition of CaCl_2 these differences became even more pronounced. Whereas the addition of CaCl_2 promoted osteogenic differentiation and matrix mineralization in BM-MSC, there was no such effect in AD-MSC.

In summary it can be stated that AD-MSC possess advantageous features in terms of their accessibility and proliferation capacity. However, compared to BM-MSC their differentiation ability seems to be impaired. Comparative studies in other studies revealed similar results. It can be assumed that in regard to their differentiation ability MSC already possess a certain determination due their tissue specific origin. Further studies about the nature and causes of these differences are necessary. It is conceivable that with further knowledge the differentiation ability of AD-MSC could be restored by supplementation of growth factors or genetic modifications.

M. LITERATURVERZEICHNIS

- Arinzech TL, Peter SJ, Archambault MP, van den Bos C, Gordon S, Kraus K, Smith A, Kadiyala S (2003) Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 85-A (10): 1927–1935.
- Arnhold S, Heiduschka P, Klein H, Absenger Y, Basnaoglu S, Kreppel F, Henke-Fahle S, Kochanek S, Bartz-Schmidt K, Addicks K, Schraermeyer U (2006a) Adenovirally transduced bone marrow stromal cells differentiate into pigment epithelial cells and induce rescue effects in RCS rats. *Investigative ophthalmology & visual science* 47 (9): 4121–4129. doi:10.1167/iovs.04-1501.
- Arnhold S, Klein H, Klinz F, Absenger Y, Schmidt A, Schinköthe T, Brixius K, Kozlowski J, Desai B, Bloch W, Addicks K (2006b) Human bone marrow stroma cells display certain neural characteristics and integrate in the subventricular compartment after injection into the liquor system. *European journal of cell biology* 85 (6): 551–565. doi:10.1016/j.ejcb.2006.01.015.
- Arnhold SJ, Goletz I, Klein H, Stumpf G, Beluche LA, Rohde C, Addicks K, Litzke LF (2007) Isolation and characterization of bone marrow-derived equine mesenchymal stem cells. *American journal of veterinary research* 68 (10): 1095–1105. doi:10.2460/ajvr.68.10.1095.
- Awad HA, Halvorsen YC, Gimble JM, Guilak F (2003) Effects of transforming growth factor beta1 and dexamethasone on the growth and chondrogenic differentiation of adipose-derived stromal cells. *Tissue engineering* 9 (6): 1301–1312. doi:10.1089/10763270360728215.
- Barry FP, Murphy JM (2004a) Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *The international journal of biochemistry & cell biology* 36 (4): 568–584. doi:10.1016/j.biocel.2003.11.001.
- Barry FP, Murphy JM (2004b) Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *The international journal of biochemistry & cell biology* 36 (4): 568–584. doi:10.1016/j.biocel.2003.11.001.
- Bell DM, Leung KK, Wheatley SC, Ng LJ, Zhou S, Ling KW, Sham MH, Koopman P, Tam PP, Cheah KS (1997) SOX9 directly regulates the type-II collagen gene. *Nature genetics* 16 (2): 174–178. doi:10.1038/ng0697-174.
- Berglundh T, Lindhe J (1997) Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss. An experimental study in the dog. *Clinical oral implants research* 8 (2): 117–124.

LITERATURVERZEICHNIS

- Black LL, Gaynor J, Gahring D, Adams C, Aron D, Harman S, Gingerich DA, Harman R (2007) Effect of adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on lameness in dogs with chronic osteoarthritis of the coxofemoral joints: a randomized, double-blinded, multicenter, controlled trial. *Veterinary therapeutics : research in applied veterinary medicine* 8 (4): 272–284.
- Black LL, Gaynor J, Adams C, Dhupa S, Sams AE, Taylor R, Harman S, Gingerich DA, Harman R (2008) Effect of intraarticular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on clinical signs of chronic osteoarthritis of the elbow joint in dogs. *Veterinary therapeutics : research in applied veterinary medicine* 9 (3): 192–200.
- Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, Kadiyala S (1998) The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 80 (7): 985–996.
- Calvert JW, Marra KG, Cook L, Kumta PN, DiMilla PA, Weiss LE (2000) Characterization of osteoblast-like behaviour of cultured bone marrow stromal cells on various polymer surfaces. *Journal of biomedical materials research* 52 (2): 279–284.
- Caplan AI, Dennis JE (2006) Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *Journal of cellular biochemistry* 98 (5): 1076–1084. doi:10.1002/jcb.20886.
- Chang F, Ishii T, Yanai T, Mishima H, Akaogi H, Ogawa T, Ochiai N (2008) Repair of large full-thickness articular cartilage defects by transplantation of autologous uncultured bone-marrow-derived mononuclear cells. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 26 (1): 18–26.
- Chastain SR, Kundu AK, Dhar S, Calvert JW, Putnam AJ (2006) Adhesion of mesenchymal stem cells to polymer scaffolds occurs via distinct ECM ligands and controls their osteogenic differentiation. *Journal of biomedical materials research. Part A* 78 (1): 73–85.
- Chawla A, Schwarz EJ, Dimaculangan DD, Lazar MA (1994) Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation. *Endocrinology* 135 (2): 798–800.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry* 162 (1): 156–159. doi:10.1006/abio.1987.9999.
- Colleoni S, Bottani E, Tessaro I, Mari G, Merlo B, Romagnoli N, Spadari A, Galli C, Lazzari G (2009) Isolation, growth and differentiation of equine mesenchymal stem cells: effect of donor, source, amount of tissue and supplementation with basic fibroblast growth factor. *Veterinary research communications* 33 (8): 811–821. doi:10.1007/s11259-009-9229-0.

- Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen C, Corselli M, Park TS, Andriolo G, Sun B, Zheng B, Zhang L, Norotte C, Teng P, Traas J, Schugar R, Deasy BM, Badylak S, Buhring H, Giacobino J, Lazzari L, Huard J, Péault B (2008) A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell stem cell* 3 (3): 301–313.
- Crovace A, Favia A, Lacitignola L, Di Comite MS, Staffieri F, Francioso E (2008) Use of autologous bone marrow mononuclear cells and cultured bone marrow stromal cells in dogs with orthopaedic lesions. *Veterinary research communications* 32 Suppl 1 (): S39-44.
- Csaki C, Matis U, Mobasheri A, Ye H, Shakibaei M (2007) Chondrogenesis, osteogenesis and adipogenesis of canine mesenchymal stem cells: a biochemical, morphological and ultrastructural study. *Histochemistry and cell biology* 128 (6): 507–520. doi:10.1007/s00418-007-0337-z.
- Csaki C, Matis U, Mobasheri A, Shakibaei M (2009) Co-culture of canine mesenchymal stem cells with primary bone-derived osteoblasts promotes osteogenic differentiation. *Histochemistry and cell biology* 131 (2): 251–266. doi:10.1007/s00418-008-0524-6.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8 (4): 315–317. doi:10.1080/14653240600855905.
- Dvorak MM, Riccardi D (2004a) Ca²⁺ as an extracellular signal in bone. *Cell calcium* 35 (3): 249–255.
- Dvorak MM, Siddiqua A, Ward DT, Carter DH, Dallas SL, Nemeth EF, Riccardi D (2004b) Physiological changes in extracellular calcium concentration directly control osteoblast function in the absence of calciotropic hormones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (14): 5140–5145.
- Erices A, Conget P, Minguell JJ (2000) Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *British journal of haematology* 109 (1): 235–242.
- Erickson GR, Gimble JM, Franklin DM, Rice HE, Awad H, Guilak F (2002) Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochemical and biophysical research communications* 290 (2): 763–769.
- Eslaminejad MB, Taghiyar L (2010) Study of the structure of canine mesenchymal stem cell osteogenic culture. *Anatomia, histologia, embryologia* 39 (5): 446–455.

LITERATURVERZEICHNIS

- Estes BT, Wu AW, Guilak F (2006) Potent induction of chondrocytic differentiation of human adipose-derived adult stem cells by bone morphogenetic protein 6. *Arthritis and rheumatism* 54 (4): 1222–1232. doi:10.1002/art.21779.
- Friedenstein AJ (1976a) Precursor cells of mechanocytes. *International review of cytology* 47 (): 327–359.
- Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN (1976b) Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Experimental hematology* 4 (5): 267–274.
- Frisbie DD, Smith RK (2010) Clinical update on the use of mesenchymal stem cells in equine orthopaedics. *Equine veterinary journal* 42 (1): 86–89. doi:10.2746/042516409X477263.
- Harasen G (2011) Stimulating bone growth in the small animal patient: Grafts and beyond! *The Canadian veterinary journal. La revue vétérinaire canadienne* 52 (2): 199–200.
- Hennig T, Lorenz H, Thiel A, Goetzke K, Dickhut A, Geiger F, Richter W (2007) Reduced chondrogenic potential of adipose tissue derived stromal cells correlates with an altered TGFbeta receptor and BMP profile and is overcome by BMP-6. *Journal of cellular physiology* 211 (3): 682–691. doi:10.1002/jcp.20977.
- Hoffer MJ, Griffon DJ, Schaeffer DJ, Johnson AL, Thomas MW (2008) Clinical applications of demineralized bone matrix: a retrospective and case-matched study of seventy-five dogs. *Veterinary surgery : VS* 37 (7): 639–647.
- Huang JI, Kazmi N, Durbhakula MM, Hering TM, Yoo JU, Johnstone B (2005) Chondrogenic potential of progenitor cells derived from human bone marrow and adipose tissue: a patient-matched comparison. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 23 (6): 1383–1389. doi:10.1016/j.orthres.2005.03.008.1100230621.
- Im G, Shin Y, Lee K (2005) Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 13 (10): 845–853. doi:10.1016/j.joca.2005.05.005.
- Izadpanah R, Trygg C, Patel B, Kriedt C, Dufour J, Gimble JM, Bunnell BA (2006) Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *Journal of cellular biochemistry* 99 (5): 1285–1297. doi:10.1002/jcb.20904.
- Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU (1998) In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Experimental cell research* 238 (1): 265–272.

LITERATURVERZEICHNIS

- Johnston SA (1997) Osteoarthritis. Joint anatomy, physiology, and pathobiology. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice* 27 (4): 699–723.
- Jung D, Ha J, Kang B, Kim J, Quan F, Lee J, Woo E, Park H (2009a) A comparison of autologous and allogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in canine spinal cord injury. *Journal of the neurological sciences* 285 (1-2): 67–77. doi:10.1016/j.jns.2009.05.027.
- Jung M, Kaszap B, Redöhl A, Steck E, Breusch S, Richter W, Gotterbarm T (2009b) Enhanced early tissue regeneration after matrix-assisted autologous mesenchymal stem cell transplantation in full thickness chondral defects in a minipig model. *Cell transplantation* 18 (8): 923–932. doi:10.3727/096368909X471297.
- Kadiyala S, Young RG, Thiede MA, Bruder SP (1997) Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell transplantation* 6 (2): 125–134.
- Kamishina H, Deng J, Oji T, Cheeseman JA, Clemmons RM (2006) Expression of neural markers on bone marrow-derived canine mesenchymal stem cells. *American journal of veterinary research* 67 (11): 1921–1928. doi:10.2460/ajvr.67.11.1921.
- Kang JW, Kang K, Koo HC, Park JR, Choi EW, Park YH (2008) Soluble factors-mediated immunomodulatory effects of canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Stem cells and development* 17 (4): 681–693. doi:10.1089/scd.2007.0153.
- Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG (1999) Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (19): 10711–10716.
- Kraus KH, Kirker-Head C (2006) Mesenchymal stem cells and bone regeneration. *Veterinary surgery : VS : the official journal of the American College of Veterinary Surgeons* 35 (3): 232–242. doi:10.1111/j.1532-950X.2006.00142.x.
- Kuroda R, Ishida K, Matsumoto T, Akisue T, Fujioka H, Mizuno K, Ohgushi H, Wakitani S, Kurosaka M (2007) Treatment of a full-thickness articular cartilage defect in the femoral condyle of an athlete with autologous bone-marrow stromal cells. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 15 (2): 226–231. doi:10.1016/j.joca.2006.08.008.
- Lee KB, Hui JH, Im Song C, Ardany L, Lee EH (2007) Injectable mesenchymal stem cell therapy for large cartilage defects--a porcine model. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 25 (11): 2964–2971. doi:10.1634/stemcells.2006-0311.

LITERATURVERZEICHNIS

- Lee RH, Kim B, Choi I, Kim H, Choi HS, Suh K, Bae YC, Jung JS (2004) Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 14 (4-6): 311–324. doi:10.1159/000080341.
- Lefebvre V, Crombrughe B de (1998) Toward understanding SOX9 function in chondrocyte differentiation. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 16 (9): 529–540.
- Liang C, Park AY, Guan J (2007) In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature protocols* 2 (2): 329–333. doi:10.1038/nprot.2007.30.
- Li H, Dai K, Tang T, Zhang X, Yan M, Lou J (2007) Bone regeneration by implantation of adipose-derived stromal cells expressing BMP-2. *Biochemical and biophysical research communications* 356 (4): 836–842.
- Lim JH, Byeon YE, Ryu HH, Jeong YH, Lee YW, Kim WH, Kang KS, Kweon OK (2007) Transplantation of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in experimentally induced spinal cord injured dogs. *Journal of veterinary science* 8 (3): 275–282.
- Lin Y, Luo E, Chen X, Liu L, Qiao J, Yan Z, Li Z, Tang W, Zheng X, Tian W (2005) Molecular and cellular characterization during chondrogenic differentiation of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and cartilage formation in vivo. *Journal of cellular and molecular medicine* 9 (4): 929–939.
- Liu TM, Martina M, Hutmacher DW, Hui JH, Lee EH, Lim B (2007) Identification of common pathways mediating differentiation of bone marrow- and adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells into three mesenchymal lineages. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 25 (3): 750–760. doi:10.1634/stemcells.2006-0394.
- Marie PJ (2008) Transcription factors controlling osteoblastogenesis. *Archives of biochemistry and biophysics* 473 (2): 98–105. doi:10.1016/j.abb.2008.02.030.
- Meirelles Ld, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI (2009) Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine & growth factor reviews* 20 (5-6): 419–427.
- Mokbel AN, El Tookhy OS, Shamaa AA, Rashed LA, Sabry D, El Sayed AM (2011) Homing and reparative effect of intra-articular injection of autologous mesenchymal stem cells in osteoarthritic animal model. *BMC musculoskeletal disorders* 12 (): 259.
- Mortellaro CM (2003) Pathophysiology of osteoarthritis. *Veterinary research communications* 27 Suppl 1 (): 75–78.

LITERATURVERZEICHNIS

- Murphy JM, Fink DJ, Hunziker EB, Barry FP (2003) Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis and rheumatism* 48 (12): 3464–3474.
doi:10.1002/art.11365.
- Neupane M, Chang C, Kiupel M, Yuzbasiyan-Gurkan V (2008) Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cells. *Tissue engineering. Part A* 14 (6): 1007–1015.
- Ogata Y (2008) Bone sialoprotein and its transcriptional regulatory mechanism. *Journal of periodontal research* 43 (2): 127–135.
- Owen M, Friedenstein AJ (1988) Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Foundation symposium* 136 (): 42–60.
- Pan GJ, Chang ZY, Schöler HR, Pei D (2002) Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4. *Cell research* 12 (5-6): 321–329.
doi:10.1038/sj.cr.7290134.
- Perin EC, Silva GV, Assad JA, Vela D, Buja LM, Sousa AL, Litovsky S, Lin J, Vaughn WK, Coulter S, Fernandes MR, Willerson JT (2008) Comparison of intracoronary and transendocardial delivery of allogeneic mesenchymal cells in a canine model of acute myocardial infarction. *Journal of molecular and cellular cardiology* 44 (3): 486–495.
- Phinney DG, Prockop DJ (2007) Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 25 (11): 2896–2902.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science (New York, N.Y.)* 284 (5411): 143–147.
- Popp FC, Piso P, Schlitt HJ, Dahlke MH (2006) Therapeutic potential of bone marrow stem cells for liver diseases. *Current stem cell research & therapy* 1 (3): 411–418.
- Prockop DJ (1997) Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science (New York, N.Y.)* 276 (5309): 71–74.
- Raabe O, Shell K, Würtz A, Reich CM, Wenisch S, Arnhold S (2011) Further insights into the characterization of equine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Veterinary research communications* 35 (6): 355–365.
doi:10.1007/s11259-011-9480-z.
- Rojas M, Xu J, Woods CR, Mora AL, Spears W, Roman J, Brigham KL (2005) Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 33 (2): 145–152.

LITERATURVERZEICHNIS

- Ryu HH, Lim JH, Byeon YE, Park JR, Seo MS, Lee YW, Kim WH, Kang KS, Kweon OK (2009) Functional recovery and neural differentiation after transplantation of allogenic adipose-derived stem cells in a canine model of acute spinal cord injury. *Journal of veterinary science* 10 (4): 273–284.
- Ryu H, Kang B, Park S, Kim Y, Sung G, Woo H, Kim WH, Kweon O (2012) Comparison of mesenchymal stem cells derived from fat, bone marrow, Wharton's jelly, and umbilical cord blood for treating spinal cord injuries in dogs. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science* 74 (12): 1617–1630.
- Sanchez-Ramos JR (2002) Neural cells derived from adult bone marrow and umbilical cord blood. *Journal of neuroscience research* 69 (6): 880–893.
- Sanderson RO, Beata C, Flipo R, Genevois J, Macias C, Tacke S, Vezzoni A, Innes JF (2009) Systematic review of the management of canine osteoarthritis. *The Veterinary record* 164 (14): 418–424.
- Schmid C, Keller C, Schläpfer I, Veldman C, Zapf J (1998) Calcium and insulin-like growth factor I stimulation of sodium-dependent phosphate transport and proliferation of cultured rat osteoblasts. *Biochemical and biophysical research communications* 245 (1): 220–225. doi:10.1006/bbrc.1998.8403.
- Schneider GB, Zaharias R, Stanford C (2001) Osteoblast integrin adhesion and signaling regulate mineralization. *Journal of dental research* 80 (6): 1540–1544.
- Schnorr B, Kressin M (2011) *Embryologie der Haustiere*. Enke. Stuttgart. ISBN 9783830411468.
- Sekiya I, Koopman P, Tsuji K, Mertin S, Harley V, Yamada Y, Shinomiya K, Nifuji A, Noda M (2001) Dexamethasone enhances SOX9 expression in chondrocytes. *The Journal of endocrinology* 169 (3): 573–579.
- Seo M, Jeong Y, Park J, Park S, Rho K, Kim H, Yu K, Lee S, Jung J, Lee Y, Kang K (2009) Isolation and characterization of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Journal of veterinary science* 10 (3): 181–187.
- Seo M, Park S, Kang K (2012) Isolation and characterization of canine Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. *Cell transplantation* 21 (7): 1493–1502.
- Sharan K, Siddiqui JA, Swarnkar G, Chattopadhyay N (2008) Role of calcium-sensing receptor in bone biology. *The Indian journal of medical research* 127 (3): 274–286.
- Smith RK, Korda M, Blunn GW, Goodship AE (2003) Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. *Equine veterinary journal* 35 (1): 99–102.

- Sugimoto T, Kanatani M, Kano J, Kaji H, Tsukamoto T, Yamaguchi T, Fukase M, Chihara K (1993) Effects of high calcium concentration on the functions and interactions of osteoblastic cells and monocytes and on the formation of osteoclast-like cells. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 8 (12): 1445–1452.
- Sugimoto T, Kanatani M, Kano J, Kobayashi T, Yamaguchi T, Fukase M, Chihara K (1994) IGF-I mediates the stimulatory effect of high calcium concentration on osteoblastic cell proliferation. *The American journal of physiology* 266 (5 Pt 1): E709-16.
- Theman TA, Collins MT (2009) The role of the calcium-sensing receptor in bone biology and pathophysiology. *Current pharmaceutical biotechnology* 10 (3): 289–301.
- Toole BP, Linsenmayer TF (1977) Newer knowledge of skeletogenesis: macromolecular transitions in the extracellular matrix. *Clinical orthopaedics and related research* (129): 258–278.
- Tryankowski E, Reich C, Raabe O, Wenisch S, Kramer M, Arnhold S Effect of varying Ca²⁺-concentrations on the osteogenic differentiation of adult mesenchymal stem cells. Abstract. 27. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft. 2010. Würzburg. http://www.anatomische-gesellschaft.de/images/abstract_workshop/27_tagung.pdf.
- Ugarte DA de, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, Dragoo JL, Ashjian P, Thomas B, Benhaim P, Chen I, Fraser J, Hedrick MH (2003) Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells, tissues, organs* 174 (3): 101–109. doi:10.1159/000071150.
- Vertenten G, Gasthuys F, Cornelissen M, Schacht E, Vlaminck L (2010) Enhancing bone healing and regeneration: present and future perspectives in veterinary orthopaedics. *Veterinary and comparative orthopaedics and traumatology : V.C.O.T* 23 (3): 153–162.
- Vidal MA, Kilroy GE, Lopez MJ, Johnson JR, Moore RM, Gimble JM (2007) Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Veterinary surgery : VS : the official journal of the American College of Veterinary Surgeons* 36 (7): 613–622. doi:10.1111/j.1532-950X.2007.00313.x.
- Vidal MA, Robinson SO, Lopez MJ, Paulsen DB, Borkhsenius O, Johnson JR, Moore RM, Gimble JM (2008) Comparison of chondrogenic potential in equine mesenchymal stromal cells derived from adipose tissue and bone marrow. *Veterinary surgery : VS : the official journal of the American College of Veterinary Surgeons* 37 (8): 713–724. doi:10.1111/j.1532-950X.2008.00462.x.

- Vieira NM, Brandalise V, Zucconi E, Secco M, Strauss BE, Zatz M (2010) Isolation, characterization, and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. *Cell transplantation* 19 (3): 279–289. doi:10.3727/096368909X481764.
- Volk SW, Diefenderfer DL, Christopher SA, Haskins ME, Leboy PS (2005) Effects of osteogenic inducers on cultures of canine mesenchymal stem cells. *American journal of veterinary research* 66 (10): 1729–1737.
- Vulliet PR, Greeley M, Halloran SM, MacDonald KA, Kittleson MD (2004) Intra-coronary arterial injection of mesenchymal stromal cells and microinfarction in dogs. *Lancet* 363 (9411): 783–784.
- Wakitani S, Saito T, Caplan AI (1995) Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle & nerve* 18 (12): 1417–1426. doi:10.1002/mus.880181212.
- Wang W, Zhao Y, Lin B, Yang J, Ge L (2012) Identification of multipotent stem cells from adult dog periodontal ligament. *European journal of oral sciences* 120 (4): 303–310.
- Yang F, Leung VY, Luk KD, Chan D, Cheung KM (2009) Mesenchymal stem cells arrest intervertebral disc degeneration through chondrocytic differentiation and stimulation of endogenous cells. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 17 (11): 1959–1966. doi:10.1038/mt.2009.146.
- Young HE, Steele TA, Bray RA, Hudson J, Floyd JA, Hawkins K, Thomas K, Austin T, Edwards C, Cuzzourt J, Duenzl M, Lucas PA, Black AC (2001) Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *The Anatomical record* 264 (1): 51–62.
- Young RG, Butler DL, Weber W, Caplan AI, Gordon SL, Fink DJ (1998) Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 16 (4): 406–413. doi:10.1002/jor.1100160403.
- Zhu Y, Liu T, Song K, Fan X, Ma X, Cui Z (2008) Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. *Cell biochemistry and function* 26 (6): 664–675. doi:10.1002/cbf.1488.
- Zucconi E, Vieira NM, Bueno DF, Secco M, Jazedje T, Ambrosio CE, Passos-Bueno MR, Miglino MA, Zatz M (2010) Mesenchymal Stem Cells Derived From Canine Umbilical Cord Vein-A Novel Source for Cell Therapy Studies. *Stem cells and development* (). doi:10.1089/scd.2008.0314.
- Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, Ugarte DA de, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH (2002) Human adipose tissue is a source of multipotent

LITERATURVERZEICHNIS

stem cells. *Molecular biology of the cell* 13 (12): 4279–4295.
doi:10.1091/mbc.E02-02-0105.

N. ANHANG

1. VERBRAUCHSMATERIALIEN UND GERÄTE

Gerät/Material	Hersteller
Autoclav „Systec DE-65“	Systec, Wetzlar, Deutschland
Deckgläschen	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Durchflusszytometer „FACSCalibur™“	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Einbett-Automat „EG1160“	Leica, Solms, Deutschland
Eiswannen	Magic Touch Ice Wares, N.Y., USA
Elektrophoresekammern	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Entwässerungs-Automat „TP1050“	Leica, Solms, Deutschland
Falcon Tubes 15ml und 50ml	Greiner Bio.One, Frickenhausen, Deutschland
Feinwaage „PB 3002-S Delta Range“	Mettler, Gießen, Deutschland
Feinwaage „Discovery“	Ohaus, Nänikon, Schweiz
FilterTip 10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl	Nerbe plus, Winsen/Luhe, Deutschland
Fluoreszenz Mikroskop	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
Freezing Gefäß „Mr Frosty“	NALGENE® Labware, Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dänemark
Gefrier Röhrchen	Greiner Bio.One, Frickenhausen, Deutschland
Glasgefäße	Schott AG, Mainz, Deutschland
Glaspipetten	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co.KG, Eberstadt, Deutschland
Hämozytometer „NI“	Digital Bio, Korea
Inkubator „Hera cell 150“	Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland
Kühl-/Gefrierkombination	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Küvetten	Eppendorf GmbH, Wesseling- Berzdorf, Deutschland
Magnetrührer „IkaMAG RET“	Janke & Kunkel, Staufen, Deutschland
Microseal B Adhesive Seals, optical	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Mikrowellengerät 8520	Privileg, Stuttgart, Deutschland
Mikrotom „SM 2000 R“	Leica, Solms, Deutschland
Messzylinder aus Glas	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co.KG, Eberstadt, Deutschland
Multi-Reaktionsgefäß 650µl und 2ml	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

ANHANG

Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Objektträger	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
PCR Tubes 650 µl	Nerbe plus, Winsen/Luhe, Deutschland
Phasenkontrastmikroskop, invers	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
pH-Elektrode „SenTix41“	WTW, Weilheim, Deutschland
Photometer	Eppendorf GmbH, Wesseling- Berzdorf, Deutschland
Pipetten	Eppendorf GmbH, Wesseling- Berzdorf, Deutschland
Pipettus	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co.KG, Eberstadt, Deutschland
Real time cycler „CFX“96“	BioRad, Hercules, CA, USA
Röhrchengestelle	Brand GmbH + Co KG, Wertheim, Deutschland
Sterilbank	Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland
Sterilisor-Ofen Heraeus	Heraeus, Hanau, Deutschland
Stickstofftank	Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland
Thermocycler „DNA Engine“	BioRad, Hercules, CA, USA
Thermohandschuhe	Tempshield, Inc. , Maine, USA
Transmissionselektronenmikroskop „EM 109“	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
UVSolo Transiluminator	Biometra, Göttingen, Deutschland
UVIdoc	Biometra, Göttingen, Deutschland
Vortexer	IKA Werke, Staufen, Deutschland
Zellkulturflaschen 25cm ²	Greiner Bio.One, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturschalen 6-Well; 24 Well	Greiner Bio.One, Frickenhausen, Deutschland
Zellfilter 70µm	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Zentrifuge „Heraus Megafuge 11R“	Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland
Zentrifuge „Mikro 20“	Hettich, Tutlingen, Deutschland
Zentrifuge „Mikro 220R“	Hettich, Tutlingen, Deutschland

2. CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN

Reagenz/Chemikalie	Hersteller
50 bp DNA –Marker	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
100 bp DNA-Marker	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Accutase	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Agarose	Bioline, Luckenwalde, Deutschland
Alcianblau	Chroma Gesellschaft Schmid GmbH & Co, Stuttgart,

ANHANG

	Deutschland
α -MEM	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
AmpliTaQ Gold DNA Polymerase	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Ascorbinsäure-2-phosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
B- Glycerolphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Bleicitrat (Ultrastain II)	Leica, Wetzlar, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Chloroform	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Collagenase I	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Dexamethason	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
DMEM low glucose	PAA, Pasching, Österreich
DMSO	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
DNase I, RNase	Roche über Invitrogen Ltd., Paisley, UK
DNase-Puffer	Roche über Invitrogen Ltd., Paisley, UK
dNTP Mix (2 mM)	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Eisenalaun (Ammoniumeisen III sulfat)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Eisessig	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Eosin (Instant Eosin Aqueous)	Shandon, Frankfurt, Deutschland
Epon	Serva, Heidelberg, Deutschland
Ethanol, vergällt	Schmitt, Dillenburg, Deutschland
Ethanol, rein	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid 10mg/ml	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
FBS Gold	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Formalin (37% Formaldehyd)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
GeneAmp® dNTP blend, 10 mM	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Glutaraldehyd	Leica, Wetzlar, Deutschland
Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hämalaunlösung, sauer, nach Mayer	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hämatoxylin (Instant Hematoxylin)	Shandon, Frankfurt, Deutschland
HCl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
IBMX	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Indomethacin	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
3-Isobutyl-1-methylxanthin	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
ITS (Insulin-transferrin-selenium)x100	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Isopropanol/Isopropylalkohol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
iQ SYBR Green Supermix, 2x	Bio-Rad, Hercules, CA, USA

ANHANG

ITS	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
LSM 1077 Ficoll Separation Medium	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Kaiser's Gelatine	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kernechtrot	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid 25 mM	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumpyruvat	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Natrium-Cacodylat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumcarbonat (wasserfrei)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumthiosulfat-Pentahydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Osmiumtetroxid(OsO ₄)	Leica, Wetzlar, Deutschland
Paraffin	Vogel, Gießen, Deutschland
Paraformaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
PBS (Zellkultur)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
PBS (Phosphate buffered saline)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
PCR-Puffer Gold (10x)	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Phosphorwolframsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Pikrinsäurelösung	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Prolin	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	PAA, Pasching, Österreich
Random Hexamers 50 mM	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Reverse Transkriptase MultiScribe [®]	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
RNase- Away [®] Reagent	Molecular BioProducts, San Diego, CA
RNase- Inhibitor (40 U/µl)	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
RNase- Inhibitor (20 U/µl)	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Säurefuchsin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Silbernitrat (S0139)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Sprühdesinfektion	Laboratorium Dr. Deppe, Kempen, Deutschland
Sterilium	Bode Chemie, Hamburg, Deutschland
Sybr [®] Green	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
TGF- β	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Tris-HCl	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
TRI Reagent	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Toluidinblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
Uranylacetat (Ultrastain I)	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
VitroClud	Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Wasserblau	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Xylol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
-------	------------------------------

3. ANTIKÖRPER FÜR DIE DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Antikörper	Hersteller
Rat-anti-dog CD90, monoclonal MCA 1036G (Primär-Antikörper)	AbD Serotec, Düsseldorf, Deutschland
Rat IgG2b Antikörper MCA 1125 (Isotypenkontrolle)	AbD Serotec, Düsseldorf, Deutschland
R-Phycoerythrin-konjugierter Goat-anti-rat IgG	Dianova, Hamburg, Deutschland

4. REZEPTE VERWENDETER FÄRBE-LÖSUNGEN

4.1 5 % Silbernitrat (von Kossa-Färbung)

5g Silbernitrat

100ml Aqua bidest

Silbernitrat wird in Aqua bidest aufgelöst bis eine klare Lösung entsteht.

4.2 5% Na-Carbonat-Formaldehyd (von Kossa-Färbung)

5 g Natriumcarbonat in und 75 ml Aq bidest lösen

25 ml Formaldehyd (35-40%ig)

75ml Aqua bidest.

Formaldehyd und Aqua bidest. vermengen und Natriumcarbonat darin auflösen.

4.3 Farmers Reducer (von Kossa-Färbung)

10% Natriumthiosulfat: 2g Natriumthiosulfat-Pentahydrat in 20 ml Aqua bidest. lösen.

ANHANG

10% Formaldehydlösung: 5 ml 35-40% Formaldehydlösung mit 15 ml Aqua bidest. vermischen.

Anschließendes Mischen von 20 ml der 10%igen Natriumthiosulfatlösung mit 1 ml der 10%igen Formaldehydlösung ergeben 21 ml Farmers Reducer.

4.4 Kernechtrot

0,1 g Kernechtrot

5 g Aluminiumsulfat

100ml Aqua bidest.

Aluminiumsulfat in Aqua bidest. lösen und aufkochen. Kernechtrot in kochender 5% Aluminiumsulfatlösung auflösen und nach dem Erkalten filtrieren.

4.5 Alcianblau-Färbelösung

0.5 g Alcianblau

1 ml Eisessig

100 ml Aqua dest.

Alle Komponenten miteinander vermischen, anschließend filtrieren.

Danksagung

Mein Dank geht an Prof. Dr. Arnhold für die Überlassung des interessanten Themas, für seine Unterstützung auch in den schwierigen Phasen des Projektes und sein unermüdliches Vertrauen in meine Arbeit.

Außerdem gilt mein Dank dem Graduiertenkolleg „Molekulare Veterinärmedizin“, seinen Betreuern Prof. Petzinger und Prof. Bauerfeind und der DFG. Diese großartige Institution ermöglichte es mir, viele der Methoden und Fähigkeiten zu erwerben, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre und gewährte mir die notwendigen finanziellen Mittel. Besondere Dank gilt dabei Prof. Petzinger, der mir besonders während meines Arbeitsgruppenwechsels zur Seite stand und das Vertrauen in mich nie aufgab.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei meiner Arbeitsgruppe, bei Oksana, Siggie, Anne, Annika, Katrin, Katja, Eva, Karina und allen die ich jetzt vielleicht vergessen habe, für die nette Arbeitsatmosphäre, all die Hilfe und Unterstützung und den kollegialen Zuspruch.

Ganz besonderen Dank schulde ich aber Dani Fietz für Ihre immerwährende Freundschaft, alle Aufmunterungen und die Schulter zum Ausheulen. Dani, ohne Dich hätte ich es wahrscheinlich 10x hingeschmissen und das Ganze wäre wohl niemals fertig geworden!!! Gleich danach zu nennen ist das Doktorandenzimmer mit Clara, Sarah, Karola, Katja und Eva. Ich danke Euch für jede Anteilnahme, manch verquatschten Nachmittag, das gemeinsame Gelächter und die schönen Kneipenabende. Ihr habt das Doktoranden-Leben lebenswert gemacht und ohne Euch hätte ich wahrscheinlich auch nicht durchgehalten. Ein großes Dankeschön geht auch an Mariusz, der mir ein treuer Wegbegleiter war, immer an mein wissenschaftliches Talent geglaubt und mir nicht selten methodisch weitergeholfen hat. Auch unsere Freundschaft hat mich durch die Doktorarbeit getragen.

Ein nicht geringerer Dank soll an meine Eltern gehen, die immer an mich geglaubt und mir alles ermöglicht haben, was ich mir erträumte. Ich weiß, es war nicht immer leicht mit mir! Danke für Euer Verständnis, Euer Vertrauen und Eure Liebe!