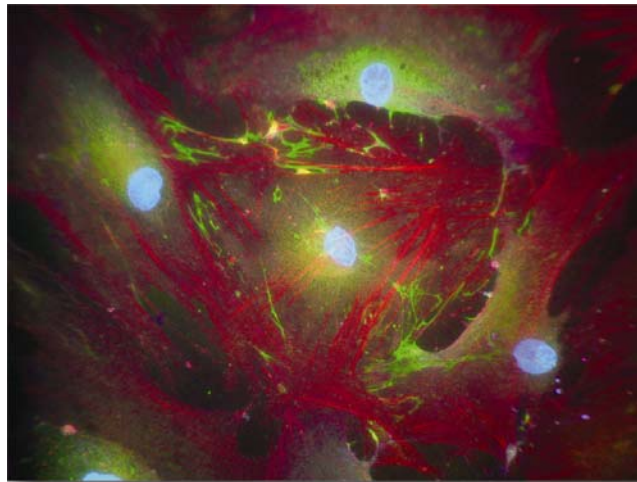


**Etablierung einer simultanen 7-Farben-Immunfluoreszenz zur Charakterisierung humaner mesenchymaler Stammzellen im Vergleich zu Osteoblasten und Fibroblasten auf Einzelzellniveau**



vorgelegt von  
Florian Jörg Haasters

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik – Innenstadt,  
Klinikum der Universität München,  
Chirurgisches Forschungslabor  
Direktor: Prof. Dr. med. Wolf Mutschler

---

**Etablierung einer simultanen 7-Farben-Immunfluoreszenz zur Charakterisierung humaner mesenchymaler Stammzellen im Vergleich zu Osteoblasten und Fibroblasten auf Einzelzellniveau**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
(Dr. med.)  
an der Medizinischen Fakultät  
der Universität zu München

vorgelegt von  
Florian Jörg Haasters  
aus Essen

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Wolf Mutschler

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Ulrich Welsch

Mitberichtersteller: Priv.-Doz. Dr. Markus Maier

Prof. Dr. Christopher Heeschen

Prof. Dr. Jürgen Scherberich

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter:

Priv.-Doz. Dr. Matthias Schieker

Dekan:

Prof. Dr. Dietrich Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 24.04.2008

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>6</b>
1.1. Humane mesenchymale Stammzellen .....	6
1.1.1. Potential humaner mesenchymaler Stammzellen .....	6
1.1.2. Identifizierung und Charakterisierung .....	8
1.1.3. Verwendete Marker .....	10
1.2. Immunzytochemie .....	14
1.2.1. Nachweismethoden .....	14
1.2.2. Grundlagen der Fluoreszenzentstehung .....	16
1.2.3. Fluoreszenzmikroskopie .....	16
1.3. Aufgabenstellung .....	18
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>19</b>
2.1. Zellkultur.....	19
2.1.1. Zellen und Medien .....	19
2.1.2. Zellkulturbedingungen.....	20
2.2. Immunzytochemie .....	21
2.2.1. Immunfluoreszenzfärbung auf single cell Niveau .....	21
2.2.2. Protokoll Immunfluoreszenzfärbung.....	23
2.2.3. Antikörper.....	25
2.3. Bildakquisition .....	26
2.3.1. Fluoreszenzmikroskopie .....	26
2.3.2. Spectrale Bildanalyse .....	29
2.4. Verwendete Materialien und Geräte.....	30
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>32</b>
3.1. Zellkultur.....	32
3.1.1. humane mesenchymale Stammzellen .....	32
3.1.2. humane Osteoblasten .....	34
3.1.3. humane Fibroblasten .....	35
3.2. Einfachfärbungen .....	35
3.2.1. humane mesenchymale Stammzellen .....	36
3.2.2. humane Osteoblasten .....	39
3.2.3. HS 27 .....	41
3.3. Mehrfachfärbungen .....	43
3.3.1. hMSC .....	44

---

3.3.2. humane Osteoblasten.....	46
3.3.3. Humane Fibroblasten.....	47
3.3.4. Übersicht.....	48
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>49</b>
4.1. Methodik.....	49
4.1.1. Spectrale Bildanalyse .....	53
4.2. Morphologie .....	55
4.3. Verwendete Marker .....	57
<b>5. Ausblick.....</b>	<b>63</b>
<b>6. Abstract .....</b>	<b>65</b>
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>66</b>
7.1. Anhang.....	83
7.2. Abkürzungsverzeichnis .....	86
7.3. Danksagung .....	87
7.4. Curriculum vitae .....	88
7.5. Publikationen.....	90

# 1. Einleitung

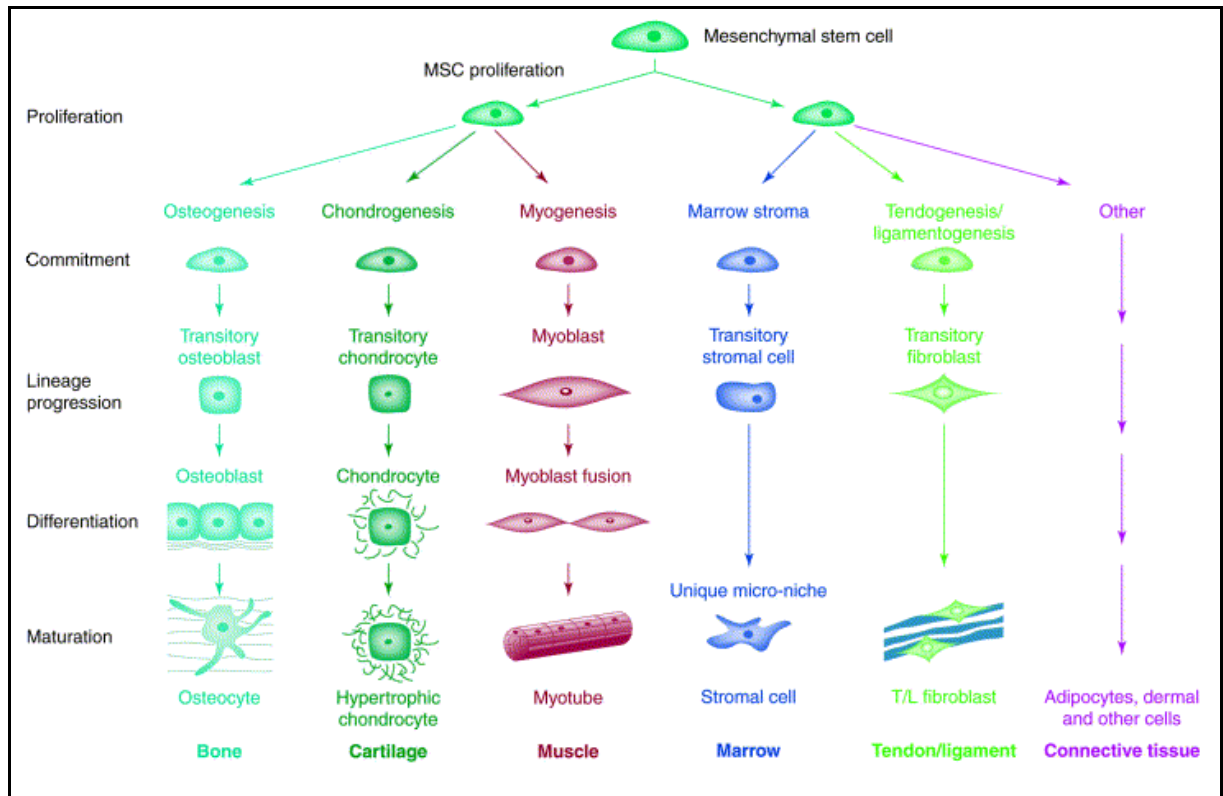
## 1.1. Humane mesenchymale Stammzellen

### 1.1.1. Potential humaner mesenchymaler Stammzellen

Das mögliche therapeutische Potential humaner mesenchymaler Stammzellen (hMSC) hat besonders in den letzten zwei Jahrzehnten ein enorm wachsendes Interesse und eine Vielzahl von Studien und Untersuchungen auf allen Gebieten der klinischen, biologischen und biotechnologischen Forschung hervorgerufen (Horwitz et al. 2005). Dabei wurden schon 1961 von Friedenstein aus dem Knochenmark isolierte Zellen beschrieben, die ektop transplantiert zur Osteogenese befähigt waren (Friedenstein 1961). Eine genaue Definition der klassischerweise aus Knochenmarkaspiraten gewonnenen mesenchymalen Stammzellen zu leisten ist aber nach dem aktuellen Stand der Forschung auch durch internationale Fachgesellschaften wie die International Society for Cellular Therapy (ISCT) nicht problem- und kompromisslos möglich (Raimondo et al. 2006, Dominici et al. 2006).

hMSC sind multipotente, adulte Stammzellen, die die Möglichkeit zur unendlichen Zellvermehrung (Selbstreplikation) sowie die Fähigkeit zur Differenzierung in verschiedene Gewebearten (Plastizität) mit einer festgelegten Richtung (Hierarchie) besitzen (Baksh et al. 2004, Korbling et al. 2003, Pittenger et al. 1999). Multipotenz bedeutet dabei, dass sich diese adulten Stammzellen im Gegensatz zur embryonalen Stammzelle nicht mehr in alle Gewebe- und Zellarten entwickeln können (Totipotenz), aber durchaus eine keimblattübergreifende Differenzierung in andere als das mesenchymale Gewebe aufzeigen (Korbling et al. 2003, Jiang et al. 2002, Temple 2001). Diese Differenzierungsfähigkeit in zumindest chondrogene, osteogene und adipogene Zelllinien wird auch *in vitro* als Stammzellkriterium gefordert (Raimondo et al. 2006, Schieker et al. 2004, Jaiswal et al. 2000, Bruder et al. 1998). Weiterhin wird der Zellpopulation der hMSC abverlangt, unter standardisierten Kulturbedingungen auf Plastikoberflächen zu adhären und bestimmte Marker in Form von Oberflächenantigenen zu präsentieren bzw. andere nicht zu exprimieren (Dominici et al. 2006, Otto et al. 2004, Colter et al. 2001, Dominici et al. 2001). Besonders auf letzteren Punkt der Charakterisierung durch zelluläre Marker richtet sich das Hauptaugenmerk der vorliegenden Arbeit.

Das hohe Potential humaner mesenchymaler Stammzellen wird besonders im Rahmen von Anwendungen im Bereich des Tissue Engineerings augenscheinlich. D.h. durch die Kombination von Technologien und Konstrukten aus Ingenieurs- und Werkstoffwissenschaften mit lebenden Zellen eines Organismus unter Zugabe von biologischen Wachstumsfaktoren außerhalb des Zielgewebes, Gewebefunktion zu erschaffen, zu verbessern oder grundlegend zu erforschen (Vacanti et al. 1991). So ist es bisher gelungen, hMSC in eine Vielzahl von verschiedensten Gewebezelltypen zu differenzieren, wie z.B. in Adipozyten, Osteoblasten, Chondrozyten (Pittenger et al. 1999), kardiale und skelettale Myozyten (Lovell et al. 2004, Camargo et al. 2004), Tenozyten (Awad et al. 2003), Fibroblasten (Direkze et al. 2003), Perizyten (Shi et al. 2003), Thymuszellen (Liechty et al. 2000), Hepatozyten (Narasimhan et al. 2006), Keratozyten, Pneumozyten (Krause et al. 2001), neuronale Gliazellen (Krabbe et al. 2005) und Inselzellen des Pankreas (Ianus et al. 2003). Dabei ist die Gewinnung der Ausgangspopulation und ihre anschließende Kultivierung einfach und ohne ethische Bedenken. Die Isolation ist mit entsprechenden Standardprotokollen zur Aufreinigung und Auftrennung aus mehreren anerkannten Quellen gelungen. Diese beinhalten u.a. das Knochenmark als klassischen Entnahmeort, u.a. aber auch Fettgewebe, Periost, Synovia, Muskel, Haut, Nabelschnur, Lunge, Zahnpulpa und das zirkulierende Blut (Roufosse et al. 2004, Tuan et al. 2003, Shi et al. 2003, Romanov et al. 2003, Noth et al. 2002). Bei allen Hoffnungen und Forschungsbemühungen werden jedoch zahlreiche Anforderungen an in vivo Anwendung, wie z.B. der Einsatz von in vitro generiertem vollständigen Knochen als Ersatz für langstreckige ossäre Defekte infolge Trauma, Infekt oder tumorassoziierter Substanzverluste auch in absehbarer Zeit noch nicht erfüllt werden. Als Grund für das Ausbleiben klinisch relevanter Anwendungen trotz zahlreicher großer Fortschritte sind sicherlich unter anderen Schwierigkeiten im Umgang mit hMSC bislang noch ungeklärte fundamentale Fragen zur definitiven Phänotypisierung der hMSC anzuführen.



**Abb. 1** Plastizität humaner mesenchymaler Stammzellen (Caplan et al. 2001). Vereinfachte schematische Darstellung einer schrittweisen Differenzierung der mesenchymalen Stammzelle in spezialisierte Phänotypen. Die einzelnen Entwicklungswege sind entsprechend ihres jetzigen Verständnisses von links nach rechts arrangiert.

### 1.1.2. Identifizierung und Charakterisierung

Trotz der beträchtlichen Ansammlung an Studien, die sich mit der Beschreibung charakteristischer Eigenschaften und der Identifizierung von hMSC befassen, bleibt die definitiv spezifische Charakterisierung dieser adulten Stammzellen problematisch. Diese Unsicherheit in der Phänotypisierung schlägt sich auch in der Nomenklatur nieder, die von verschiedenen Arbeitsgruppen in den letzten Jahren für diesen Stammzelltypus verwendet wurde (Horwitz et al. 2005). Colony forming unit-fibroblasts (CFU-F) (Castro-Malaspina et al. 1980), bone marrow stromal cells (BMSSC), stromal precursor cells (SPC) (Shi et al. 2002), multipotent adult progenitor cells (MAPC) (Reyes et al. 2001) und marrow stromal cell (auch MSC) (Prockop 1997) sind Beispiele unter vielen Bezeichnungen, die für mesenchymalen Stammzellen bisher angewendet wurden (Baksh et al. 2004). Dabei berücksichtigt jedoch keine dieser Bezeichnungen gleichermaßen den Ursprungsort und die biologischen Eigenschaften der Zellen. Um unter der Vielzahl an Fachbegriffen eine einheitliche No-



menklatur zu schaffen legte aktuell die ISCT das Akronym MSC für mesenchymale Stammzellen als angestrebte Bezeichnung für die im vorangegangenen Abschnitt der Arbeit definierten Zellen fest (Horwitz et al. 2005).

Das Hauptproblem der Identifizierung von hMSC ist und bleibt sicherlich das Fehlen eines spezifischen singulären Markers, wie er z.B. für die hämatopoetische Stammzelle mit CD34 vorliegt (Raimondo et al. 2006, Javazon et al. 2004, Sekiya et al. 2004, Derubeis et al. 2004, Madras et al. 2002, Bianco et al. 2000, Conget et al. 1999, Pittenger et al. 1999). Daher wird der Stammzellnachweis in den meisten Studien bislang immer noch über die Differenzierbarkeit in verschiedene Gewebe erbracht (Raimondo et al. 2006, Jaiswal et al. 2000, Bruder et al. 1998). Zu berücksichtigen ist dabei allerdings, dass diese Untersuchungen immer nur exemplarisch für einen Teil der Population geführt werden und ausschließlich Aussagen a posteriori getroffen werden können. Es wird nach der Differenzierung also angenommen, dass es sich bei der Ausgangspopulation um hMSC handelte und überträgt diese Annahme auf den restlichen Zellpool.

Zusätzlich erschwert werden Charakterisierungsversuche durch die Tatsache, dass durch die gängigen Isolierungsverfahren durch Knochenmarkaspiration und anschließende Auftrennung der durch Zentrifugation entstandenen Dichtegradienten eine sehr inhomogene Primärkultur geschaffen wird (Javazon et al. 2004, Vogel et al. 2003). Studien dieser primären Zellkulturen zeigen schon morphologisch heterogene Zellen verschiedener Größe und von spindelförmiger, polygonaler oder cuboidaler Architektur (Javazon et al. 2004, Smith et al. 2004, Colter et al. 2001). In Studien, die die unterschiedlichen Charakteristika der morphologisch verschieden konfigurierten MSC beschrieben, zeigten sich signifikante Unterschiede vor allem in der Proliferationskapazität der verschiedenen Zellarten, so dass man eine Existenz von Subpopulationen innerhalb dieses MSC Pools vermuten muß (Lee et al. 2006, Prockop et al. 2001, Conget et al. 1999). In morphologisch orientierten Charakterisierungsversuchen wurden die Zellen in drei große Hauptgruppen eingeteilt. Neben den schon in frühen Versuchen mit hMSC überwiegend beobachteten spindelförmigen Zellen, wurden große, flache Zellen mit geringer Replikationsaktivität und eine weitere Fraktion von kleinen, um die 50µm im Durchmesser umfassenden Zellen, ausgemacht, die RS-Zellen genannt wurden. Dieses deskriptive Akronym steht für „rapidly self-renewing“ und beschreibt dabei den gesteigerten Zellzyklus (Sekiya et al. 2004, Prockop et al. 2001). Weiterhin wird für diese Zellen, die besonders in jungen Passagen

und bei geringer Kulturdichte zu beobachten sind ein erhöhtes Differenzierungspotential in adipogene, osteogene und chondrogene Richtung postuliert, so dass einige Autoren von früheren Vorstufen dieser Zellen innerhalb der Gesamtpopulation ausgehen (Colter et al. 2001, Prockop et al. 2001).

Ferner variiert in vergleichbaren Studien neben dem Isolierungsprotokoll der Entnahmeort der MSC oder gar die Spezies (Yoshimura et al. 2007, Sammons et al. 2004, De Ugarte et al. 2003). Nicht verwunderlich ist also dabei, dass diese unsynchronisierten Untersuchungen auch zu ambivalenten und unterschiedlichen Aussagen bezüglich des festgestellten Färbeverhaltens der hMSC führten und nur schwer vergleichbar sind.

Bisherige molekularbiologische Analyseverfahren zur Phänotypisierung sind in zahlreicher Form beschrieben. Allerdings sind auch hier die Grundvoraussetzungen nicht immer vergleichbar, da sie häufig auf unterschiedlichen Stufen der Untersuchung von Proteinexpressionen arbeiten. Es stehen dabei z.B. RNA-Untersuchungen durch PCR-Analysen oder Proteinanalysen in FACS- bzw. immunzytochemischen Markierungen gegenüber. Auch die vorausgehenden nötigen Behandlungen der Zellen sind in den Resultaten zu berücksichtigen. So werden im FACS lysierte oder nicht-lysierte Zellen in Suspension untersucht ohne den typischen Zellstoffwechsel nach Adhärenz auf Oberflächen zu zeigen oder in der PCR vor der Analyse synchronisiert, d.h. in ihren Zellzyklen gleichgeschaltet.

Um einen Überblick über die Gesamtpopulation in ihrem typischen in vitro Wachstumsverhalten zu erhalten und in Ermangelung eines spezifischen Oberflächenmarkers, wurde in der vorliegenden Untersuchung daher die Mehrfachmarkierung von einzelnen adhärennten Zellen durch Immunfluoreszenzfärbungen gewählt. Bisher ist diese Methode auf hMSC nur selten beschrieben und lange Zeit nur als Zweifachfärbung und maximal als Vierfachfärbung mit eher uncharakteristischen Markern durchgeführt worden (Schieker et al. 2004).

### **1.1.3. Verwendete Marker**

Eines der Hauptprobleme der Charakterisierung von MSC und der damit verbundenen Auswahl von zellulären Markern ist die große Breite an in der Literatur beschriebenen Antigenen (Kassem 2004, Cancedda et al. 2003, Horwitz 2003). Daraus resultieren häufig Unstimmigkeiten zwischen verschiedenen Arbeitsgruppen oder zweideutige Ergebnisse (Dominici et al. 2006). Ein Standardnachweis bestimmter Antige-

ne ist daher bislang nicht erreicht (Foster et al. 2005). Die Auswahl der in dieser Arbeit verwendeten zellulären Marker zielt primär auf die in der überwiegenden Literatur als putative Stammzellmarker für MSC beschriebenen Antigene ab, um somit eine Abgrenzung zu Osteoblasten und Fibroblasten zu ermöglichen. Zum anderen zeigt sie Strukturproteine auf, die ein einfach zu lokalisierendes, z.B. extrazelluläres, und typisches Expressionsmuster zeigen, um eine Differenzierung zu den übrigen Antigenen sicher gewährleisten zu können. Im Folgenden gliedert sich die Aufzählung in Oberflächen-, Struktur- und extrazelluläre Matrixproteine.

#### Oberflächenproteine:

Besonders immunphänotypische Oberflächenantigene werden als Standardnachweis für hMSC herangezogen. Zusammengefasst werden sie in Gruppen der Cluster of Differentiation (CD), kein Antigen dieser Gruppen ist jedoch spezifisch für hMSC oder einen bestimmten Reifegrad dieser Zelllinie (Beyer et al. 2006). CD 105, CD 106 und CD44 sind Vertreter dieser Gruppe, über die in der Vergangenheit überdimensional häufig versucht wurde, einen Stammzellnachweis zu erbringen (Mareschi et al. 2006, Ishii et al. 2005, Musina et al. 2005, Romanov et al. 2005, Pittenger et al. 1999).

CD 105, auch als Endoglin bekannt, wurde ursprünglich durch den Antikörper SH2 entdeckt (Haynesworth et al. 1992a, Haynesworth et al. 1992b) und wird daher in der Literatur gelegentlich auch als SH2-Antigen bezeichnet. Endoglin ist eine Komponente des Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF $\beta$ )-Rezeptors, der mit hoher Affinität den Wachstumsfaktor TGF $\beta$ 1 bindet. Somit ist CD105 als Teil des homodimeren membranständigen Rezeptorkomplexes an der Modulation der TGF-beta Signalwege beteiligt (Bellon et al. 1993). TGF-beta wiederum wird eine entscheidende Rolle in der Zellproliferation, Migration und Differenzierung vieler Zellreihen, so auch für hMSC zugesprochen (Roelen et al. 2003). Wie ursprünglich von Haynesworth et al angenommen, wird Endoglin jedoch nicht spezifisch von hMSC exprimiert, sondern ist in unterschiedlichsten Zellarten und –stadien nachweisbar (Lebrin et al. 2004). Vorrangig wird Endoglin von endothelialen Zellen gebildet, aber es ist ebenso in kleinerem Ausmaß in Makrophagen, Proerythroblasten, B-Zell-Vorläufern und Syncytiotrophoblasten nachweisbar (Li et al. 2000, Rius et al. 1998).

CD106, auch als vaskuläres Adhäsionsmolekül-1 (VCAM-1) beschrieben, ist ein Transmembranprotein der Ig-Superfamilie, das überwiegend  $\text{Ca}^{2+}$  unabhängige Adhäsion vermittelt. Oberflächenmoleküle der Ig-Superfamilie sind vornehmlich an Zel-

lerkennung, Immunzellfunktion (Schwartz et al. 1995, Nojima et al. 1990, Matsuyama et al. 1989) und Zellmigration (Kansas 1996) beteiligt. CD106 kommt auf verschiedensten Geweben und Organen des Körpers vor. Es ist ursprünglich auf humanen Endothelzellen entdeckt worden und in Verbindung mit Interaktionen zu Lymphozyten und Tumorzellen gebracht worden (Osborn et al. 1994, Rice et al. 1991). Außer auf hMSC ist CD106 noch als Adhäsionsmolekül für epitheliale, endotheliale und dendritische Zellen sowie für Makrophagen beschrieben (Gearing et al. 1993). Als Marker für hMSC wird VCAM-1 abhängig von Passage, Differenzierungsgrad und Untersuchungsmethode kontrovers diskutiert. In der Zusammenschau und überwiegenden Literatur hat CD106 jedoch einen festen Stellenwert in der Charakterisierung von hMSC (Izadpanah et al. 2006, Mareschi et al. 2006, Romanov et al. 2005, Otto et al. 2004, Gronthos et al. 2003, Minguell et al. 2001).

CD44 ist ein transmembranärer Rezeptorkomplex, dessen Hauptligand die Hyaluronsäure ist (Cichy et al. 2003, Aruffo et al. 1990). Hyaluronsäure wiederum ist ein Glykosaminoglykan, das neben seiner wichtigen Rolle als Bestandteil des Bindegewebes auch eine Bedeutung für Zellproliferation, -migration und Tumorentstehung besitzt (Cuff et al. 2001, Lesley et al. 2000). Weiterhin interagiert dieses CD44 mit Osteopontin, das u.a. die zelluläre Chemotaxis induziert (Weber et al. 1996). So konnte CD44 mit verschiedenen hochproliferativen Systemen assoziiert werden, wie z.B. in der Immunantwort durch das zelluläre Immunsystem (Leemans et al. 2003, Schmits et al. 1997), in der Arteriogenese (van et al. 2004) und in der Entstehung und Diagnostik von Metastasen (Mayer et al. 1993, Screatton et al. 1992). Für hMSC ist CD44 ein gängiger und weit etablierter Marker für den Stammzellnachweis (Tondreau et al. 2005, Lee et al. 2004, Otto et al. 2004, Kotobuki et al. 2004, Shur et al. 2002, Pittenger et al. 1999) und scheint auch zur Abgrenzung zu Osteoblasten und Fibroblasten geeignet. Hier zeigen Studien, dass es auf Osteoblasten der Ratte nachzuweisen ist (Jamal et al. 1996), aber im Vergleich zwischen humanen Fibroblasten und hMSC selektiv von HMSC exprimiert wird (Ishii et al. 2005).

### Extrazelluläre Matrixproteine

Die Extrazellulärmatrix beschreibt den Anteil des Gewebes der von Zellen in den Interzellularraum sezerniert wurde, besonders entscheidend für die Gewebeeigenschaften ist dieser Anteil im Binde und Stützgewebe. Zu den Proteinen der Extrazel-

lulären Matrix zählen u.a. die Kollagene und Adhäsionsproteine, wie Fibronectin. Unter den Kollagenen wurde in dieser Studie Kollagen IV (Col IV) ausgewählt.

Col IV ist ein nicht-fibrilläres, netzbildendes Kollagen, das überwiegend in Basalmembranen vorkommt (Burgeson et al. 1992). Es ist als Trimer aus drei Polypeptidketten aufgebaut, sog. Alpha-Ketten. Diese drei Polypeptidketten sind über weite Teile ihrer Gesamtlänge ineinander gewunden und bilden so eine stabartige Tripel-Helix (Yurchenco et al. 1987). Dieses Kollagen Netzwerk bietet zum einen mechanischen Halt, zum anderen dient es als Gitter in das andere extrazelluläre Materialien eingelagert werden können. So interagieren Laminin und verschiedene Integrine als wichtige Bestandteile der Kommunikation zwischen Zelle und ECR mit Kollagen IV. Es wird vermutet, dass Col-IV zwar noch von osteogenen Vorläuferzellen produziert wird, nicht jedoch von reifen und späteren Differenzierungsstufen in Richtung der osteoblastären Linie (Schieker et al. 2004, Deschaseaux et al. 2000, Chichester et al. 1993). Somit ist Kollagen IV möglicherweise hilfreich in der Unterscheidung zwischen hMSC und Osteoblasten.

Einer der bekanntesten Vertreter der Glycoproteine der Extrazellulärmatrix ist Fibronectin, ein Dimer bestehend aus zwei durch Disulfidbrücken verbundene Untereinheiten (Aumailley et al. 1996). Jede Untereinheit ist in fünf oder sechs Domänen gefaltet, die wiederum charakteristische Bindungseigenschaften für andere Moleküle oder Zellen aufweisen (Engel et al. 1981). Fibronectin kann zu Fibrillen polymerisieren, die wiederum durch Disulfidbrücken stabilisiert werden. An speziellen Punkten, den sog. fibrillären Adhäsionen, sind diese Fibrillen z.B. mit Integrinen verbunden oder lagern sich mit Kollagenstrukturen zusammen, um so die Matrixstabilität zu erhöhen. Fibronectin wird in hohem Maß von Fibroblasten, aber auch von Osteoblasten und hMSC sezerniert (Roufosse et al. 2004, Silva, Jr. et al. 2003, Vogel et al. 2003, Minguell et al. 2001, Chichester et al. 1993, Engel et al. 1981). In der Mehrfachfärbung eignet es sich, um auch extrazelluläre Komponenten darzustellen und damit eine bessere Abgrenzung zu den übrigen intrazellulären Markern zu schaffen.

### Strukturproteine

Als Strukturprotein des Cytoskeletts wurde eine Färbung gegen F-Actin durchgeführt, eine Mikrofilament-Untereinheit des Proteins Actin (Karp G. 2005). Actin ist die Hauptkomponente des Cytoskeletts und kommt in allen eukaryotischen Zellen vor. Es ist quantitativ das häufigste nachweisbare Protein dieser Zellen. Das helixförmige

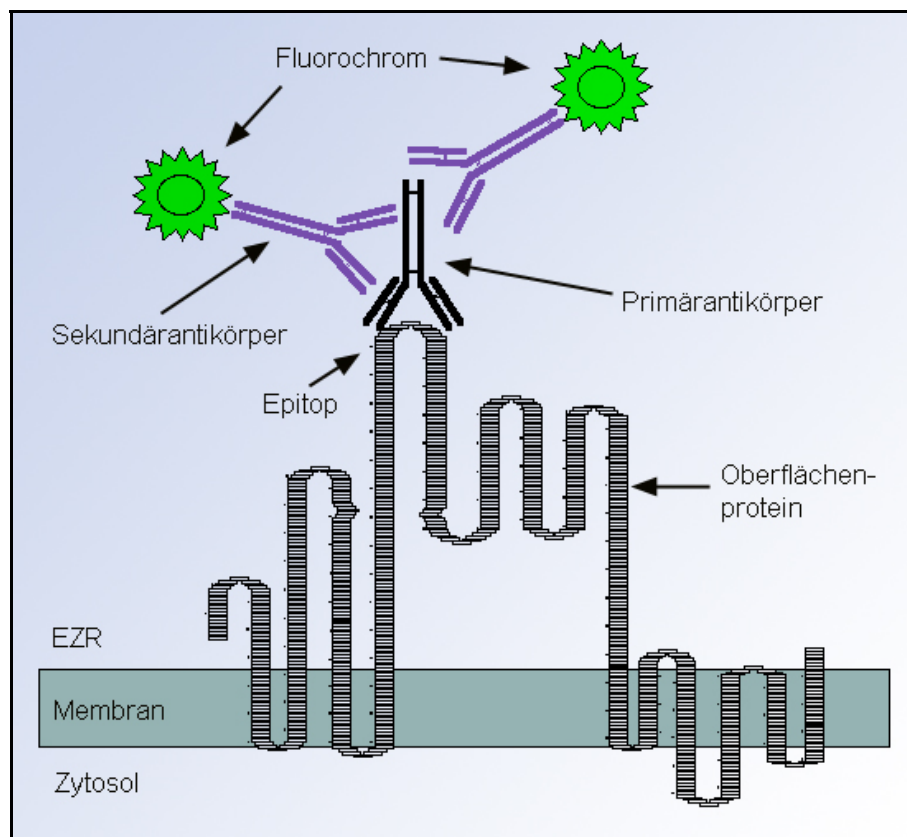
filamentöse F-Actin wird durch Polymerisation der globulären G-Actinuntereinheiten gebildet. Die wichtigsten Aufgaben des Actin sind die Stabilisierung und Fortbewegung der Zelle, wobei die Struktur des Actinskeletts ständig dynamischen Prozessen unterliegt und sich in einem stetigen Umbauprozess befindet. Membran-Mikrofilament-verbindende Proteine verankern corticale Actinnetzwerke an der Zellmembran, indem sie Actinfilamente mit integralen Membranproteinen verbinden. Diese Membranproteine können dann wiederum mit der extrazellulären Matrix verknüpft sein. So entstehen direkte Wechselwirkungen zwischen Actin und einigen fokalen Adhäsionsproteinen wie z.B. vinculin, tensin,  $\alpha$ -actinin, parvin und actopaxin (Docheva D et al. 2007). Die bei der Zellfortbewegung entstehenden Membranausziehungen, sog. Filopodien, beinhalten in ihrem Zentrum jeweils ein Actinbündel, um diese Fortsätze in der komplexen Cytoskelettarchitektur zu verfestigen (Lodish H et al. 2001). Die Darstellung des Cytoskeletts in dieser Studie sollte zusätzliche Informationen über die Zellmorphologie bereitstellen.

## **1.2. Immunzytochemie**

### **1.2.1. Nachweismethoden**

Als Nachweismethode für die o.g. Marker wurde die indirekte Immunfluoreszenz gewählt. Ihr größter Vorteil gegenüber anderen Verfahren ist für unsere Aufgabenstellung die Möglichkeit der simultanen Detektion mehrerer Antigene auf einer Zelle. Ein Ansatz, der in der Literatur als viel versprechend angesehen wird, eine Identifizierung von Zelllinien ohne einen singulären spezifischen Marker, wie es bei hMSC der Fall ist, zu ermöglichen (Izadpanah et al. 2006, Kemp et al. 2005, Liu et al. 1994). Dieser Nachweis kann durch die Beurteilung des jeweiligen Färbemusters über die Aussage von Positivität und Negativität hinaus geführt werden. Extrazelluläre Färbemuster können also deutlich von intrazellulären und von Matrixkomponenten unterschieden werden. Zudem können neben der Untersuchung der gewünschten Marker zusätzlich Informationen über die Morphologie der untersuchten Zellen gewonnen werden. Denn gerade in der Untersuchung von hMSC werden Zellmorphologie und -morphometrie häufig als charakteristisches Kriterium zur Beurteilung der Stammzeleigenschaften hinzugezogen (Raimondo et al. 2006, Colter et al. 2001, Prockop et al. 2001). Daher bietet diese Möglichkeit u.a. einen großen Vorteil gegenüber FACS-

Analysen, für die die Zellen in Suspension gebracht werden müssen und somit ihre eigentliche Morphologie verlieren. Die immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung bietet weiterhin den Vorteil, in dem als heterogen anzusehenden Gemisch der hMSC einzelne Zellen auf ihr Proteinexpressionsprofil hin zu untersuchen. So ergibt sich die Möglichkeit, die tatsächliche Stammzelle isoliert und vor Differenzierungsassays zu untersuchen. Im Falle der indirekten Immunfluoreszenz wird zunächst das Antigen der Zelle mit einem Primärantikörper markiert, welcher in einem zweiten Schritt durch einen gegen den ersten Antikörper gerichteten, Fluorochromgekoppelten Sekundärantikörper mikroskopisch sichtbar gemacht werden kann. Durch die Bindung mehrerer Sekundärantikörper an einen Primärantikörper wird das optische Signal der Färbung augmentiert (Lamvik et al. 2001). Es wurden hierfür ausschließlich monoklonale Antikörper verwendet, die in Hybridomzellen produziert wurden (Milstein et al. 1978).



**Abb. 2** Indirekte Immunfluoreszenz am Beispiel eines Oberflächenproteins. Man beachte die Möglichkeit der Bindung mehrerer Sekundärantikörper an einen Primärantikörper. So entsteht ein Augmentierungseffekt der Färbung.

### 1.2.2. Grundlagen der Fluoreszenzentstehung

Bei der Absorption von Licht einer bestimmten Wellenlänge, sog. Anregungslicht ist bei verschiedenen Molekülen eine gleichzeitige Emission von Licht mit größerer Wellenlänge zu beobachten. Dieses Verhalten, d.h. die Absorption von kurzwelligem Licht und die Emission von längerwelligem Licht wird als Fluoreszenz bezeichnet (Beutner 1961).

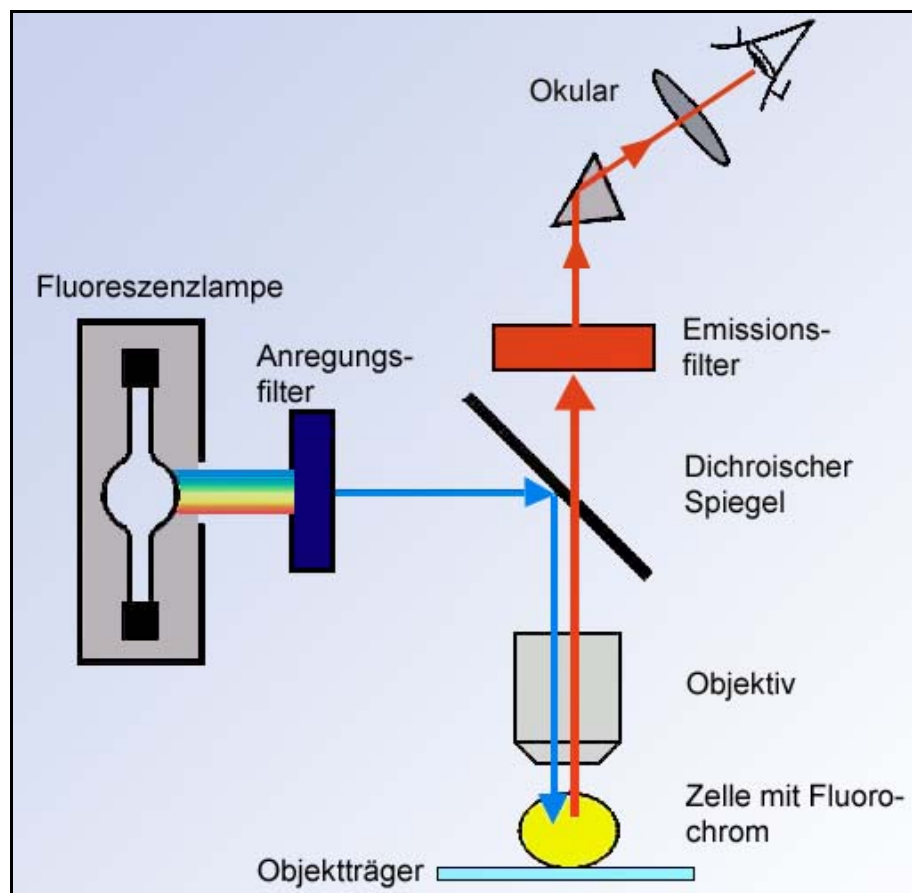
Bestimmte Elektronen der fluoreszierenden Moleküle absorbieren hierbei die Photonen und gelangen dadurch auf ein höheres Energieniveau. Die Elektronen können sich jedoch nicht auf diesem Niveau halten und fallen deshalb praktisch augenblicklich auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurück. Dabei setzen sie die aufgenommene Energie wieder frei und es kommt zur Emission des Fluoreszenzlichts. Allerdings wird die Energie nicht nur als Licht freigesetzt. Deshalb ist das emittierte Licht etwas energieärmer als das Anregungslicht. Energieärmere Lichtstrahlung besitzt jedoch eine größere Wellenlänge und deshalb auch eine andere Lichtfarbe als energiereichere Lichtstrahlung. Für die Fluoreszenz ergibt sich hieraus die bereits eingangs erwähnte Eigenschaft, nämlich die Absorption von kurzwelligem Licht und die Emission von längerwelligem Licht, auch als Stokes-Regel bezeichnet (Beutner 1961). Das emittierte Fluoreszenzlicht besitzt oft eine um etwa 20-50 nm größere Wellenlänge als das Anregungslicht. Diese Differenz in der Wellenlänge zwischen den beiden Lichtarten wird als Stokes-Differenz bezeichnet.

### 1.2.3. Fluoreszenzmikroskopie

Aus dem weißen Licht einer Xenon- oder Quecksilberdampf-Lampe wird durch einen Anregungsfilter die für die Anregung des Fluorochroms geeignete Wellenlänge herausgefiltert. Im Innern des Mikroskops wird dieses Licht von einem dichroischen Spiegel (auch dichromatischer Spiegel) auf das Präparat reflektiert. Dichroische Spiegel haben eine kritische Wellenlänge: Licht mit kleineren Wellenlängen wird reflektiert, Licht mit größeren Wellenlängen durchgelassen. Der Spiegel wird so gewählt, dass die kritische Wellenlänge zwischen Anregungs- und Emissionsmaximum des Fluorochroms liegt. So wird das Anregungslicht durch das Objektiv zum Präparat gelenkt, während das langwelligere Fluoreszenzlicht den Spiegel passiert und durch das Okular zum Auge gelangt. Eine möglichst vollständige Trennung von Anregungs- und Fluoreszenzlicht durch dieses optische System ist die Voraussetzung für eine



gute Abbildung im Mikroskop. Für die simultane Analyse von mehreren verschiedenen Fluorochromen können sog. Tripleband Filtersätze eingesetzt werden. Diese verfügen über einen Anregungs- und Emissionsfilter mit jeweils drei Bandpässen und einen darauf abgestimmten dichroischen Filter. Dabei handelt es sich meist um Bandpässe in Wellenlängenbereichen aus gut abgrenzbaren Spektren, wie z.B. blau, grün und rot.



**Abb. 3** schematischer Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops. Dargestellt ist der Strahlengang des Lichts von Fluoreszenzlampe zum Auge des Betrachters.

### 1.3. Aufgabenstellung

Das Interesse an humanen mesenchymalen Stammzellen ist seit den Fortschritten in ihrer Anwendung im Bereich der regenerativen Medizin und des Tissue Engineerings stetig gewachsen, da hMSC die Fähigkeit besitzen, sich ohne Verlust ihrer Stammzelleigenschaften selbst zu replizieren und in verschiedenste Gewebearten in vitro und in vivo zu differenzieren (Caplan et al. 2006, Grove et al. 2004, Otto et al. 2004, Cancedda et al. 2003, Bianco et al. 2001). Dabei ist es trotz intensiver Forschung bisher nicht gelungen, die heterogene Zellpopulation der hMSC a priori und ohne die Verwendung von Differenzierungsassays zu charakterisieren (Kassem 2006, Otto et al. 2004, Prockop et al. 2003). Es ist kein zellulärer Marker bekannt, der ausschließlich und spezifisch von hMSC exprimiert wird (Dominici et al. 2006, Kemp et al. 2005).

Das Ziel dieser Untersuchung ist es daher, ohne den Einsatz von Differenzierungsassays durch die Etablierung eines simultanen immunzytochemischen Färbeprofiles mehrerer Marker hMSC auf Einzelzellniveau eindeutig zu identifizieren und sie gegenüber Osteoblasten und Fibroblasten abzugrenzen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Zellkultur

#### 2.1.1. Zellen und Medien

Es wurden drei verschiedenen Zelllinien untersucht. Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) wurden von der Firma Cambrex bezogen. Die Gewinnung der Zellen erfolgte durch Auftrennung über Dichtegradienten von Knochenmarkaspiraten gesunder Spender unterschiedlichen Geschlechts und unterschiedlichen Alters. Anschließend wurde jede Zellpopulation von der Firma hinsichtlich ihrer Differenzierungsfähigkeit in Richtung der osteogenen, chondrogenen und adipogenen Zelllinie getestet. Eine Identifizierung der Stammzellen erfolgte zusätzlich über den Nachweis bzw. das Fehlen bestimmter Oberflächenantigene in der Durchflußcytometrie gemäß des ursprünglichen Protokolls von Pittenger (Pittenger et al. 1999). So sollten möglichst standardisierte und vergleichbare Bedingungen in der Versuchsplanung geschaffen werden. Die weitere Kultivierung erfolgte mit dem vom Hersteller empfohlenem Basismedium und Zugabe des Supplement Kit, bestehend aus fetalem Rinderserum (FBS), L-Glutamin und der Antibiotika Penicillin und Streptomycin. Es wurden keinerlei zusätzlichen Wachstumsfaktoren verwendet.

Humane Osteoblasten (hOB) wurden von der Firma PromoCell erworben. Die Zellgewinnung erfolgte während chirurgischer Eingriffe am Beckenknochen. Der Nachweis, dass es sich um Osteoblasten handelt, wurde durch Bestimmung der Osteocalcin Sekretion und Vitamin D<sub>3</sub>-stimulierten alkalischen Phosphatase Produktion durchgeführt (Kasperk et al. 1995). Dem vom Hersteller empfohlenen Grundmedium wurden gemäß Protokoll FBS, Gentamycin und Amphotericin B hinzugefügt. Auf weitere Wachstumsfaktoren wurde verzichtet.

Humane Fibroblasten (HS-27) wurden von der Firma ATCC bereitgestellt. Die Zellen wurden aus der Haut bzw. dem Präputium männlicher Neugeborener isoliert und mit dem entsprechenden Basismedium (DMEM) unter Zugabe von 4,5 g/L 90% Glucose, 4 nM L-Glutamin, 1,5 g/L Natriumbicarbonat und 10% FBS kultiviert.

Alle verwendeten Materialien und Geräte sind mit Typenbezeichnung, Katalog Nummer und Herstellerangaben auf Seite 32 unter Kapitel 2.4 in Tabelle 5 aufgeführt.

### 2.1.2. Zellkulturbedingungen

Die Zellen wurden in Kulturflaschen in einen Standard-Brutschrank unter konstanten Bedingungen von 25°C und 5% CO<sub>2</sub> Zufuhr kultiviert. Die Aussaat der hMSC und HS27 erfolgte in einer geringen Konzentration von 1x10<sup>3</sup> Zellen/cm<sup>2</sup> (Prockop et al. 2001). Aufgrund längerer Zellzyklen und niedrigerer Teilungsraten wurden die hOB in einer höheren Konzentration von 1x10<sup>4</sup> Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesetzt. Die Zellzählung erfolgte hierbei nach Standardprotokoll in einer Neubauer Zählkammer (s. Anhang). Ein Medienwechsel fand alle drei bis vier Tage statt, wobei das alte Medium mit sterilen Glaspipetten und einer Vakuumpumpe abgesaugt und durch neues entsprechendes Kulturmedium ersetzt wurde. Bei einer Konfluenz von 40 - 50% wurden die Zellen gemäß der jeweiligen Protokolle passagiert. Dabei erfolgte die Ablösung der Zellen vom Boden der Kulturflaschen nach Entfernung des Mediums durch Zugabe von Trypsin/EDTA Lösung. Anschließend wurden die gelösten Zellen zentrifugiert, in Kulturmedium resuspendiert und nach Zellzählung wieder in entsprechendem Behältnis ausgesetzt (s. Passageprotokolle). Während der Zellkultur wurde eine Zelldichte von 50% in den Kulturflaschen der hMSC und hOB nie überschritten. HS27 Zellen erreichten aufgrund der hohen Proliferationsrate stets Subkonfluenz. Sämtliche Arbeiten mit allen Zelllinien erfolgten unter einer sterilen Arbeitsbank, welche über einen kontinuierlichen laminaren Luftstrom verfügte. hMSC und hOB wurden nur bis zur 7. Passage immunzytochemischen Färbungen unterzogen, HS27 bis zur 12. Passage.

#### Passageprotokoll hMSC und HS27

- Medium entfernen, Zellen waschen mit 3 ml PBS (ohne Ca, Mg, Fa. GibcoBRL)
- Zellen abtrypsinieren mit 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung (Fa. BioWhittaker)
- mikroskopische Kontrolle nach 5 min, max. 15 min Einwirkzeit des Trypsin/EDTA
- Zugabe von 3 ml Medium, nachdem Zellen gleichmäßig abgelöst waren; das Serum des Kulturmediums bewirkte die Neutralisierung des Trypsins
- Suspension zentrifugieren (600 g für 5 min), Überstand anschließend absaugen, um Trypsinreste zu entfernen
- Zellen in Kulturmedium resuspendieren und zählen

#### Passageprotokoll hOB

- Medium entfernen, Zellen waschen mit 3 ml Hepes BSS (Fa. PromoCell)
- Zellen abtrypsinieren mit 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung (Fa. PromoCell)

- nach 3 min mikroskopische Kontrolle, max. 7 min Einwirkzeit des Trypsin/EDTA
- Zugabe von 2 ml Trypsin Neutralis Solution (Fa. PromoCell), nachdem Zellen homogen abgelöst waren
- Suspension zentrifugieren (220 g für 4 min), Überstand anschließend absaugen, um Trypsinreste zu entfernen
- Zellen in Medium resuspendieren und zählen

## 2.2. Immunzytochemie

### 2.2.1. Immunfluoreszenzfärbung auf single cell Niveau

Die immunzytochemischen Färbungen der verschiedenen Zelllinien wurden auf unbeschichteten Glasobjektträgern durchgeführt. Die Überführung der Zellen aus den Kulturflaschen erfolgte gemäß den Passagierungsprotokollen, wobei die Konzentration der auf den Glasobjektträgern aufzubringenden Zellsuspension auf  $1 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup> festgelegt wurde. Um ein steriles Arbeiten zu ermöglichen, wurden die Glasobjektträger in spezielle Kulturschalen (Quadriperm plus) überführt und mit dem Volumen von 1ml Zellsuspension benetzt. Die Inkubation der Zellen erfolgte anschließend für 24 Stunden, bzw. 72 Stunden (hOB) im Brutschrank, um ihre Adhärenz auf dem Glasobjektträger und eine Wiederaufnahme der Zellstoffwechsellleistungen zu gewährleisten. Nach der Inkubationszeit erreichten die Zellen eine Konfluenz von ca. 50%, auch als Subkonfluenz beschrieben (Siggelkow et al. 1998).

Vor der Fixierung wurde das Zellmedium abgesaugt und der Überstand durch gründliches Waschen mit PBS entfernt. Gemäß des Färbeprotokolls erfolgte die Fixierung und gleichzeitige Permeabilisierung der Zellen auf dem Glasobjektträger durch 3,7% Formalin und Aceton. Nach Verdampfung des Aceton konnte der Glasobjektträger mittels eines Fettstifts (DakoPen) in 8 Felder unterteilt werden (s Abb. 4). Auf jedem dieser Felder erfolgten nun simultan die unterschiedlichen Einzel- und Mehrfachfärbungen, sowie Kontrollen an einer identischen Zellpopulation. Jeweils ein Feld pro Objektträger diente als Negativkontrolle und wurde nur mit den jeweiligen verwendeten Sekundärantikörpern inkubiert, ohne vorheriges Aufbringen eines Primärantikörpers.

Nach dem vollständigen Verdampfen des Acetons wurde die Färbung gegen F-Actin mit Phalloidin durchgeführt. Phalloidin stellt unter den verwendeten Fluoreszenzmar-

kierungen eine Ausnahme dar. Es ist ein cyclisches Alkaloid des weißen Knollenblätterpilzes (*Amanita phalloides*), und hemmt die Depolarisierung der Actinfilamente, indem es spezifisch an die f-Actin Untereinheiten bindet und die Depolarisierung der Actinfilamente blockiert. Für die Immunhisto- bzw. zytochemie wird diese Eigenschaft genutzt und ein Fluorochrom direkt an das Phallotoxin gebunden ist, d.h. primär gelabelt. Es ist also kein weiterer, indirekter Nachweis durch einen Sekundärantikörper notwendig.

Anschließend wurde der Objektträger in PBS-T rehydriert, um die Proteinstruktur wieder aufzufalten. Danach folgte das sog. Blocken durch die 1stündige Inkubation mit Eselserum in einer Verdünnung mit PBS 1:20. Da alle verwendeten sekundären Antikörper im Esel produziert worden waren (s. Tab. 2), war es so möglich, negativ geladene Molekülgruppen abzusättigen und unspezifische Bindungen der jeweiligen Antikörper zu verhindern.

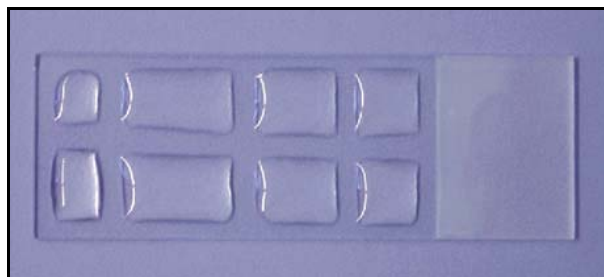
Vor dem Aufbringen der Primärantikörper wurde das überschüssige Blocking-Medium vom Objektträger abgeklopft und 25 µl der vorher angesetzten Primärantikörpersuspension auf jedes Feld aufgetragen. Die Verdünnung der Antikörper erfolgte entsprechend ihrer Anwendungskonzentration (s. Tab. 1) mit einer speziellen Antikörperverdünnungslösung, die mit Natriumazid versetzt die Kontaminationsgefahr der Suspension verringern sollte. Somit wurde eine längere Lagerung ermöglicht. Es wurden Primärantikörper gegen 5 verschiedene Antigene verwendet und diese 30 Minuten inkubiert (genaue Bezeichnung und Herstellerangaben s. Tab. 1). Die Primärantikörper wurden auf den unterteilten Feldern des Objektträgers sowohl als Einzelfärbung, als auch in jeweils gleicher Konzentration als Antikörpergemisch für die Mehrfachfärbung aufgetragen. Die Einzelfärbungen dienten dabei auch als Positivkontrolle für die Mehrfachfärbung, da so die Spezifität und Charakteristik der jeweiligen Färbemuster zwischen Einzel- und Mehrfachfärbung verglichen werden konnten. Die Primärantikörper wurden alle in unterschiedlichen Spezies generiert und waren hochspezifisch auf die Bindung mit humanen Antigenen ausgerichtet.

Die Sekundärantikörper wurden ebenfalls in einem Volumen von 25µl für die Dauer von 30 Minuten aufgebracht, nachdem die Überstände der Primärantikörper durch 3maliges Waschen für 5 Minuten in PBS entfernt worden waren. Die Sekundärantikörper waren jeweils gegen die Spezies gerichtet, in der der korrespondierenden Primärantikörper erzeugt worden war. Eine Kreuzreaktion gegenüber artverwandten Spezies wurde dadurch ausgeschlossen, dass jeder Sekundärantikörper gegen alle

übrigen verwendeten Spezies vom Hersteller adsorbiert worden war. Ein gegen Mausproteine gerichteter Sekundärantikörper konnte also nicht mit Epitopen aus Kaninchen reagieren. Alle Sekundärantikörper selbst wurden ausschließlich im Esel generiert. Damit ermöglichte sich das gleichzeitige Aufbringen ohne die Möglichkeit einer Kreuzreaktion. Die verschiedenen Sekundärantikörper waren jeweils an unterschiedlichen Fluorochrome gebunden (siehe Tab. 2), die eine Wellenlängendifferenz von mindestens 10 nm aufwiesen (s. Tab. 3).

Nach einem Waschschrift wurde eine Kernfärbung mit 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) vorgenommen. DAPI lagert sich spezifisch an dsDNA an und ermöglicht somit einen weiteren Nachweis, dass es sich bei den gefärbten Strukturen um vollständige Zellen handelt.

Nach ausgiebigem Waschen wurden die Präparate mit einem hydrophilen, polymerisierenden Eindeckmedium (ProLong anti-fade Kit, Fa. Molecular Probes) verschlossen, um eine Austrocknung zu verhindern. Spezielle Zusätze im Eindeckmedium reduzierten ein Verblässen (sog. photo bleaching) der Fluorochrome. Die Objektträger härteten über Nacht bei 4°C aus und wurden am darauffolgenden Tag ausgewertet. Alle Inkubationsschritte wurden in einer abgedunkelten Feuchtkammer durchgeführt.



**Abb. 4** Glasobjektträger mit durch Fettstift abgetrennten Inkubationsfeldern

### 2.2.2. Protokoll Immunfluoreszenzfärbung

Aceton/Formalin Fixierung:

- Glasobjektträger (GOT) 2 min in PBS waschen
- 2 min in 3,7% gepuffertem Formalin bei Raumtemperatur (RT) waschen
- erneut 2 min in PBS waschen
- 3 min in -20°C Aceton fixieren, dann GOT trocknen lassen
- mit Fettstift 8 Felder abtrennen (siehe Abb. 4); GOT beschriften

**Phalloidinfärbung:**

- 25µl Antikörper-Lösung pro Feld auftragen
- 20 min bei RT in abgedunkelter Feuchtkammer inkubieren

**Blocken:**

- in PBS mit 1% Tween20 (PBS-T) rehydrieren, dann gut abklopfen
- 25µl Blockierungslösung (donkey Serum mit PBS 1:20)
- 1h mit bei RT in Feuchtkammer inkubieren

**Primärantikörper:**

- Blockierungslösung abklopfen
- 25µl Antikörper-Lösung pro Feld auftragen
- 30 min bei RT in abgedunkelter Feuchtkammer inkubieren
- 3 mal 5 min in PBS-T waschen

**Sekundärantikörper:**

- Blockierungslösung abklopfen
- 25µl Antikörper-Lösung pro Feld
- 30 min bei RT in abgedunkelter Feuchtkammer inkubieren
- 3 mal 5 min in PBS-T waschen

**Kernfärbung:**

- 20 µl DAPI (Verdünnung 1:10 000) pro Feld auftragen
- 1 min bei RT in Feuchtkammer im Dunkeln inkubieren
- 3 mal 5 min in PBS-T waschen

**Eindeckeln:**

- Pro Long Komponente B im Wasserbad oder Heizblock für 15 min auf 50°C erhitzen
- Komponente A und B mischen
- weitgehend die Flüssigkeit von den GOT abklopfen
- 70µl Eindeckelmedium pro GOT auftragen und gleichmäßig verteilen
- Deckglas aufbringen und die Luftblasen durch seitliches Ausstreichen entfernen, anschließend mind. 3 h im Dunkeln bei 4°C aushärten



### 2.2.3. Antikörper

Primärantikörper	Hersteller	Cat. Nr.	Verdünnung
rat anti-human CD44	DSHB	Hermes-1	1:5
mouse anti human endoglin (CD105)	DSHB	P3D1	1:5
rabbit anti-human VCAM-1 (CD106)	SantaCruz Biotechnologies	SC-8304	1:5
goat anti-human collagen-IV	Accurate Chemical	YMPS063	1:20
sheep anti-human fibronectin	Biozol	BLZ00279	1:1200

**Tab. 1** Primärantikörper mit Konzentrations- und Herstellerangaben

Sekundärantikörper	Hersteller	Cat. Nr.	Verdünnung
AMCA conjugated donkey anti-rat IgG	Dianova	712-155-153	1:25
Fluorescein (FITC) conjugated donkey anti-rabbit IgG	Dianova	711-095-152	1:200
TexasRed conjugated donkey anti-mouse IgG	Dianova	715-075-151	1:25
Alexa Fluor546 labeled donkey anti-goat IgG	Molecular Probes	A11056	1:125
Cy2 conjugated donkey anti-sheep IgG	Dianova	713-225-147	1:2000
4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)	Molecular Probes	D1306	1:10000
AlexaFluor633 anti F-actin phalloidin	Molecular Probes	A22284	10 units / 500 µl

**Tab. 2** Sekundärantikörper mit Konzentrations- und Herstellerangaben

## 2.3. Bildakquisition

### 2.3.1. Fluoreszenzmikroskopie

Alle mikroskopischen Untersuchungen erfolgten an einem Axioskop 2 Mikroskop (Fa. Zeiss). Das gefärbte Präparat wurde mit Licht einer 75 Watt Xenon Kurzbogenlampe bestrahlt. Diese erzeugte ein kontinuierliches Lichtspektrum definierter Wellenlänge von ca. 270-700 nm. Es wurden drei verschiedene Filtersets verwendet, die jeweils aus Anregungsfilter, Strahlteiler und Emissionsfilter bestanden. Die Aufnahmen mit der Digitalkamera der Einfach- und Mehrfachfärbungen wurden mit dem Triple-band Filterset F61-002 (Fa. AHF) durchgeführt, das für die simultane Untersuchung von blauen, grünen und roten Spectra geeignet ist. So konnten mit einer Aufnahme jeweils das zu untersuchende Fluorochrom und die DAPI Kernfärbung erfasst werden. Zur Auswertung der Färbungen mit dem Spectral-Interferometer wurde für das blaue Spektrum der Filtersatz 01 (Fa. Zeiss) verwendet und für grüne, rote und infrarote Spectra das Triple-band Filterset SKY (Fa. ASI). Es waren also zwei Aufnahmen eines Ausschnitts der Mehrfachfärbung nötig, um das gesamte Farbspektrum mit dem Interferometer analysieren zu können. Die Triple-band Filtersets besaßen jeweils einen Anregungs- und Emissionsfilter mit drei Bandpassbereichen und einen darauf abgestimmten polychroitischen Filter (genaue Angaben der Wellenlängenbereiche s. Tab 4).

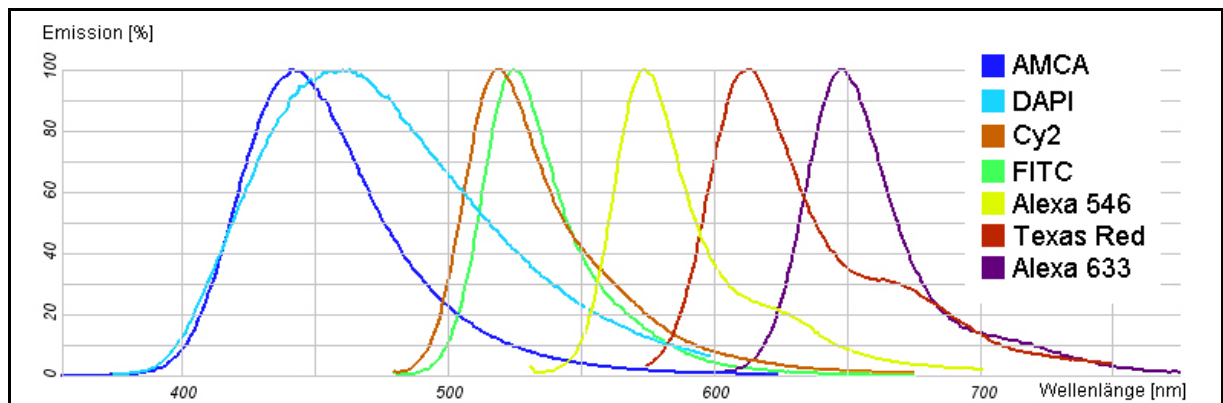
Die Fluorochrome emittierten nach Herstellerangaben Licht im Wellenlängenbereich von 444 nm (AMCA) bis 639 nm (Alexa Fluor 633), also von blau bis zu infrarot. Der kleinste Abstand betrug dabei 14 nm zwischen Cy2 und FITC (siehe Tab. 3 und Abb. 5). Eine Diskriminierung bis zu 10 nm durch Spectralanalyse ist bereits in der Literatur beschrieben (Schieker et al. 2004, Rothmann et al. 1998, Malik et al. 1996).

Die Präparate wurden mit einem 40fach Öl Objektiv untersucht. Alle Untersuchungen und Aufnahmen fanden in einem abgedunkelten Raum statt. Die digitalen Aufnahmen wurden mittels einer 3,3 Megapixel CCD Farbkamera (Cybershot DSC S75, Fa. Sony) vollzogen.

Fluorochrom/Farbstoff	Anregung	Emission
AMCA	347 nm	444 nm
DAPI	358 nm	461 nm

Cy 2	489 nm	503 nm
FITC	495 nm	517 nm
Alexa Fluor546	556 nm	573 nm
Texas Red	596 nm	613 nm
Alexa Fluor 633	632 nm	647 nm

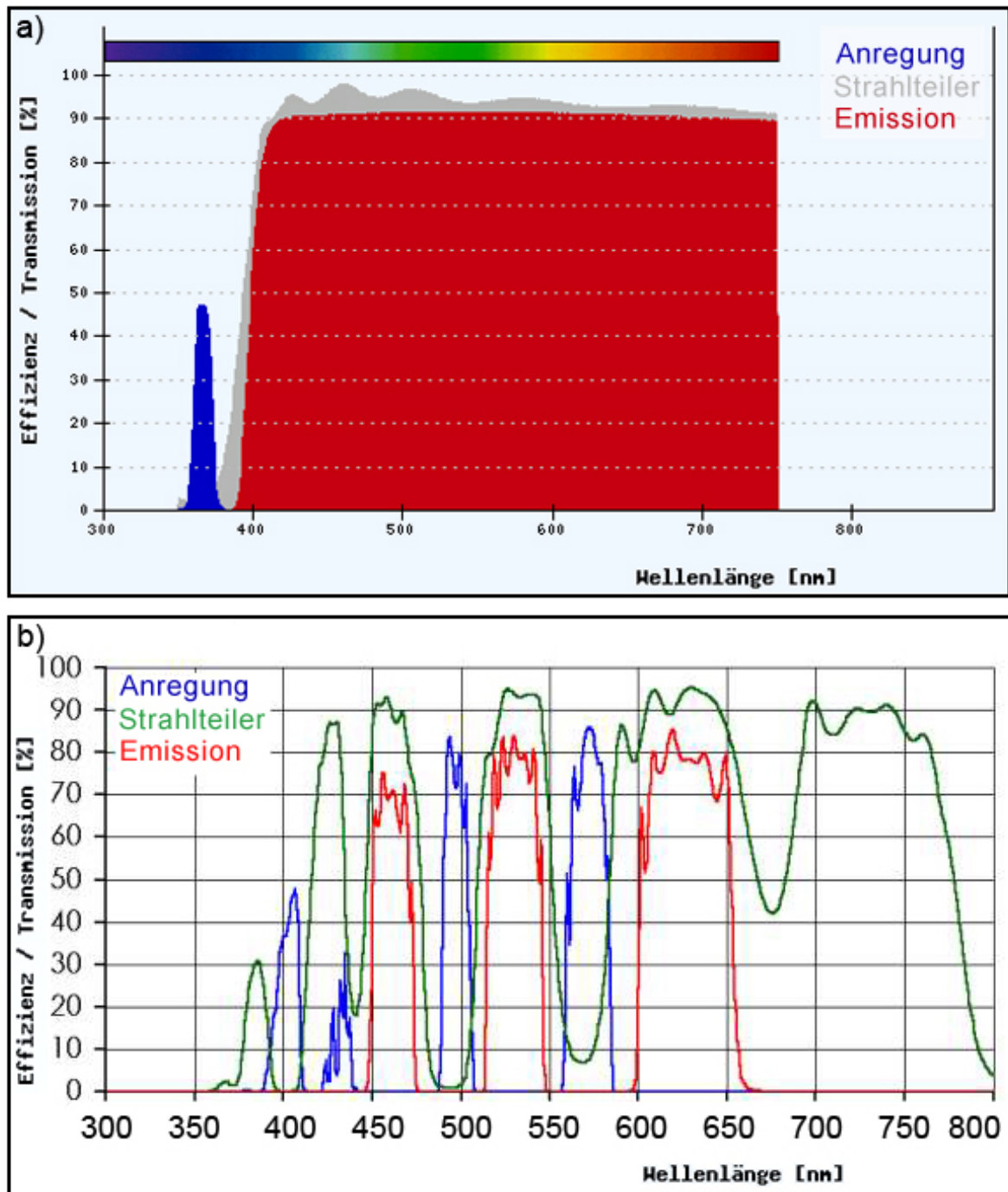
**Tab. 3** *Verwendete Fluorochrome mit Wellenlängenanregung und –emission (für Alexa Farbstoffe: Angaben laut Hersteller, übrige Angaben Fa. Zeiss)*



**Abb. 5** *Graphische Darstellung der Emissionsspektren aller verwendeten Fluorochrome für die Aufnahme durch Filtersatz01 (blaue Spectra) und Filterset SKY (übrige Spectra). Die Graphik wurde durch den Fluorescence Spectra Viewer (Fa. Invitrogen) erstellt*

Filter	Hersteller	Anregung [nm]	Emission [nm]	Verwendet für Fluorochrom
Filtersatz 01	Zeiss, Deutschland	BP 365/12	LP 397	AMCA, DAPI
Triple-band Filterset SKY	ASI, Israel	465-485 555-565 630-655	500-545 580-620 660	FITC, Cy2, Alexa Fluor546 / 633, Texas Red
Triple-band Filterset F61-002	AHF Analysentechnik GmbH, Deutschland	BP 360/51 BP 485/17 BP 560/18	450-475 510-545 600-650	FITC, Cy2, Alexa Fluor546, Texas Red, AMCA, DAPI

**Tab. 4** *Produktinformationen der verwendeten Filtersysteme. Die Abkürzung bedeuten: BP=Bandpass, LP=Longpass. Die Angabe BP 365/12 zeigt also, dass es sich um einen Bandpass Anregungsfilter handelt, der einen Bereich von 12nm mit dem Mittelpunkt bei 365 nm passieren lässt.*



**Abb. 6** Graphische Darstellung der Anregungs- und Emissionsspectra der verwendeten Filtersets. a) Filtersatz01, Fa. Zeiss; b) Triple-band Filterset F61-002, Fa. AHF

### 2.3.2. Spectrale Bildanalyse

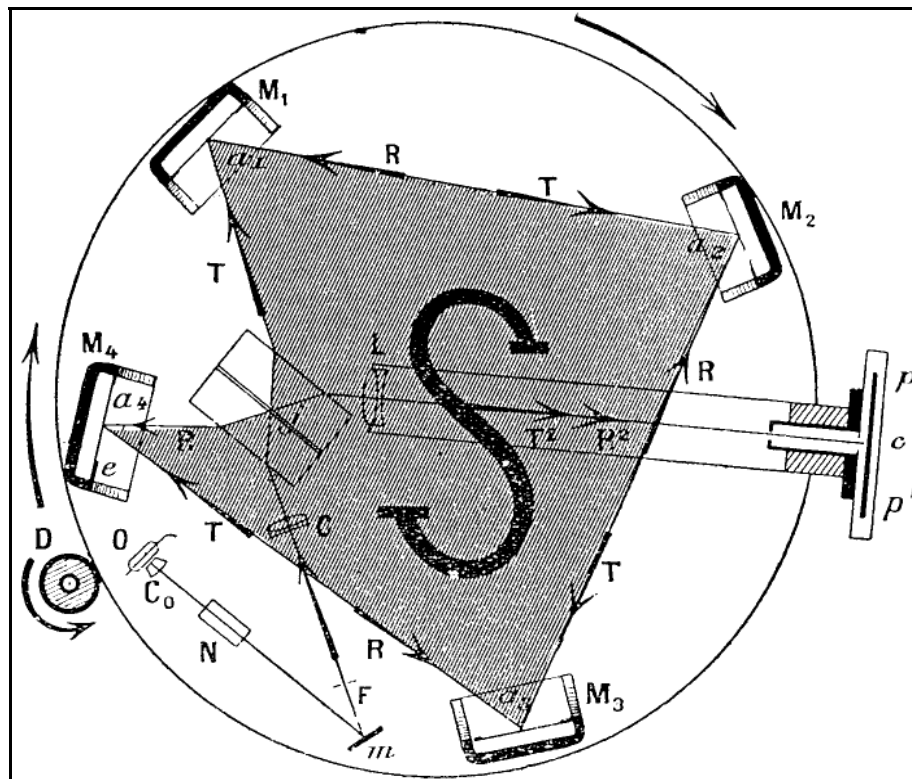
Da bei Mehrfachfärbungen aufgrund von Überlagerung verschiedenfarbiger Fluorochrome zu Mischfarben die Abgrenzung eng beieinander liegende Farbspektren mit dem menschlichen Auge nicht mehr möglich ist, wurde die Methode der spectralen Bildanalyse eingesetzt. Ein Verfahren, das bereits bei Chromosomenanalyse als multicolor „fluorescence in situ hybridisation“ (FISH) eingesetzt wird (Schrock et al. 2006, Macville et al. 1997). Die spectrale Bildanalyse erfolgte durch das Sagnac Interferometer Spectra Cube SD-200. Der Spectra Cube war auf ein Axioskop2 Mikroskop montiert und mit einer 1,3 Megapixel schwarz-weiß CCD Kamera verbunden. Das gesamte System war an einen PC angeschlossen. Die Auswertung der gewonnenen Bilddaten, das sog. linear unmixing, wurde durch die Software Spectra View ermöglicht, da eine Diskriminierung von Wellenlängenunterschieden unterhalb 30 nm vom menschlichen Auge nicht mehr geleistet werden kann (Rothmann et al. 1998, Malik et al. 1996).

Das Prinzip des Interferometers ist die Auftrennung des vom Präparat und damit von der Gesamtheit, der darauf befindlichen Fluorochrome emittierten Lichtes in seine reinen Spectra. Das Licht wird dabei zuerst mit einem Strahlteiler in zwei Teilstrahlen aufgeteilt. Diese werden mit Hilfe von Spiegeln in entgegengesetzter Richtung im Kreis geführt und treffen an dem Strahlteiler wieder aufeinander. Zur Darstellung werden die Teilstrahlen dann auf einen Schirm gelenkt. Hier entsteht ein Interferenzmuster, das von der Digitalkamera festgehalten und als sog. frame gespeichert wird. Befindet sich die Anordnung in Ruhe, sind die Wege beider Strahlen gleich lang und in der Mitte des Detektors sieht man konstruktive Interferenz. Wird nun aber der ganze Aufbau um eine Achse senkrecht zur Strahlebene gedreht, ist der optische Weg für beide Teilstrahlen nicht mehr gleich lang, da sich in der Zeit, die das Licht für einen Umlauf benötigt, der Strahlteiler bereits ein Stück weiter gedreht hat. Es entsteht ein Gangunterschied, der sog optical path difference (OPD). Durch Synchronisation der gewonnenen frames mit den Bewegungen des antreibenden Motors ist der OPD für jeden Pixel zu berechnen und daraus sein emittiertes Lichtspektrum zu ermitteln. So ist eine Abgrenzung unterhalb von 10 nm Wellenlängendifferenz möglich (Rothmann et al. 1998, Malik et al. 1996).

Als erstes wurden Referenzspektra aus den jeweiligen Einzelfärbungen gewonnen und in einer Bibliothek gespeichert. Diese Referenzen konnten im Anschluss auf die Mehrfachfärbung angewendet werden und die Emissionen der einzelnen Fluoroch-

rome voneinander getrennt werden. Um die Abgrenzung besser hervorzuheben wurden den Spectra Falschfarben zugeordnet, z.B. gelb für Alexa Fluor 546, das eigentlich im roten Bereich strahlt.

Als Positivkontrolle wurden die aus dem linear unmixing gewonnenen Färbemuster mit den Einzelfärbungsaufnahmen der Sony Digitalkamera verglichen.



**Abb. 7** Prinzip eines Sagnac Interferometers am Beispiel des Originalskizze von George Sagnac aus Georges Sagnac: *L'éther lumineux démontre par l'effet du vent relatif d'éther dans un interféromètre en rotation uniforme*, in: *Comptes Rendus* 157 (1913), S. 708-710. O: Quecksilberdampfampe, J: Strahlteiler, R/T: Teilstrahlen R und T, M1 bis M4: Spiegel, c: Schirm, L: Linse  $T^2/R^2$ : Teilstrahlen mit Unterschiedlicher Länge nach Auftrennung

## 2.4. Verwendete Materialien und Geräte

Material	Typ/ Cat. N	Hersteller
Aceton		Merck, Deutschland
Brutschrank	IG 150	Jouan, Frankreich
Cellcounter	Casy1	Schärfe System, Deutschland
Digitalkamera Farbe	Cybershot DSC S75	Sony, Japan
Digitalkamera Schwarz-Weiss	CCD 5880-C	Hamamatsu, Japan
DMEM		GibcoBRL, Deutschland

ProLong Anti-fade Kit	P7481	Molecular Probes, USA
Fettstift für Immunzytochemie	DakoPen	Dako, Deutschland
Fluoreszenzlampe	Xenon XBO 75 W/2	Osram, Deutschland
Glasobjektträger u. Deckgläser	76 x 26 bzw. 60 x 24 mm	Menzel-Gläser, Deutschland
hMSC	POPT-2501	Cambrex, USA
hMSC Kulturmedium u. -zusätze	POPT-3001	Cambrex, USA
hMSC Trypsin/EDTA Solution	POCC-3232	Cambrex, USA
hOB	C-12720	PromoCell, Deutschland
hOB Kulturmedium	C-27010	PromoCell, Deutschland
HS-27	CRL-1634	ATCC, USA
Interferometer	Spectra Cube SD-200	Applied Spectral Imaging, Israel
Kulturflaschen	T25, T75 flasks	Nalge Nunc Int., USA
Kulturschalen für Objektträger	Quadriperm in vitro	Schubert, Deutschland
Laborwaage	Typ 770	Kern, Deutschland
Mikroskop	Axioskop 2	Zeiss, Deutschland
Pipetten, Pipettenspitzen	10, 20, 100, 200 und 1000µm	Eppendorf, Deutschland
Pipettierhilfe	Pipettus akku	Hirschmann, Deutschland
ProLong anti-fade Kit	P7481	Molecular Probes, USA
Reaktionsgefäße	1,5 ml Eppendorf-Cups	Eppendorf, Deutschland
Schüttler	Typ VM4	CAT, Deutschland
Software	Spectra View 1.6.	Applied Spectral Imaging, Israel
Sterilbank	Biohit	Antares, Deutschland
Sterilfilter	Nalgene 150 ml	Nalge Nunc Int., USA
Sterilisator	Zirbus LTA400	Apparate- und Maschinenbau GmbH, Deutschland
Zentrifuge	CT 422	Jouan, Frankreich
Zentrifugenröhrchen	15 und 50 ml	Nürnbrecht, Deutschland
Zusätze der Antikörperverdün- nungslösung		Fa. Merck, Deutschland

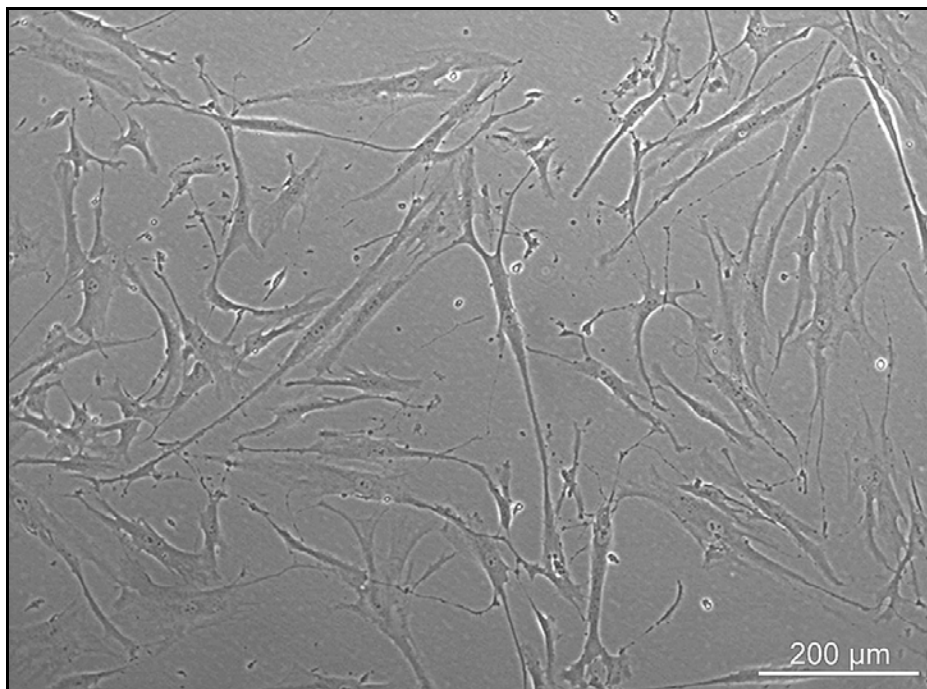
**Tab. 5** Liste verwendeter Materialien

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Zellkultur

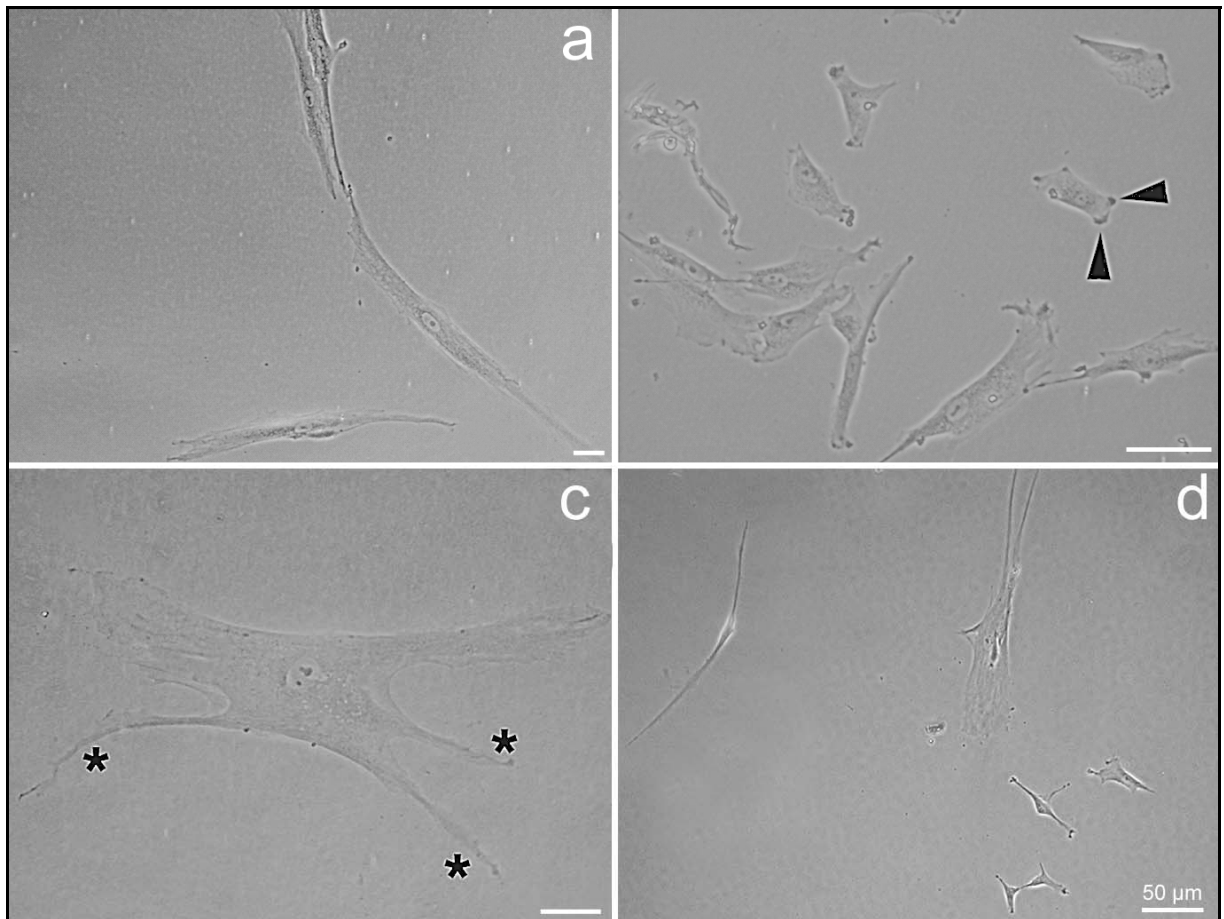
#### 3.1.1. humane mesenchymale Stammzellen

Adhärente hMSC zeigten eine morphologisch heterogene Erscheinung. Zum überwiegenden Teil imponierten sie als ca. 150-500  $\mu\text{m}$  lange, spindelförmige, bipolare Zellen ohne prominente Zellfortsätze. Es fanden sich aber auch zu einem erheblich geringeren Anteil kleine, rundlich bis trianguläre Zellen von ca. 50-100 $\mu\text{m}$  mit phasenkontrast-dichten Membranabschnitten. Nur vereinzelt traten in der Zellpopulation große, flache Zellen mit mehreren weiten Zellausläufern auf, die eine Ausdehnung bis 500 $\mu\text{m}$  beschrieben (s Abb. 9). Im Cytosol dieser Zellen fanden sich vermehrt Vakuolen und das Chromatin im Zellkern zeigte vereinzelt Verdichtungen. Bei steigender Konfluenz neigte sich die Verteilung deutlich zu Gunsten der spindelförmigen Zellpopulation und die Zellen ordneten sich zu einer fischzugartigen Formation. (s. Abb. 8).



**Abb. 8** Übersichtsaufnahme subkonfluenter hMSC in Kultur, Phasenkontrastmikroskopie

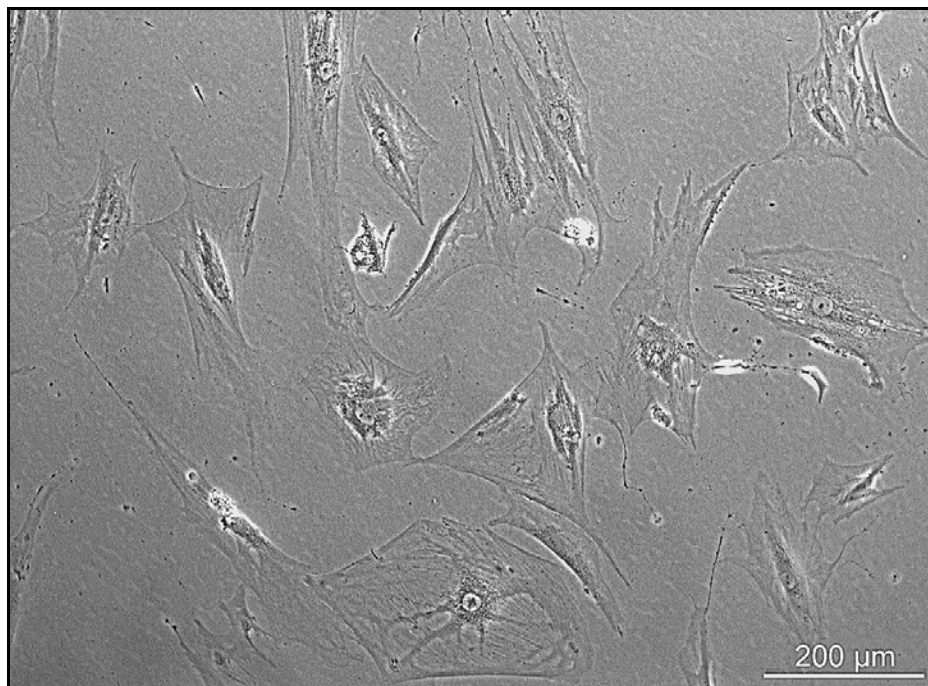




**Abb. 9** 3 unterschiedliche Morphologie von hMSC in Phasenkontrastmikroskopie: a) lange, spindel-förmige, bipolare Zellen, b) rundlich bis trianguläre Zellen mit phasenkontrast-dichten Membranabschnitten (Pfeile), c) große, flache Zellen mit mehreren weiten Zellausläufern (\*), d) alle drei Zelltypen nebeneinander in Kultur, alle Messbalken = 50µm

### 3.1.2. humane Osteoblasten

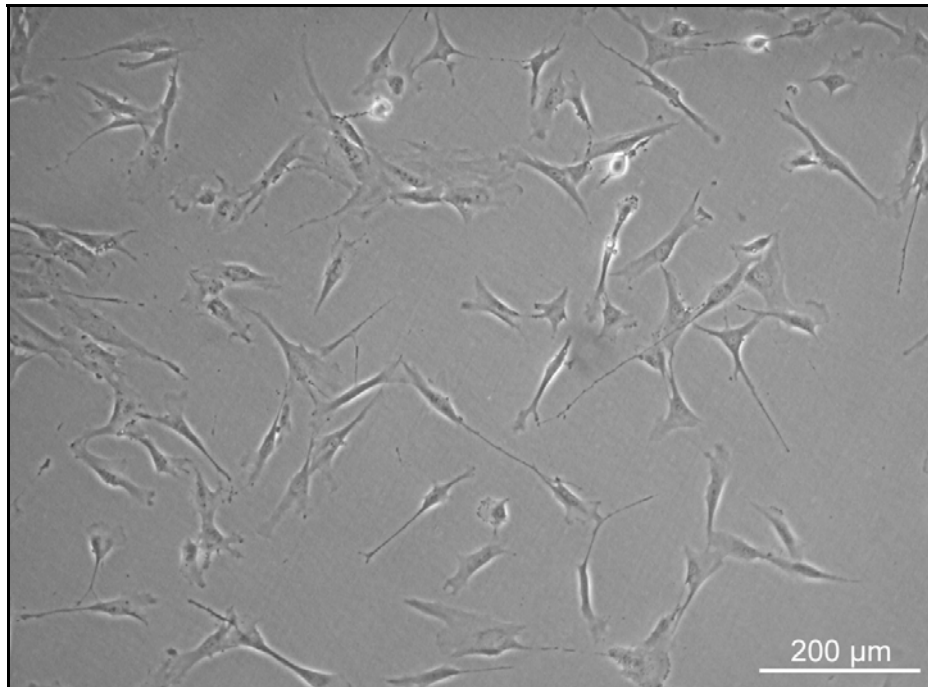
Humane Osteoblasten offenbarten eine typische polygonale Zellform mit ausgeprägten Zellfortsätzen. Die Zelldopplungsrate war deutlich geringer als bei den hMSC, was zu einer prolongierten Kulturdauer der hOB führte. Weiterführende Untersuchungen haben eine Populationsdopplungsrate von im Mittel 65 Stunden gezeigt (Dotcheva et al.). Eine Monolayerkultur von 50% wurde nie überschritten und die Zellen zeigten sich unter diesen Bedingungen als morphologisch relativ homogen. (s. Abb. 10)



**Abb. 10** Zellgruppierung subkonfluenten hOB in Kultur, Phasenkontrastmikroskopie

### 3.1.3. humane Fibroblasten

Die HS-27 Zellen zeigten die typische spindelförmige, mit Zellausläufern versehene Morphologie von in Kultur befindlichen Fibroblasten (s. Abb. 11). Die Population zeigte neben einer hohen Wachstumsrate auch eine ausgeprägte Homogenität. Subkonfluenz wurde schneller erreicht als bei den anderen Zelllinien. Bei höheren Konfluenzen wich die Monolayerkultur einer Überlagerung zu Multilayern.



**Abb. 11** Ausschnitt subkonfluenter HS 27 in Kultur, Phasenkontrastmikroskopie

## 3.2. Einfachfärbungen

Die immunzytochemischen Färbungen gegen die Oberflächenproteine und vermeintlichen Stammzellmarker CD 105/Endoglin, CD106/VCAM-1, CD44, die Strukturproteine Kollagen-IV, F-Actin und das extrazelluläre Matrixprotein Fibronectin wurden besonders hinsichtlich ihrer Lokalisation, Verteilung sowie ihrer Homogenität innerhalb der untersuchten Zellpopulation beurteilt. Die Präsentation der immunzytochemischen Ergebnisse für die Einfachfärbungen ist im folgenden Teil nach Zelllinien gegliedert.

### 3.2.1. humane mesenchymale Stammzellen

HMSC stellten sich nicht nur morphologisch, sondern auch immunzytochemisch als heterogen heraus. Besonders die Oberflächenproteine zeigten eine Akzentuierung in den Membranabschnitten, die auch unter Phasenkontrastmikroskopie prominent erschienen. Auch das Strukturprotein F-Actin zeigte in den kleineren hMSC eine abweichende Anordnung. Die stärkste Heterogenität erwies Kollegen IV innerhalb der hMSC Population. Hier fanden sich die größten Schwankungen hinsichtlich positiver und negativer Färbegergebnisse. Die übrigen untersuchten Markern waren hingegen in nahezu jeder untersuchten Zelle als positiv zu werten.

#### CD 44 (s. Abb. 12, Ausschnitt a):

Der Oberflächenmarker CD 44 zeigte sich in nahezu allen Zellen positiv. Die Zellen färbten sich über den gesamten Zelleib homogen an. Leichte punktförmige Akzentuierungen fanden sich in einigen Abschnitten der Zellmembran. Die ebenfalls blaue DAPI Kernfärbung konnte nicht eindeutig mit dem menschlichen Auge gegen die eigentliche Färbung mit AMCA abgegrenzt werden. Extrazellulär konnte kein Protein nachgewiesen werden. CD 44 zeigte sich in der Färbung mit hMSC als stabiler, zuverlässiger Marker, der über die markierte Gesamtpopulation hin gesehen fast ausschließlich positiv gefärbte Zellen erkennen ließ.

#### CD 105/Endoglin (s. Abb. 12, Ausschnitt b):

Die Färbungen gegen CD105 wiesen eine besondere Betonung der Membranabschnitte auf, insbesondere der endständigen Membranverdickungen. Ein zusätzlicher Nachweis konnte ebenfalls im Bereich des endoplasmatischen Reticulum erzielt werden, was sich in Form eines paranukleären, retikulären Färbemuster zeigte. Auch feine Membranausläufer der Zellen wurden durch die Färbung sichtbar, die sich in Phasenkontrastmikroskopie verborgen. Das Protein konnte konstant in nahezu jeder Zelle nachgewiesen werden, nie jedoch im Extrazellularraum.

#### CD 106/VCAM-1 (s. Abb. 12, Ausschnitt c):

CD106 offenbarte ein fein-granuläres Färbemuster, wobei die Granula relativ homogen im Zytoplasma verteilt zu finden waren. Zu den Zellausläufern hin nahm die Dichte der Granula leicht ab, um dann wieder deutlicher in der Membran zu erscheinen. Der Nachweis außerhalb der Zellen war negativ. In einigen Zellen fehlten die

Membranbetonungen, so dass sich nur eine granuläre, eher zytoplasmatische Zeichnung zeigte. In dem korrespondierenden Ausschnitt fehlt die Membranbetonung der Färbung in der unteren der beiden sichtbaren Zellen.

Kollagen-IV (s. Abb. 12, Ausschnitt d):

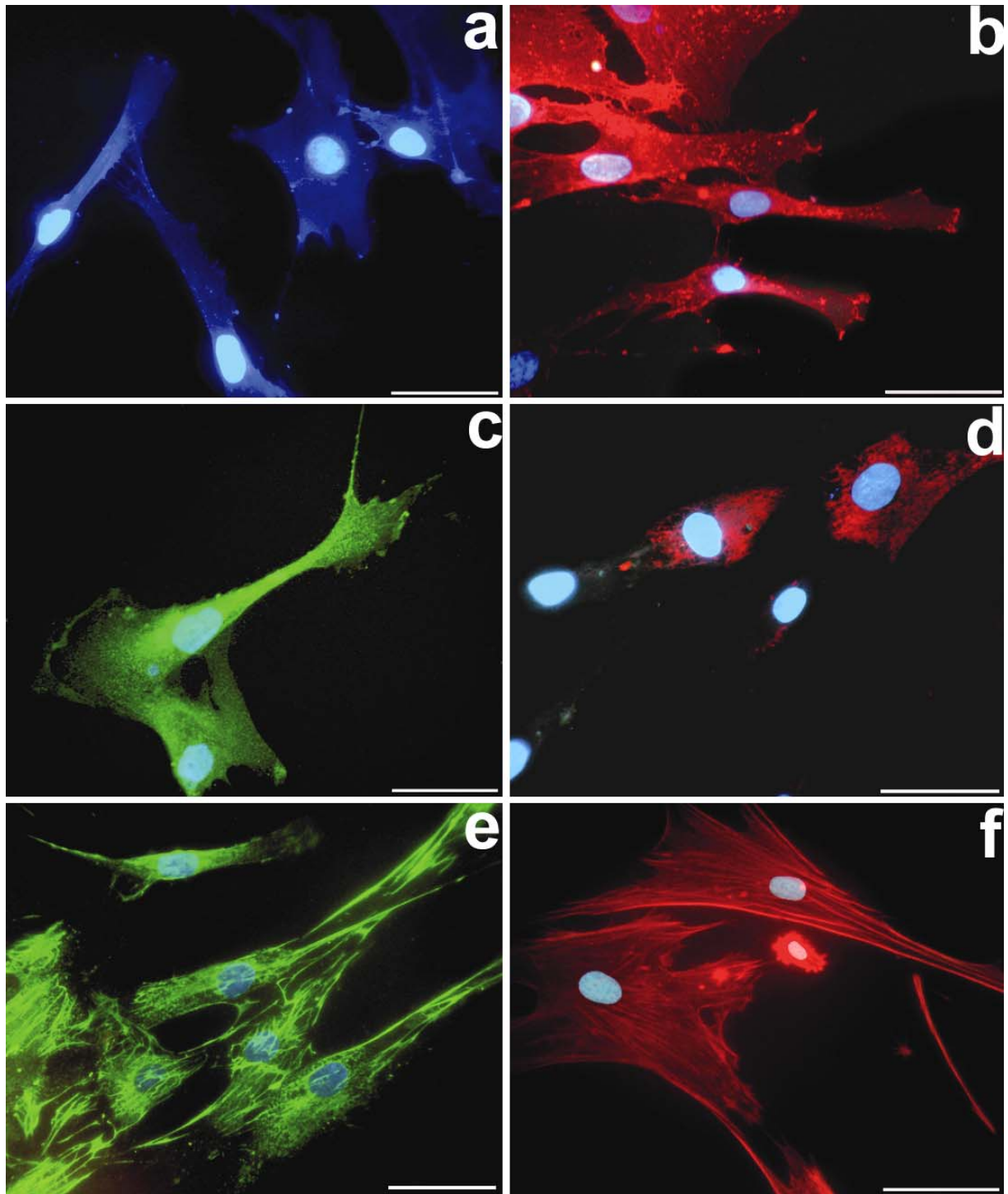
Das Strukturprotein Kollagen Typ IV imponierte in einem paranukleärem, granulärem Färbemuster. Der dargestellte Ausschnitt ist so gewählt, dass man die leichte Heterogenität in der Anfärbbarkeit innerhalb der hMSC erkennen kann. Bei positivem Zellenachweis durch die DAPI Kernfärbung fehlte bei einem Teil der Zellen ein spezifischer Nachweis paranukleär. Der überwiegende Teil der Zellen war jedoch positiv angefärbt. Eine farbliche Abgrenzung von Alexa Fluor546 gegenüber dem mit Texas Red markiertem CD105 war nicht möglich (Vgl. Ausschnitt b).

Fibronectin (s. Abb. 12, Ausschnitt e):

Das Färbemuster des Adhäsionsprotein Fibronectin ergab zum einen eine intrazelluläre, paranukleäre, retikuläre Verteilung, zum anderen zeigte sich eine deutliche extrazelluläre Matrixkomponente. Über das faserige extrazelluläre System scheinen die Zellen miteinander verbunden. Ein Unterschied zur CD106 Färbung mit FITC im Farbspektrum des emittierten Lichts ist nicht möglich (Vgl. Ausschnitt c).

F-Actin (s. Abb. 12, Ausschnitt f):

Das Alexa Fluor633 markierte Actinzytoskelett ist eindeutig mit mehr oder weniger parallelen, entlang dem Zellverlauf ausgerichteten Filamentsystem zu erkennen. Die Verteilung des Färbemusters war allerdings abhängig von der Zellmorphologie. Bei den kleinen, rundlicheren Zelltypen ist das Actinskelett nicht als gerichtet auszumachen, das Signal ist hier am stärksten in der Zellmembran. Das F-Actin markierende Alexa Fluor633 war gegenüber den Farbstoffen Texas Red und Alexa Fluor546 nicht abgrenzbar (Vgl. Ausschnitt b und d). Im Vergleich zu den anderen Fluorochromen war die F-Actin Färbung nur 4-7 Tage nachweisbar.



**Abb. 12** Einfachfärbungen mit DAPI Kernfärbung von humanen mesenchymalen Stammzellen, a) CD44/AMCA, b) CD105/Texas Red, c) CD 106/FITC, d) Col-4/Alexa Fluor546, e) Fibronectin/Cy2, f) Phalloidin/Alexa Fluor633, Aufnahmen mit Filterset F 61002 (AHF), alle Messbalken = 50  $\mu$ m

### 3.2.2. humane Osteoblasten

#### CD 44 (s. Abb. 13, Ausschnitt a):

Das Färbemuster des Oberflächenmarkers CD 44 entspricht dem der hMSC Färbungen und ist ebenfalls als spezifisch zu werten. In nahezu allen Zellen ließ sich ein positiver Nachweis erzielen.

#### CD 105/Endoglin (s. Abb. 13, Ausschnitt b):

Endoglin konnte immunzytochemisch nicht in den untersuchten hOB Kulturen nachgewiesen werden. Vereinzelt zeigten sich kleinste Signale perinukleär, die aber nicht als spezifisches Färbemuster werten waren. Die DAPI Färbungen ermöglichte die Lokalisation der Zellen.

#### CD 106/VCAM-1 (s. Abb. 13, Ausschnitt c):

Es konnte kein spezifischer Nachweis gegen CD106 erbracht werden. Bei positiver Kernfärbung zeigten sich nur annäherungsweise Signale ohne Zusammenhang mit charakteristischen Färbemustern.

#### Kollagen-IV (s. Abb. 13, Ausschnitt d):

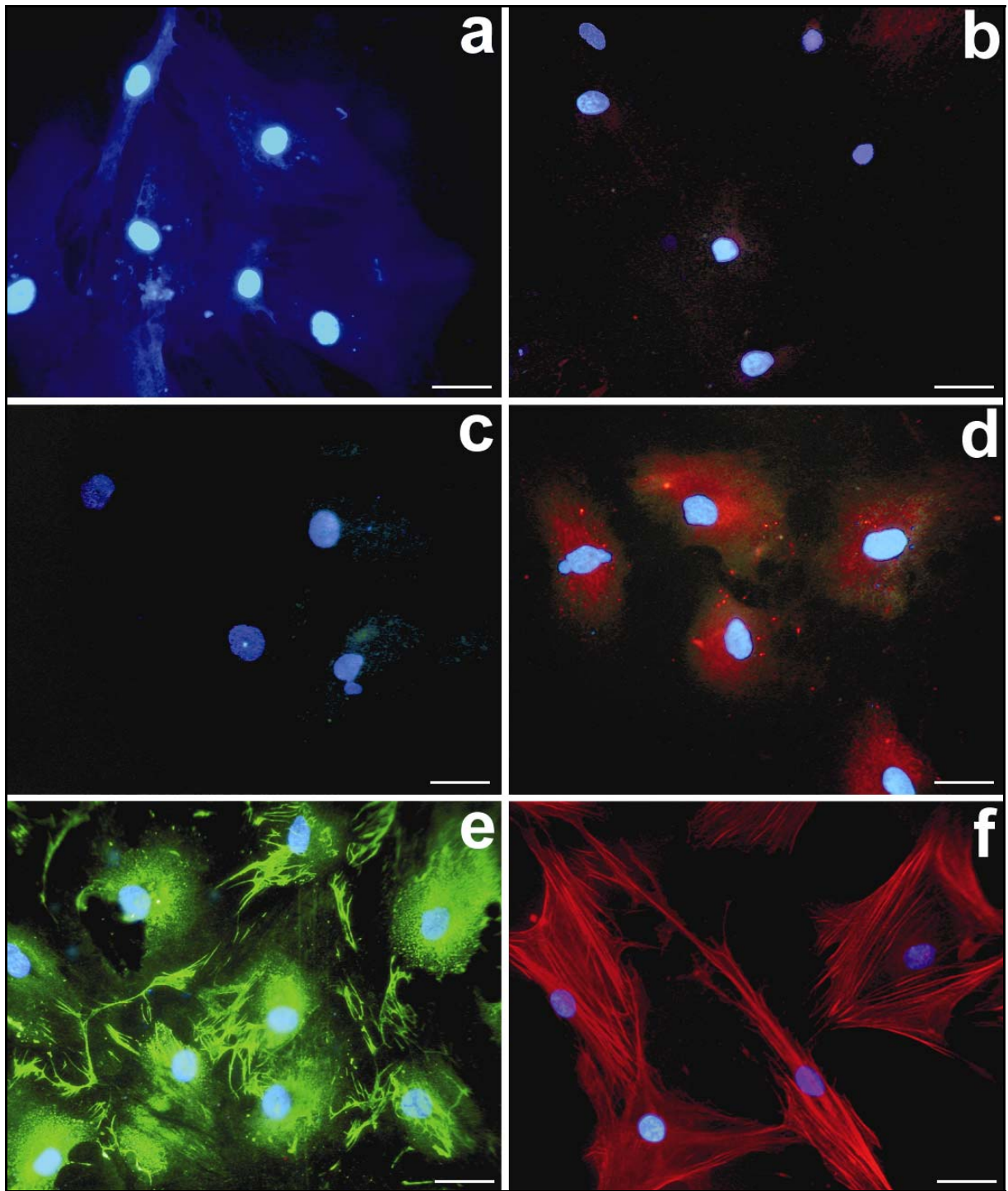
Es konnte ein spezifischer Nachweis gegen Kollagen Typ IV geführt werden. Das Färbemuster entsprach dem der hMSC Ergebnisse. Auch bei den hOB zeigte sich jedoch die größte Heterogenität unter allen untersuchten Markern. Überwiegend waren die Zellen als positiv gefärbt zu werten und nur vereinzelt fanden sich negative Zellen.

#### Fibronectin (s. Abb. 7, Ausschnitt e):

Die Färbungen gegen Fibronectin zeugten ein eindeutig positives Ergebnis. Die faserige Extrazellulärmatrix war noch ausgeprägter als bei den hMSC. Auch hier zeigten sich dabei deutliche retikuläre Strukturen um den Zellkern gelegen.

#### F-Actin (s. Abb. 7, Ausschnitt f):

Das Actinzytoskelett ist spezifisch durch die Färbung markiert. Besonders bei den morphologisch polygonal konfigurierten Zellen lässt sich die Aufspannung und Abstützung des Zelleibs gut nachvollziehen.



**Abb. 13** Einfachfärbungen mit DAPI Kernfärbung von humanen Osteoblasten, a) CD44/AMCA, b) CD105/Texas Red, c) CD 106/FITC, d) Col-4/Alexa Fluor546, e) Fibronectin/Cy2, f) Phalloidin/Alexa Fluor633, Aufnahmen mit Filterset F 61002 (AHF), alle Messbalken = 50  $\mu$ m



### 3.2.3. HS 27

#### CD 44 (s. Abb. 14, Ausschnitt a):

Bei deutlicher Kernfärbung findet sich kein Nachweis einer Anfärbung der Membranabschnitte oder der typischen homogenen Verteilung über dem Zelleib.

#### CD 105/Endoglin (s. Abb. 14, Ausschnitt b):

CD 105 konnte nicht nachgewiesen werden. In sehr vereinzelt Zellen zeigten sich Spuren einer diffusen, unspezifischen Anfärbung.

#### CD 106/VCAM-1 (s. Abb. 14, Ausschnitt c):

Auch VCAM-1 offenbarte ein negatives Färbeergebnis in humanen Fibroblasten. In einer Minderheit der Population imponierten perinukleär geringe granuläre Strukturen. Das typische Expressionsmuster des Proteins war aber nicht nachweisbar.

#### Kollagen-IV (s. Abb. 14, Ausschnitt d):

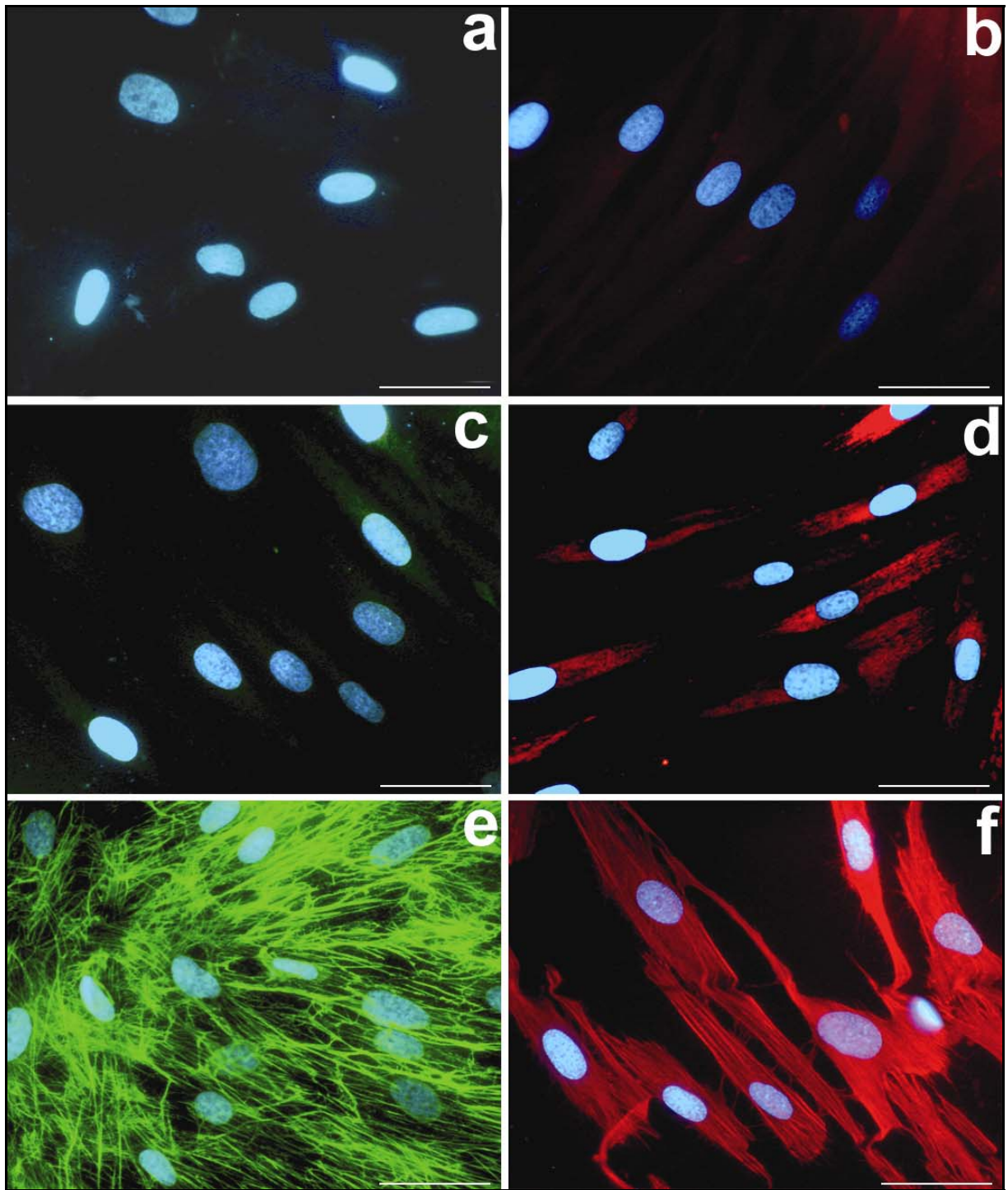
Es zeigte sich ein spezifisches Färbemuster, identisch dem der anderen Zelllinien. Auch die HS27 wiesen Heterogenität in den Kollagen-IV Färbungen auf.

#### Fibronectin (s. Abb. 14, Ausschnitt e):

Die Fibroblasten bildeten ein ausgeprägtes extrazelluläres Fasersystem aus. Die extrazelluläre Matrixkomponente war in der Fibroblastenkultur am imposantesten. Die retikuläre Verteilung um den Zellkern lässt sich nur vereinzelt unter den starken Signalen erahnen.

#### F-Actin (s. Abb. 14, Ausschnitt f):

Die Actinfasern färbten sich eindeutig positiv an und zeigten einen nahezu parallelen Verlauf entlang der spindelförmigen Zellausdehnung entsprechend der fischzugartigen Zellanordnung.

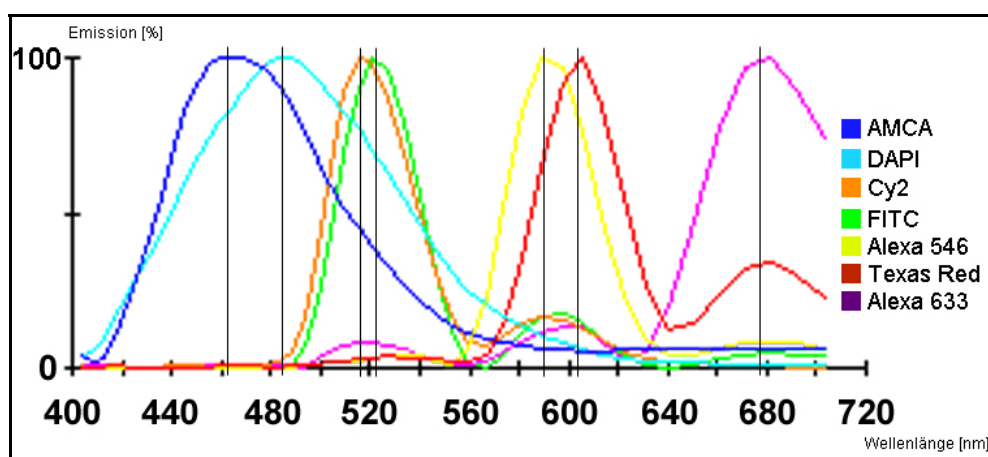


**Abb. 14** Einfachfärbungen mit DAPI Kernfärbung von humanen Fibroblasten, a) CD44/AMCA, b) CD105/Texas Red, c) CD 106/FITC, d) Col-4/Alexa Fluor546, e) Fibronectin/Cy2, f) Phalloidin/Alexa Fluor633, Aufnahmen mit Filterset F 61002 (AHF), alle Messbalken = 50  $\mu$ m

### 3.3. Mehrfachfärbungen

Für die Auftrennung der Mehrfachfärbung in ihre einzelnen Spectra waren zwei Aufnahmen mit unterschiedlichen Filtersets nötig; für das blaue Spectrum das Filterset 01 und für das grüne, rote und infrarote der Triple-band Filtersatz SKY. Die Spectra der verwendeten Fluorochrome DAPI, AMCA, FITC, Cy2, Alexa Fluor546, Texas Red und Alexa Fluor633 konnten eindeutig durch die spectrale Aufnahme mit dem Interferometer und anschließendes linear unmixing von einander abgegrenzt werden. Eine genaue Messung der Emissionspeaks der einzelnen Farbstoffe ließ sich allerdings mit der Herstellersoftware SpectraView nicht durchführen. Es verbleibt lediglich die Möglichkeit, zur Annäherung der maximalen Emission eine Senkrechte zur x-Achse durch den Scheitelpunkt der jeweiligen Graphen (s. Abb. 15) zu legen.

Dabei konnten die Emissionen der Fluorochrome Cy2, FITC und Texas Red mit Abweichungen im Bereich von 10nm innerhalb der vom Hersteller angegebenen Bereiche detektiert werden. Für die Farbstoffe AMCA, DAPI, Alexa Fluor 546 und 633 zeigte sich eine Verlagerung in größere Wellenlängenbereiche, so dass u.a. die Spectra von Alexa Fluor 546 und Texas Red näher aneinander lagen als von den Herstellern angegeben (s. Tab. 3). Die Fluorochrome AMCA DAPI und Alexa Fluor 546 zeigten ihren Emissions-Peak jeweils im Bereich von 20nm über dem vom Hersteller angegebenen Emissionsbereich, während Alexa Fluor 633 um 30nm in höhere Wellenlängenbereiche abwich.



**Abb. 15** In der Spectralanalyse gemessene Emissionen der Fluorochrome beim linear unmixing (Vgl. mit Herstellerangaben (Abb. 5)), Aufnahme AMCA und DAPI mit Filterset 01 (Zeiss), restlichen Fluorochrome mit Filterset F 61002 (AHF).

Ausgabe durch Spectra View 1.6, die Senkrechten zur X-Achse durch den Scheitelpunkt der Graphen wurden nachträglich eingefügt und zeigen die maximale Emission der einzelnen Fluorochrome.

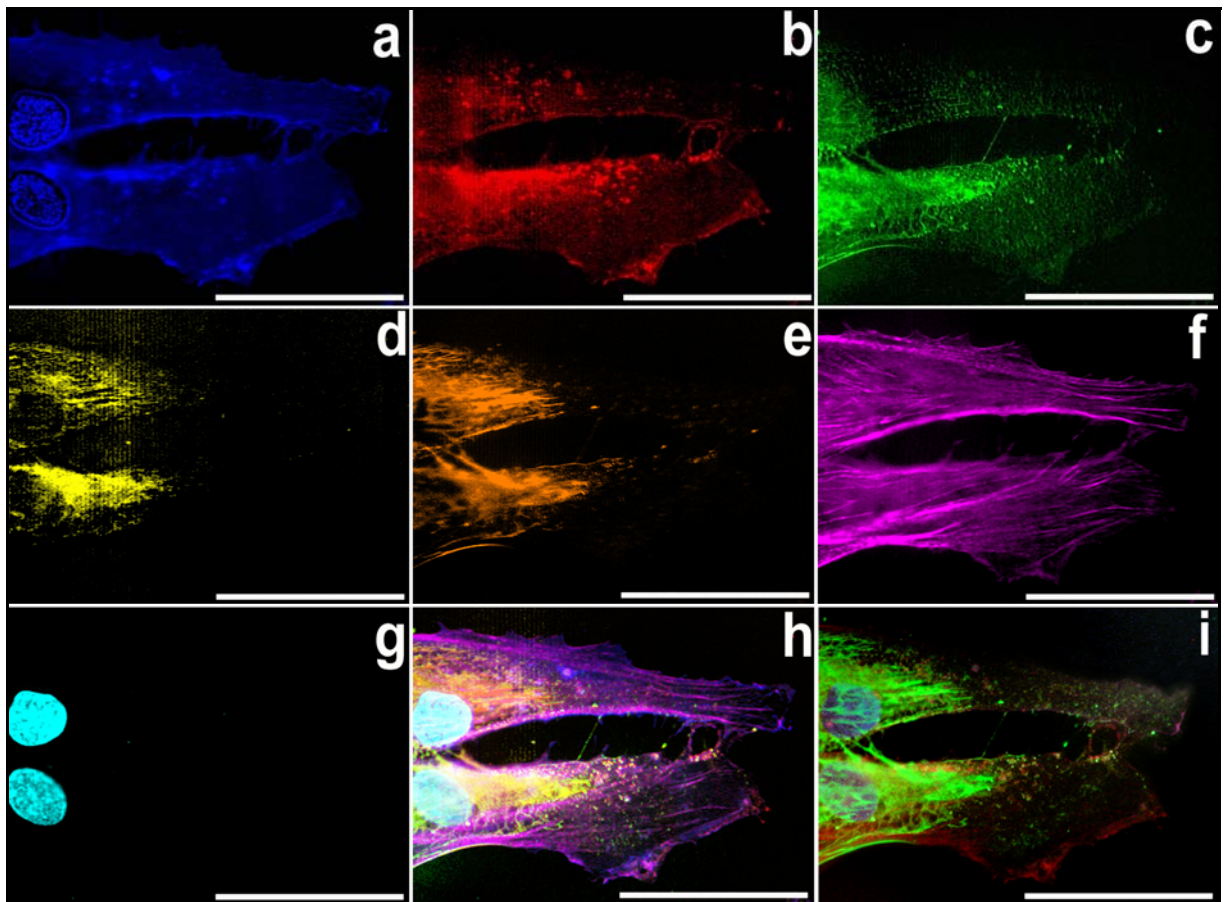
Im folgenden Teil werden die Ergebnisse der spectralen Auftrennung der simultanen Mehrfachfärbungen nach Zelllinien geordnet dargestellt. Dabei wird im besonderen der Vergleich des Färbemusters mit den Einfachfärbungen berücksichtigt. Die Anordnung der aufgetrennten Fluorochrome in den folgenden Bildtafeln (Abb. 16-18) ist zur besseren Übersicht aneinander angelehnt.

### 3.3.1. hMSC

Eine Auftrennung der in der 6fach Fluoreszenz verwendeten Fluorochrome war optisch mit einem Triple-band Filter nicht mehr möglich (s. Abb. 16-18, Ausschnitt i). Eine simultane Beurteilbarkeit aller untersuchten Marker war mit dem menschlichen Auge nicht mehr zu leisten.

Durch die spectrale Bildanalyse und die Zuweisung von Falschfarben für die jeweiligen Fluorochrome wurden die Bilder a-g der Abb. 16-18 erzeugt. Das Färbemuster zeigt sich spezifisch und identisch im Vergleich zu untersuchten Verteilungen der Einzelfärbungen (s. Abb. 13-15). Besonders in der Überlagerung der spectralen Dekompositionen in Ausschnitt h zeigte sich die bessere Darstellung der einzelnen Antigene und der höhere Informationsgehalt (vgl. Ausschnitt i).

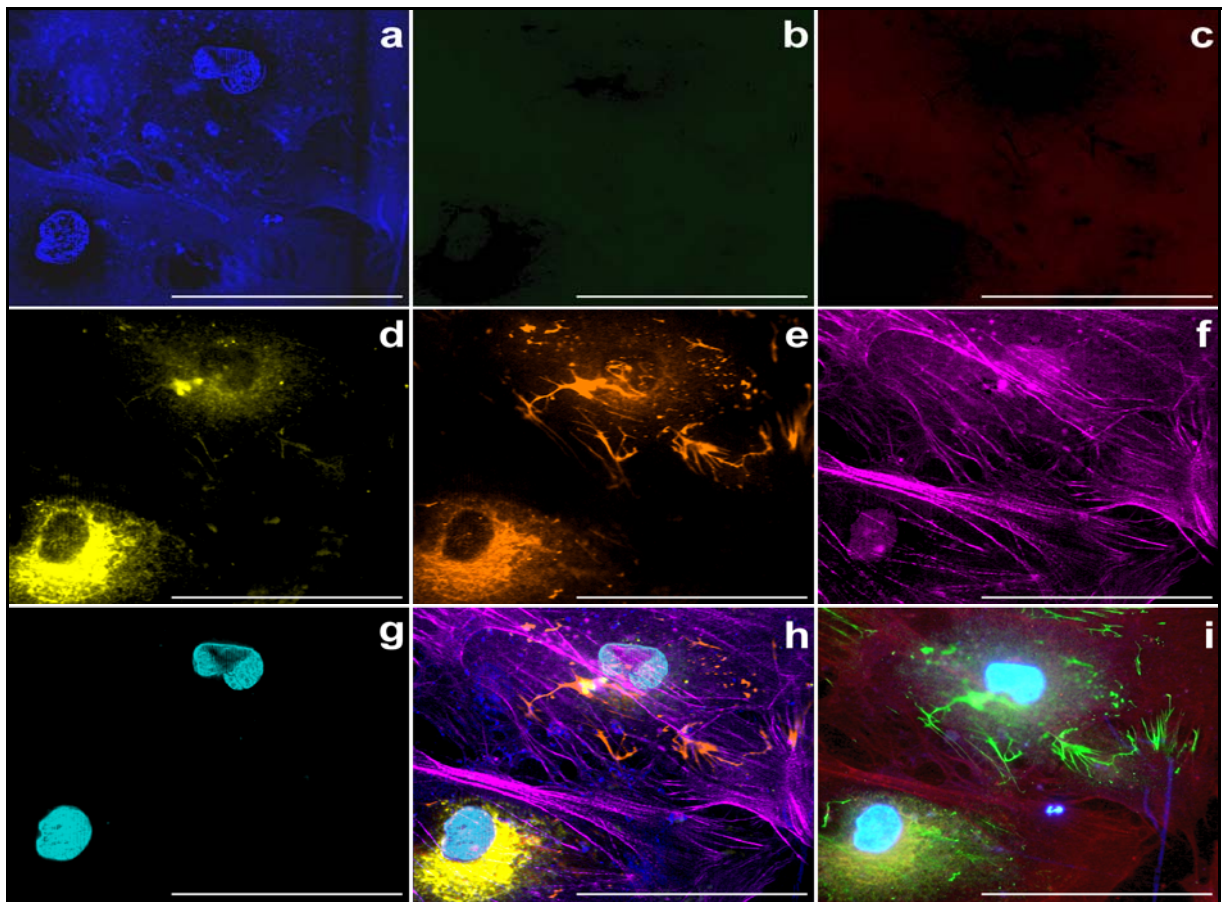
Auf einer Zelle ließen sich alle in den Einfachfärbungen untersuchten Antigene simultan nachweisen. Der als Positivkontrolle dienende Vergleich der erzeugten Farbdekompositionen aus dem linear unmixing mit den korrespondierenden Einzelfärbungen zeigt ein übereinstimmendes, spezifisches Färbemuster. Folglich lassen sich in der Mehrfachfärbung unspezifische Bindungen der Markerproteine und Kreuzreaktionen zwischen den verschiedenen Antikörpern ausschließen.



**Abb. 16** Simultane 6-fach Immunfluoreszenz mit DAPI Kernfärbung auf zwei humanen mesenchymalen Stammzellen, a-g) spectrale Dekompositionen/linear unmixing mittels spectraler Bildanalyse, a) CD44/AMCA, b) CD105/Texas Red, c) CD 106/FITC, d) Col-4/Alexa Fluor546, e) Fibronectin/Cy2, f) Phalloidin/Alexa Fluor633, g) DAPI, h) überlagerte spectrale Aufnahmen, i) digitale Aufnahme mit AHF Filter, alle Messbalken = 50 $\mu$ m

### 3.3.2. humane Osteoblasten

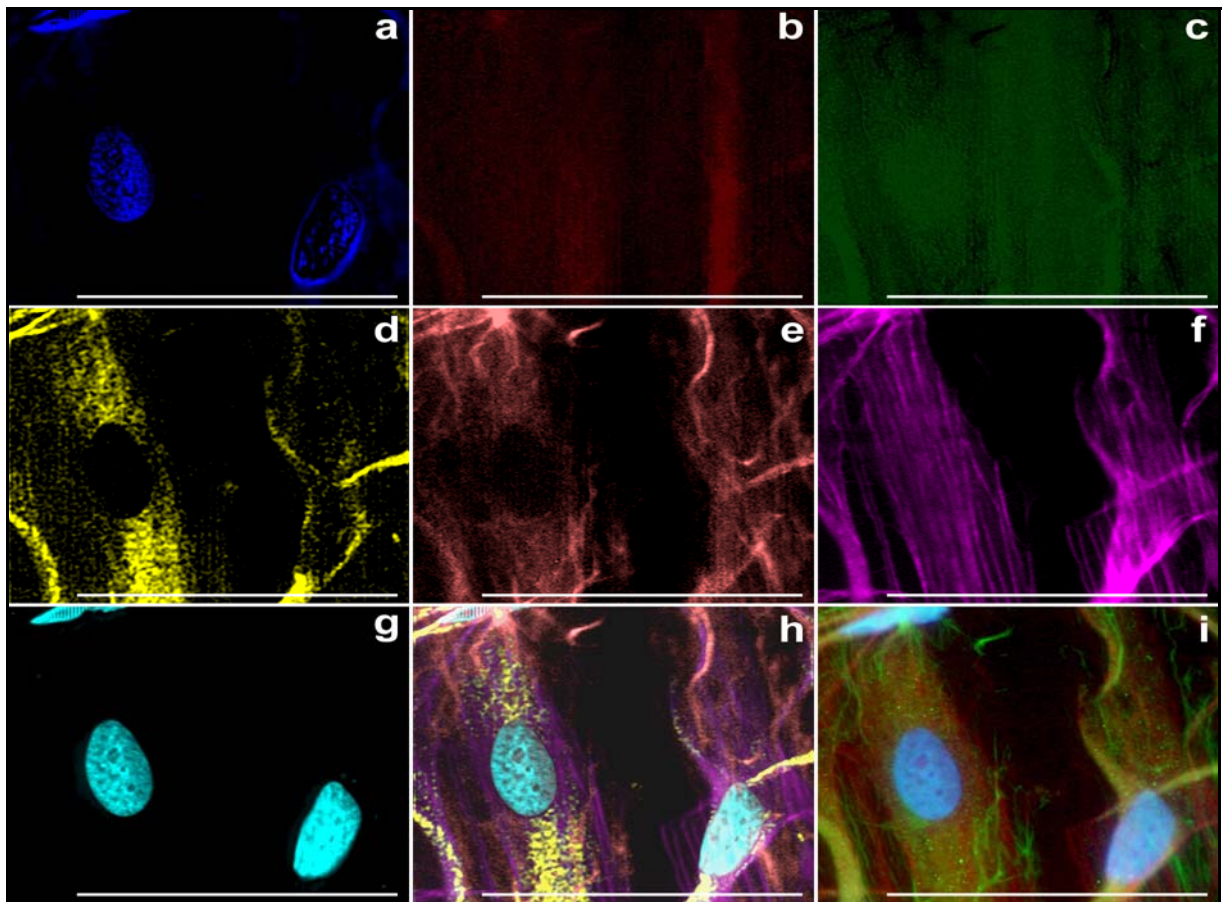
Auch die Dekomposition der einzelnen Farbstoffe in der simultanen Mehrfachfärbung der hOB liefert identische Färbemuster im Vergleich zu den jeweils korrespondierenden Einzelfärbungen. Auch die Analyse der Färbungen für CD105 und CD106 durch Detektionsversuch mit dem Interferometer ergibt kein Signal. In der Darstellung der Überlagerung aller Aufnahmen des SpectralCubes in Abbildung h) zeigt sich zum Vergleich mit der Mehrfachfärbung der hMSC ein geringerer Mehrwert an Information gegenüber der Aufnahme mit der Digitalkamera in Abbildung i).



**Abb. 17** Simultane 6-fach Immunfluoreszenz mit DAPI Kernfärbung von zwei hOB, a-g) spectrale Dekompositionen/linear unmixing mittels spektraler Bildanalyse, a) CD44/AMCA, b) CD105/Texas Red, c) CD 106/FITC, d) Col-4/Alexa Fluor546, e) Fibronectin/Cy2, f) Phalloidin/Alexa Fluor633, g) DAPI, h) überlagerte spektrale Aufnahmen, i) digitale Aufnahme mit AHF Filter, alle Messbalken = 50µm

### 3.3.3. Humane Fibroblasten

Auch die Spectralanalyse der Mehrfachfärbung auf HS 27 erbrachte Ergebnisse, die den Einzelfärbungen auf dieser Zelllinie entsprachen. Die Marker CD 44, CD105 und CD 106 konnten nicht nachgewiesen werden.



**Abb. 18** *Simultane 6-fach Immunfluoreszenz mit DAPI Kernfärbung von zwei HS27, a-g) spectrale Dekompositionen/linear unmixing mittels spectraler Bildanalyse, a) CD44/AMCA, b) CD105/Texas Red, c) CD 106/FITC, d) Col-4/Alexa Fluor546, e) Fibronectin/Cy2, f) Phalloidin/Alexa Fluor633, g) DAPI, h) überlagerte spectrale Aufnahmen, i) digitale Aufnahme mit AHF Filter, alle Messbalken = 50µm*

### 3.3.4. Übersicht

Die Tabelle stellt die Ergebnisse der immunzytochemischen Färbungen von hMSC, hOB und Fibroblasten im Überblick zusammen. Da es zwischen Einzel- und Mehrfachfärbungen keine Unterschiede gab ist die Übersicht für beide Färbemethoden gültig. Die Ergebnisse der Marker die einen Unterschied zwischen den drei Zelllinien ermöglichen sind rot dargestellt.

Marker	hMSC	Osteoblasten	Fibroblasten
CD44	+	+	-
CD105	+	-	-
CD106	+	-	-
Col IV	+/-	+/-	+
Fibronectin	+	+	+
F-Actin	+	+	+

**Tab. 6** Tabellarische Übersicht der Färbeergebnisse aller drei Zelllinien



## 4. Diskussion

### 4.1. Methodik

Ziel dieser Studie war es, hMSC auf Einzelzellniveau zu charakterisieren und gegenüber reifen Phänotypen anderer Zellarten abzugrenzen. Als Untersuchungsmethode wurde die simultane Immunfluoreszenzmarkierung mit 6 Farben gewählt.

Die Immunfluoreszenz stellt durch die hohe Bindungsaffinität und natürliche Spezifität von Antikörpern gegenüber ihren Bindungspartnern eine hoch sensitive und spezifische Untersuchung zellulärer Antigene dar. Die indirekte Methode der Immunfluoreszenz leistet zusätzlich einen Augmentationseffekt des Fluoreszenzsignals in Bezug auf die vorhandenen Antigenmenge, da mehrere Fluorochrom beladene Sekundärantikörper an einen, das Antigen markierenden, Primärantikörper binden können (Lamvik et al. 2001). Im Gegensatz zur direkten Nachweismethode, die ein erheblich schwächeres Fluoreszenzsignal produziert, lassen sich durch den Einsatz von Sekundärantikörpern folglich auch Proteine, für die eine geringe Expressionsrate auf der zu untersuchenden Zelle bekannt oder anzunehmen ist, wie z.B. für CD106, eindeutig darstellen (Schieker et al. 2004). Daher ist für die vorliegende Untersuchung und im Besonderen auch für die Analyse von exquisten Markern, die nur spärlich exprimiert werden oder in geringer Menge auf der Zelloberfläche vorkommen, die direkte Immunfluoreszenz ungeeignet. In anderen Studien gelang es zwar, in Gewebemehrfachfärbungen durch direkte Färbung fünf von sieben Antigenen nachzuweisen, hierbei handelte es sich jedoch stets um Proteine, die von den jeweiligen Zellen in großen Mengen produziert werden (Tsurui et al. 2000).

Verglichen mit anderen biochemischen Analyseformen wurde mit der immunzytochemischen Mehrfachfärbung eine Methode zur Charakterisierung von humanen mesenchymalen Stammzellen gewählt, die mehrere Vorteile bietet. Besonders für die Identifizierung von einer bestimmten Zelllinie, bzw. einer einzelnen Zelle in einem heterogenen Zellgemisch, wie es die mit üblichen Methoden gewonnene Stammzellpopulation aus dem Knochenmark darstellt, kommt der Untersuchung auf Einzelzellniveau hierbei größte Bedeutung zu (Vogel et al. 2003, Minguell et al. 2001, Conget et al. 1999, Pittenger et al. 1999).

Dieses ist nicht möglich mit Untersuchungsverfahren, die mit großen Zellzahlen arbeiten und somit die Zellpopulation als Ganzes betrachten, wie z.B. die FACS-

Analyse. Hierbei werden Zellzahlen von mehreren tausenden benötigt. Auch die Möglichkeit der Beurteilung des charakteristischen Verteilungsmuster eines Proteins in der einzelnen Zelle ist von großem Interesse, da somit zusätzlich die Spezifität der Antikörpermarkierung verifiziert wird (Pautke et al. 2004). Unspezifische Färbung und somit falsch positive können aussortiert und aus der Bewertung ausgeschlossen werden. Ferner können durch die Unterschiede im Verteilungsmuster unter Umständen Rückschlüsse über den Differenzierungsgrad der Zelle gezogen werden. Es stellt z.B. einen Unterschied dar, ob ein Protein lediglich auf der Zelloberfläche vorhanden ist oder zusätzlich noch aktiv im Zellinneren produziert wird. Am Beispiel des CD105 kann man deutlich neben der starken Anreicherung in der Zellmembran eine retikuläre Anfärbung erkennen, die weitestgehend dem endoplasmatischen Retikulum entspricht. Folglich kann man ableiten, dass CD105 in diesem Stadium der Zellreife reichlich aktiv produziert wird.

An diesem Beispiel lässt sich außerdem der Vorteil der Untersuchung auf Proteinebene erkennen. Verfahren wie die PCR; qRT-PCR oder Northern-Blot, die auf RNA-Ebene arbeiten, können nur indirekt Aufschluss über die tatsächliche Proteinexpression leisten, da zum einen immer nur ein Teil des Transkripts auch als Protein exprimiert wird (Bilbe et al. 1996) und zum anderen eine direkte Mengenkorelation von RNA zum Protein nicht möglich ist. So liefert die qRT-PCR zwar quantifizierbare Daten, die aber nicht gleichzusetzen sind mit der Menge an sezerniertem Protein. An den o.g. Beispielen für verschiedene Verfahren der Charakterisierung von Zellen wird wiederum die Problematik der Vergleichbarkeit unterschiedlicher Studien mit verschiedenen Methoden deutlich, sicherlich ein Hauptproblem in der langjährigen Fragestellung der Charakterisierung von hMSC (Dominici et al. 2001).

Im Vergleich mit anderen Methoden der Proteinanalyse ist es bei der Immunfluoreszenz möglich, die Zelle im vitalen Zustand zu fixieren und somit zu einem bestimmten Zeitpunkt in ihrem Zellzyklus zu untersuchen ohne vorher eine Homogenisierung oder Lysierung der Zellen vorzunehmen, wie es für den Western Blot oder für die Immunpräzipitation nötig ist. Folglich wird eine Momentaufnahme der Zelle in ihrem natürlichen Verhalten und mit ihrem tatsächlichen Proteinstoffwechsel *in vitro* generiert. Somit können über Analysen des Verteilungsmusters eines Proteins innerhalb der Zelle z.B. auch Hypothesen über dessen Bedeutung aufgestellt werden. Eine Proteinhäufung in den Filopodien (Ausstülpungen in der Zellmembran) einer Zelle könnte zum Beispiel auf eine Rolle innerhalb der Migration von Zellen oder ihrer Ad-

hässon auf dem Untergrund hindeuten. Auch die Koloalisation mit anderen Markern lässt Hinweise auf eine mögliche Interaktion von verschiedenen Proteinen zu.

Am häufigsten wird die Methode der Immunfluoreszenz wohl der FACS Analyse vergleichend gegenübergestellt, die den großen Vorteil der Quantifizierung bietet. Es können also Aussagen getroffen werden, wie hoch der Anteil an Zellen innerhalb einer Population ist, die ein bestimmtes Protein exprimieren. Es wurden für diese Analysetechnik auch bereits Mehrfachfärbungen mit zehn und mehr Antigenen simultan durchgeführt (De Rosa et al. 2003). Für die Fragestellung der vorliegenden Untersuchung ist jedoch eine Technik die in Suspension arbeitet und eine Gesamtpopulation untersucht weniger geeignet, da immer die Gefahr besteht, keine Stammzellreinkultur zu untersuchen. In einer Studie der Arbeitsgruppe um Lodie wurde z.B. mittels Durchflußzytometrie die Expression von CD105 auf durch unterschiedliche Verfahren isolierten hMSC untersucht (Lodie et al. 2002). hMSC wurden gewonnen durch Auftrennung durch Zentrifugationsgradienten, bloße Adhärenz auf Plastikoberflächen und Selektionierung nur der CD105 positiven Zellen durch magnetic beads. Eine FACS Analyse nach Kultur der drei gewonnenen Populationen zeigte nahezu identische Ergebnisse in der prozentualen CD105 Expression. An dieser Studie wird also die begrenzte Möglichkeit der FACS Analyse in der Fragestellung nach Unterscheidungen der heterogenen hMSC Population deutlich.

Eine Mehrfach-Fluoreszenzmarkierung auf Stammzellen wurde in unserer Arbeitsgruppe zur Charakterisierung bereits angewandt, allerdings sind bisher maximal vier simultan untersuchte Antigene beschrieben (Schieker et al. 2004). Bis zu sieben verschiedene Farbstoffe wurden mit Spectralanalyse von Knochenpräparaten simultan analysiert und aufgetrennt (Pautke et al. 2005). Eine weitere Methode, ähnlich der simultanen Mehrfachfluoreszenz, stellt die schrittweise ablaufende Antikörpermarkierung mit anschließender Elution der gebundenen Immunglobuline dar (Wahlby et al. 2002). Dabei wird die Färbung nach jedem Einzelschritt dokumentiert und abschließend verglichen oder überlagert, es entsteht eine Art Mehrfachfärbung. Durch die verschiedenen Elutionsschritte ist eine Denaturierung der Zellproteine allerdings nicht auszuschließen, so dass unspezifische Färbungen auftreten können.

Kritisch betrachtet birgt die simultane indirekte Immunfluoreszenz allerdings auch einige Gefahren und Nachteile. Durch die Verwendung eines Sekundärantikörpers wird die Färbung zwar verstärkt, eine Gegenüberstellung von Färbeintensität zu vorhandener Proteinmenge ist jedoch nicht zulässig, da eine unbekannte und inkonstante

Anzahl von Fluorochrom markierten Sekundärantikörpern jeweils einen Primärantikörper binden (Lamvik et al. 2001). Auch die Gefahr der Kreuzreaktion unter den verwendeten Antikörpern steigt mit zunehmender Anzahl. In dieser Arbeit wurde die Möglichkeit der Kreuzreaktion allerdings durch Auswahl einer gemeinsamen Spezies (donkey) zur Produktion der Sekundärantikörper und die Absorption der Primärantikörper gegenüber allen anderen verwendeten Arten minimiert.

Eine Limitation in der Anzahl der nachzuweisenden Antigene erfährt die simultane Mehrfachfluoreszenz neben den bereits beschriebenen technischen bzw. physikalischen Problemen in der Darstellbarkeit (s. auch Kap 4.1.1.) auch durch die Verfügbarkeit von Primärantikörpern, die jeweils verschiedenen Spezies entstammen, bzw. aus Hybridomzellen verschiedener Spezies gewonnen werden müssen. Diese Antikörper sollten zusätzlich auch noch gegen jeden speziesfremden verwendeten Antikörper absorbiert sein, um Kreuzreaktionen sicher auszuschließen. Mit steigender Anzahl zu untersuchender Antigene sinkt also die Wahrscheinlichkeit, die benötigten Antikörper als Standardantikörper käuflich erwerben zu können. Auch die Verfügbarkeit der Sekundärantikörper die jeweils aus der gleichen Spezies stammen sollten, um gleichzeitig aufgetragen werden zu können ist begrenzt.

In der Zusammenschau der gängigen Methoden zur Charakterisierung von hMSC in einer heterogenen Gesamtpopulation erscheint die Mehrfachimmunfluoreszenzfärbung als hoch geeignet. Besonders die Möglichkeit der Untersuchung von adhärennten Zellen macht diese Methode auch in der Materialforschung attraktiv. Hier bietet sie z.B. die Möglichkeit, die Proteinexpression von hMSC auf unterschiedlichen Trägermaterialien, Scaffolds, zu untersuchen und eine Veränderung des Expressionsprofils über einen definierten Zeitraum zu vergleichen. So wäre es denkbar auch Hinweise auf den Reifegrade der Stammzelle während eines bestimmten Untersuchungszeitpunkts auf dem Weg zu einer differenzierten Zelllinie zu erhalten. Ein schrittweiser Verlust typischer Stammzellmarker würde hierbei für eine fortschreitende Differenzierung sprechen. Im Bereich des Tissue Engineerings von Knochen ließe sich somit anstreben, Aussagen über die Eigenschaften von Leitschienen zu gewinnen. So könnte die Osteokonduktivität, die Fähigkeit, Knochengewebe einzuwachsen zu lassen und die Osteoinduktivität, die Fähigkeit, eingewachsene Zellen in Richtung der osteogenen Kaskade zu stimulieren, untersucht werden.

Auch die Anwendung im Gewebe bzw. in eingebetteten Gewebeschnitten erscheint die Mehrfachfärbung durch Immunfluoreszenzmarkierung als zweckmäßiges Werk-

zeug, Zellidentifizierungen zu gewährleisten ohne den Gewebsverbund durch Lyseverfahren zerstören zu müssen (Buchwalow et al. 2005). Besonders in der Abgrenzung verschiedener Zellarten, wie physiologisch im Gewebe vorhanden sind, könnte sich die Charakterisierung durch adäquate Markerprofile als nützlich erweisen. So könnten mesenchymale Stammzellen durch die immunzytochemische Mehrfachmarkierung z.B. im Knochenverbund oder innerhalb besiedelter und in vivo implantierten Trägermaterialien identifiziert und gegenüber anderen Zelllinien abgegrenzt werden. Diese Möglichkeit bietet den großen Vorteil Gewebsstrukturen in ihrer natürlichen Beschaffenheit und Aufbau bezüglich zellulärer Zusammensetzung zu betrachten.

#### **4.1.1. Spectrale Bildanalyse**

Mittels konventioneller Immunfluoreszenzfärbung lassen sich gleichzeitig nicht mehr als drei verschiedene Farbbereiche sicher voneinander abgrenzen. Somit beschränkt sich auch die Anzahl der möglichen zu untersuchenden Antigene in simultanen Färbungen. Die Hauptproblematik der Mehrfachfärbung ist die Bildung von Mischfarben bzw. Farbüberlagerungen und die Unfähigkeit des menschlichen Auges Farbspektren von geringerer Wellenlängendifferenz als 20nm voneinander abzugrenzen (Malik et al. 1996). Weiterhin hat die Signalintensität einen Einfluß auf das Farbempfinden. Ein Signal hoher Intensität kann als längerwellig empfunden werden als es tatsächlich ist. Dieses Phänomen zeigt sich besonders innerhalb der zur Verfügung stehenden Standardfiltersätze für die Farbbereiche blau, grün, rot und infrarot, da hier der dargestellte Bereich ohnehin schon eingeschränkt ist und dadurch die tatsächlichen Spectra der verschiedenen Fluorochrome in der Darstellung aneinander genähert werden. Es ist also aufgrund der o.g. Limitierungen nicht sicher möglich, innerhalb eines Farbfilters einen Farbstoff im oberen Wellenlängenbereich der darstellbaren Emission von einem im unteren Bereich zu unterscheiden (Tsurui et al. 2000). Um diese Problematik zu umgehen und eine sichere simultane Beurteilung von mehr als drei Antigenen zu gewährleisten, wurden durch ein Interferometer und anschließender spectraler Bildanalyse sämtliche Fluorochromspektren bis zu einem Wellenlängenunterschied von bis zu 10nm getrennt. Erst die spectrale Bildanalyse mit der nachfolgenden Auftrennung der gewonnenen Bilddaten ermöglicht also eine sichere simultane Beurteilung von mehr als vier Antigenen. Außerdem erhöht die Spectralanalyse zudem die Genauigkeit der Auswertung durch die Möglichkeit, das sog. Hintergrundrauschen von Immunfluoreszenzfärbung zu unterdrücken, indem der unter-

suchte Wellenlängenbereich auf das Emissionsspektrum eines Fluorochroms angepasst wird (Garini et al. 1999).

Ursprünglich wurde das System der spectralen Bildanalyse für das chromosomale Karyotyping entwickelt, um die feinen Farbunterschiede der verschiedenen markierten Chromosomen zu erfassen und diese voneinander abzugrenzen (Macville et al. 1997). Da Fluoreszenzaufnahmen aber ebenso als lineares System genähert werden können ist es ebenso möglich, überlagerte Farbsignale in Fluoreszenzmehrfachfärbungen basierend auf einer Einzelwertanalyse jedes Pixels auseinander zu rechnen (Tsurui et al. 2000).

Obwohl andere Studien aufgrund der präziseren Pixelauflösung die Kombination von verschiedenen Breitband Filtersystemen empfehlen, um jedes Fluorochrom optimal anzuregen und das volle Emissionsspektrum beurteilen zu können (Garini et al. 1999), wurde in dieser Studie eine Kombination von einem Breitbandfilter mit einem Triple-band Filter gewählt. Somit ließen sich besonders die relativ langen Aufnahmezeiten von zwei bis drei Minuten pro Bildausschnitt und Filtersystem deutlich verkürzen und die Gefahr des Photo Bleaching reduzieren, das bei mehreren Aufnahmen eines Bildabschnitts bei langen Belichtungszeiten unweigerlich auftritt. Das Verblasen der Signalintensität zu quantifizieren war zwar nicht Bestandteil der Studie, dennoch führten die zwei notwendigen Aufnahmen und Analysen eines Bildausschnitts für beide verwendeten Filtersätze zu konstanten Ergebnissen. Für die in dieser Studie beschriebene Anwendung lässt sich zusammenfassend ein optimales Ergebnis durch die Kombination von Triple-band Filtersets und Breitband Filtersystemen erzielen, so dass dem Einsatz von Mehrfachfiltersystem in der spectralen Bildanalyse durchaus ein großer Stellenwert zugesprochen werden sollte. Nur ein Mehrfach-Filterset zu verwenden scheitert in dieser Studie jedoch an der Anzahl der Fluorochrome bzw. der Varianz ihrer Emissionsspektren. So war es mit dem Triple-band Filterset SKY nicht möglich, die beiden blauen Fluorochrome DAPI (Molecular Probes) und AMCA (Dianova) zu erfassen. (s. Abb. 5 und Tab. 4).

Die gemessenen Emissionsspektren der einzelnen Fluorochrome konnten durch das hier angewandte System alle im näheren Bereich der vom Hersteller angegebenen Wellenlänge detektiert werden. Allerdings zeigte ein Teil der Farbstoffe Abweichungen bis zu 30 nm. Es ist in der Auswertung jedoch zu berücksichtigen, dass lediglich eine graphische Ausgabe der detektierten Emissionen durch das verwendete System geleistet werden kann. Der daraus ermittelte Wert ist somit nur grob zu erfassen, da

die Ausgabeskala in 20nm Schritten gefasst ist. Eine Angabe im Konfidenzbereich von 5nm ist dennoch gut möglich.

Beide blauen Farbstoffe DAPI und AMCA lagen mit ihrem Emissionsmaximum jeweils 20nm über den angegebenen Wellenlängenbereich. Dieses lässt sich durch den verwendeten Filtersatz 01 erklären. Obwohl der Emissionsfilter und der Strahlteiler eine optimale Darstellung der Emission zulassen, ist die Anregung des Farbstoffs nicht vollständig mit dem Anregungsbereich des Filters deckungsgleich. Während AMCA und DAPI ihr Anregungsoptimum bei 347nm bzw. 358nm besitzen, regt der Filtersatz 01 mit einer Bandbreite von 12nm um den Mittelpunkt von 365nm an. So kann eine Anregung in oberen Bereichen der möglichen Excitationsspectra auch zu einer Verschiebung der Emission in höhere Wellenlängen verursachen. Dieses Phänomen der Verschiebung des Emissionsmaximums oder -peaks ist auch schon von anderen Autoren beschrieben und nicht als unspezifisches Signal zu werten (Tsurui et al. 2000). Der Filtersatz 01 ist ferner von der Firma Zeiss als optimaler Filter für beide genannten Farbstoffe empfohlen.

Auch Alexa Fluor546 zeigt eine Verschiebung des Strahlungsmaximums von 573nm zu einer Wellenlänge von ungefähr 590nm. Die Anregung des Farbstoffs findet im adäquaten Bereich statt, allerdings lässt der Triple-band Filter SKY eine Emission erst ab 580 nm zu. Eine Verschiebung des Emissionsgraphen in Bereiche um 590nm ist also durch ein Abbocken tieferer Wellenlängen zu erklären. Gleiches gilt für Alexa Fluor633, welches die größte Abweichung von ca. 30nm aufweist. Hier ist bei optimaler Anregung eine Passage des emittierten Lichts erst ab 660nm durch den Filter möglich. Das eigentliche Emissionsmaximum wird also verschoben und der Scheitelpunkt des dargestellten Graphen ist bei 680nm dargestellt.

Alle übrigen Farbstoffe, d.h. Cy2, FITC und Texas Red stellen sich mit akzeptablen Abweichung von 10nm im vom Hersteller angegebenen Bereich dar und sind sowohl im Excitations- und Emissionsbereich mit den Daten des Filtersatzes konguent.

## 4.2. Morphologie

Humane mesenchymale Stammzellen sind in einer Vielzahl von Studien untersucht und analysiert worden (Dominici et al. 2006, Leo et al. 2006, Krampera et al. 2006). Für die meisten dieser Versuche wurden die Zellen nach Standardprotokollen aus Knochenmarkaspiraten gewonnen, indem sie über Dichtegradienten nach Zentrifuga-

tion, Plastikadhärenz und anschließende Expansion von den restlichen hämatopoetischen Zellen und Stromazellen getrennt wurden (Dominici et al. 2006, Baksh et al. 2004). Durch diese Methode gelingt es, Verunreinigungen durch andere Zelllinien weitestgehend zu beseitigen (Pittenger et al. 1999). Trotzdem sind die hMSC Kulturen morphologisch inhomogen, selbst wenn sie aus einer Zelle kloniert und expandiert werden (Colter et al. 2000, Mets et al. 1981). Die Literatur unterteilt die zu beobachtenden Morphologien überwiegend in 3 Subtypen, RS-Zellen, spindelförmige Zellen und flache Riesenzellen (Prockop et al. 2003, Sekiya et al. 2002, Colter et al. 2001, Prockop et al. 2001). Innerhalb dieser Subtypen scheinen die RS-Zellen, auch S-Zellen genannt (Shur et al. 2002), eine Vorläuferzelle darzustellen, die in der Hierarchie der Differenzierung vor den übrigen Zelltypen zu sehen ist (Zhou et al. 2005, Smith et al. 2004, Shur et al. 2002, Sekiya et al. 2002, Colter et al. 2001). Daher werden große Hoffnungen auf diese hMSC Subpopulation auch in klinischen in vivo Studien und Anwendung im Tissue Engineering gesetzt (Colter et al. 2001). Hierbei erscheinen RS-Zellen ein erhöhtes Potential für die chondrogene Differenzierung aufzuweisen (Sekiya et al. 2002). Aber auch die RS-Zellen besitzen kein charakteristisches Oberflächen Epitop, so dass auch hier noch weitere Studien zur hierarchischen Einordnung der unterschiedlichen Morphologien nötig sein werden.

Erklärungsversuche und Hypothesen für dieses unterschiedliche Erscheinungsbild der hMSC sind abermals durch den unterschiedlichen Studienaufbau erschwert. Nach einheitlicher Literaturmeinung sind diese morphologische Diskrepanzen zwischen einzelnen Kulturen neben Zellpassage (Bruder et al. 1997), Spendervariabilität (Mareschi et al. 2006) auch dem Entnahmeort (Musina et al. 2005) zuzusprechen. Dabei ist Knochenmark als Hauptentnahmequelle mit dem höchsten Gehalt an RS-Zellen anzusehen (Musina et al. 2005).

Studien haben allerdings auch gezeigt, dass innerhalb der Zellexpansion eine einzelne Zelle im Verlauf verschiedene Veränderungen durchlebt und dabei sogar alle Morphologien der unterschiedlicher Subtypen aufweisen kann (DiGirolamo et al. 1999). So kann nicht von einer konstanten morphologischen Erscheinung der Zellen ausgegangen werden. Diese ändert sich am eindrucksvollsten bei zunehmender Konfluenz und Alter einer Zellkultur (Sekiya et al. 2002, Colter et al. 2001).



### 4.3. Verwendete Marker

Hauptprobleme in der Stammzellforschung mit hMSC sind der schwierige Identifizierung und die Phänotypisierung dieses Zelltyps. Auch in langjährigem Forschungsbemühen ist es bisher nicht gelungen einen einzelnen, spezifischen Marker für diesen Stammzelltyp zu erfassen oder zu etablieren (Raimondo et al. 2006, Derubeis et al. 2004, Sekiya et al. 2002, Conget et al. 1999). So muss für die Vielzahl der verschiedenen Antigene, die meist in Form von Oberflächenproteinen zur Identifizierung von hMSC gebräuchlich sind, stets berücksichtigt werden, dass diese auch auf anderen Zellreihen vorkommen (Otto et al. 2004, Gronthos et al. 2003, Majumdar et al. 2003, Jiang et al. 2002). Solange also ein exklusiver Marker zur Identifizierung von hMSC fehlt, erscheint die Kombination von mehreren hMSC typischen Antigenen zu einem für diese Zellen einzigartigen Expressionsprofil als sinnvolles Werkzeug zur Charakterisierung. Diese Vorstellung entspricht u.a. auch den Bemühungen der International Society for Cellular Therapie zur Schaffung gemeinsamer Minimalkriterien im Versuch, die mesenchymale Stammzelle besser eingrenzen zu können (Dominici et al. 2006).

Mit den verwendeten Antigenen ist es in dieser Studie gelungen, ein geeignetes Markerprofil zu definieren, um hMSC von anderen Zellen des Binde- und Stützgewebes zu differenzieren. Dabei erscheinen besonders die Oberflächenproteine CD105, CD106 und CD44 als äußerst geeignete Kandidaten zur Charakterisierung von hMSC.

Die Diskussion der einzelnen in dieser Studie verwendeten Marker gliedert sich in Anlehnung an Kapitel 1.1.3 im Folgenden in Oberflächen-, Struktur- und extrazelluläre Matrixproteine.

#### Oberflächenproteine:

Im Rahmen der Identifizierung von hMSC ist CD105 (Endoglin) schon früh beschrieben (Barry et al. 1999, Pittenger et al. 1999, Haynesworth et al. 1992a, Haynesworth et al. 1992b) und wurde auch weiterhin in der Literatur konstant als einer der populärsten und vielleicht spezifischsten Marker für hMSC gefordert (Dominici et al. 2006, Javazon et al. 2004, Lee et al. 2004, Tuli et al. 2003). Aussagen über die Häufigkeit der CD105 Expression innerhalb einer hMSC Kultur wurden in FACS Analysen durchgeführt. Hier gelingt ein Nachweis in über 95% der Zellen (Musina et al. 2005). Im Vergleich zu humanen Fibroblasten ist für FACS-Analysen beschrieben, dass

CD105 möglicherweise selektiv in hMSC exprimiert wird. Vergleichende Studien zu Osteoblasten fehlen noch, allerdings ist beschrieben, dass die Expression von CD105 im Verlauf der osteogenen Differenzierung abnimmt. Während CD105 in Studien in nahezu jeder humanen mesenchymalen Stammzelle nachgewiesen werden konnte, fehlt es in Osteoblasten oder Fibroblasten (Ishii et al. 2005). Somit entsprechen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit der überwiegenden Meinung der Literatur und auch in dieser Studie erscheint CD105 als ein sehr gut geeigneter Marker für die Identifizierung von hMSC und zur Abgrenzung gegenüber anderen Zelltypen des Binde- und Stützgewebes. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass konkrete Aussagen zur Häufigkeitsverteilung von Proteinen innerhalb einer Zellkultur durch die Methode der Immunfluoreszenzfärbung nur unzureichend getroffen werden können. Das Färbemuster von CD105 läßt im Zusammenhang mit seiner Funktion als Teil des TGF $\beta$ -Rezeptors verschiedene Vermutungen zu. Zum einen finden sich neben der für ein Oberflächenprotein typischen, den gesamten Zelleib betreffenden Färbung starke Akzentuierung über Membranverdichtungen. Diese Membranverdichtungen sind unter anderem im Sinne von Filopodien, d.h. Zellausziehungen, am Migrationsprozeß der Zellen beteiligt. Dieses würde die Interaktion von CD105 mit TGF $\beta$  unterstützen, das maßgeblich an Zellwachstum und -proliferation beteiligt ist (Lastres et al. 1996). Für Mausfibroblasten konnte bisher schon bewiesen werden, dass eine Überexpression von CD105 zu einer erhöhten Migration, Veränderung der Morphologie und Adhäsion führt (Guerrero-Esteo et al. 1999). So wurde auch in Studien an Myozyten und die Interaktion und Kolo-kalisation von CD105 mit sog. focal adhesions, d.h. Zonen der Zellverankerung bzw. -verbindung nachgewiesen (Honczarenko et al. 2006, Guo et al. 2004). Auffällig am Verteilungsmuster von CD105 ist außerdem die für ein Oberflächenprotein eher untypische retikuläre Verteilung paranukleär im Sinne einer Anreicherung im endoplasmatischen Retikulum. Dieses würde für eine aktive und reichliche Expression und Translation des Proteins sprechen. CD105 scheint also von wichtiger Bedeutung für die stark proliferierenden und migrierenden hMSC zu sein und wird wohl in größeren Mengen benötigt.

CD106 (VCAM-1) ist auf hMSC in unterschiedlicher Expression beschrieben. Viele Autoren erwähnen es als festen, wichtigen Marker für die Charakterisierung bzw. Immunphänotypisierung von hMSC (Izadpanah et al. 2006, Otto et al. 2004, Roufosse et al. 2004, Gronthos et al. 2003), während andere die Expression von CD106 als variabel und passageabhängig beurteilen (Mareschi et al. 2006, Romanov et al.

2005). Hier scheint neben der Zellkulturdichte die Spendervariabilität eine große Rolle zu spielen (Romanov et al. 2005). Insgesamt schwanken die in der Literatur beschriebenen Expressionshäufigkeiten von FACS-Analysen z.B. abhängig vom Spenderalter von 5-70% (Mareschi et al. 2006). Für humane Fibroblasten und Osteoblasten ist CD106 kein gängiger Marker. Allerdings kann es im Rahmen von inflammatorischen Reaktionen und Interleukinstimulation bzw. Überexpression von proinflammatorischen Mediatoren nachgewiesen werden (Rifas et al. 2003, Gao et al. 1996). In den vorliegenden Untersuchungen zeigte sich jedoch in der immunhistochemischen Färbung ein insgesamt homogen positives Ergebnis für die verwendete hMSC Population, während sich Osteoblasten und Fibroblasten nicht anfärben ließen. Das Färbemuster von CD106 mit seiner neben der Membranbetonung starken granulozytären Verteilung über das gesamte Cytoplasma läßt allerdings die Vermutung zu, dass vielleicht weitere Stimuli nötig sind, das Protein in die Zellmembran zu transportieren. Dieses könnte auch die unterschiedlichen Ergebnisse innerhalb der Literatur bezüglich der CD106 Expression erklären. Außerdem ist besonders für die häufig beschriebenen FACS-Analysen zu berücksichtigen, dass sich bei einer sowohl intra-, als auch extrazellulären Verteilung eines Proteins unterschiedliche Ergebnisse für lysierte und nicht lysierte Zellen ergeben. Studien der CD106 Expression auf anderen Zelllinien, wie epitheliale, endotheliale, dendritische Zellen und Makrophagen (Gearing et al. 1993) haben gezeigt, dass eine konsekutive Hochregulierung stark mit Entzündungsreaktionen assoziiert ist (Freedman et al. 1990). Deutlich wird dieser Zusammenhang z.B. auch auf lymphoidalen Geweben und Epithelzellen des Thymus (Salomon et al. 1997). Dabei kommt CD106 eine besondere Rolle bei der Leukozytenadhäsion zu, da es vermutlich sowohl die primäre Adhäsion (rolling) als auch die finale Phase der Adhäsion (spreading und tethering) vermitteln kann (Alon et al. 1995, Berlin et al. 1995). Weiterhin ist bekannt das Knochenmarkstromazellen und Endothelzellen des Knochenmarks durch CD106 mit hämatopoetischen Vorläuferzellen interagieren, um so Ihre Ausleitung aus dem Knochenmark zu ermöglichen (Mazo et al. 1998). Eine Übertragung dieser Eigenschaften auf hMSC läßt CD106 auch eine mögliche Rolle in der Adhäsion von hMSC in inflammatorisch gereizten Arealen zukommen, wie z.B. in ossären Defektgebieten.

CD44 ist als transmembranärer Rezeptor für den Hauptliganden Hyaluronsäure, der eine entscheidende Rolle in vielen Prozessen des zellulären Verhaltens spielt, vor allem in im Bereich der Zelladhäsion, -migration und -invasion (Cichy et al. 2003).

CD44 vermittelt dabei Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktionen. Für die Untersuchung von auf Objektträgern fixierten hMSC ist CD44 besonders interessant, da es als einer der ersten Marker nach Adhäsion auf Oberflächen exprimiert wird (Zohar et al. 1997). Dabei kann der Marker passageunabhängig und nahezu in jeder hMSC Kultur nachgewiesen werden (Kotobuki et al. 2004, Shur et al. 2002, Deschaseaux et al. 2000). Auch bei vergleichenden Untersuchungen von hMSC aus verschiedenen Geweben kann CD44 mit einer Expressionshäufigkeit um die 90% nachgewiesen werden (Mareschi et al. 2006, Musina et al. 2005). Entsprechend seiner Funktion als Oberflächenrezeptor und Adhäsionsprotein ist auch das äußerst homogene Verteilungsmuster der immunzytochemischen Färbung zu erklären. Da CD44 fast ausschließlich in der Zellmembran nachzuweisen ist, wird die These, dass es sich hier um einen sehr frühen Marker nach Adhäsion der Zellen handelt nur unterstützt. Die Translation des Proteins zur Zelloberfläche scheint zum Untersuchungszeitpunkt schon vollständig abgelaufen zu sein. Im Sinne seiner Funktion als Adhäsionsprotein wird CD44 eine wichtige Rolle in Homing-Prozessen von hMSC zugeschrieben (Silva, Jr. et al. 2003), d.h. das Aus- bzw. Einwandern von Stammzellen in Defektzonen des Körpers oder zurück in das Knochenmark. In neueren Studien wird CD44 auch eine Bedeutung für das Recruitment von hMSC aus dem zirkulierenden Blut in Leitschienen oder Defektzonen des Körpers zugesprochen, indem es sowohl eine überschießende Fibrosierung verhindert, als auch durch Reduktion der Lymphozyteninfiltration eine Entzündungsreaktion vermindert (Zhu et al. 2006, Pure et al. 2001, Cuff et al. 2001, Lesley et al. 2000). Neben der Adhäsion von Zellen scheint CD44 auch eine Rolle in der gerichteten Zellmigration zu besitzen (Weber et al. 1996). So ist CD44 von entscheidender Rolle in der embryonalen Extremitätenentwicklung, indem es als Antigen-präsentierender Oberflächenrezeptor u.a. im Zusammenspiel mit FGF-8 mesenchymale Stammzellen in einem proliferativen Zustand hält (Sherman et al. 1998). Der fehlende Nachweis auf Fibroblasten bei positiven Ergebnissen von hMSC und humanen Osteoblasten erlaubt eine sichere Unterscheidung zwischen den genannten Zelllinien und ist kongruent zu Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (Ishii et al. 2005, Jamal et al. 1996).

#### Extrazelluläre Matrixproteine:

Kollagen-IV dient als kollagenes Matrixprotein den Zellen als mechanisches Stützgerüst, als Leitschiene und Interaktionspartner für zelluläre Übertragung. Diese Interak-

tionen führen zu einer indirekten oder direkten Kontrolle zellulärer Funktionen wie z.B. Migration, Differenzierung, Proliferation, Apoptose (Giancotti et al. 1999, Lukashev et al. 1998, Gamby et al. 1996, Varner et al. 1996). Ursprünglich wurde angenommen, dass Kollagen-IV vornehmlich von Fibroblasten gebildet wird (Shimonishi et al. 2005), nicht zuletzt seit intensiver Bemühungen um die Charakterisierung von hMSC ist Kollagen IV jedoch mehrfach als typisches Protein der ECM beschrieben (Roufosse et al. 2004, Silva, Jr. et al. 2003, Minguell et al. 2001). Die Aussagen zur Expression von hOB sind im Gegensatz dazu eher spärlich. Es wird vermutet, dass Col-IV zwar noch von osteogenen Vorläuferzellen produziert wird, nicht jedoch von reifen und späteren Differenzierungsstufen in Richtung der osteoblastären Linie (Schieker et al. 2004, Deschaseaux et al. 2000, Chichester et al. 1993). In den vorliegenden Untersuchungen zeigten die Färbungen gegen Kollagen-IV die größte Heterogenität innerhalb der hMSC und hOB Kulturen. Das ermittelte immunzytochemische Färbemuster stimmt jedoch mit dem von anderen Arbeitsgruppen überein (Deschaseaux et al. 2000, Chichester et al. 1993).

Besonders die überwiegend positive Anfärbung der Osteoblasten muß diskutiert werden, da die Literatur hier keine eindeutigen Daten bietet, in welchem Reifegrad Osteoblasten Kollagen-IV noch produzieren (Deschaseaux et al. 2000, Chichester et al. 1993). Zwar kommt Kollagen-IV im Knochen vor, seine Herkunft ist jedoch nicht bekannt. Möglicherweise wird es von hMSC oder von Endothelzellen gebildet. HOB sollen hierbei eine eher untergeordnete Rolle spielen (Becker et al. 1986). Die positiven Färbeergebnisse innerhalb der hOB geben möglicherweise einen Hinweis auf das Vorhandensein einer Subpopulation. Einerseits könnte es sich um frühe osteoblastäre Differenzierungsstufen handeln, welche in noch in der Lage sind, Kollagen-IV zu bilden (Chichester et al. 1993). Andererseits könnte es ein Zeichen auf das Vorhandensein eines anderen Zelltyps sein, wie z.B. Endothelzellen (Sandberg et al. 1988). Da das Färbeprofil der hOB für die übrigen gefärbten Proteine dem reifer Osteoblasten entspricht und nicht Endothelzellen, ist es aber wahrscheinlicher, dass es sich um frühe Osteoprogenitoren handelt.

Fibronectin wird von hMSC, Fibroblasten und Osteoblasten in großer Menge sezerniert und das in dieser Studie ermittelte intra- und extrazelluläre Färbemuster stimmt mit dem anderer Arbeitsgruppen überein (Roufosse et al. 2004, Silva, Jr. et al. 2003, Vogel et al. 2003, Minguell et al. 2001, Chichester et al. 1993, Engel et al. 1981). Zwischen den einzelnen Zelltypen lassen sich keine Unterschiede auf Ebene der

Immunfluoreszenz ermitteln. Dennoch ist Fibronectin als zusätzlicher, stark exprimierter Marker in der immunzytochemischen Mehrfachfärbung von Bedeutung, um somit die technische Möglichkeit einer Unterscheidung von sieben verschiedenen Farbstoffen durch das in dieser Studie verwendete System aufzuzeigen.

### Strukturproteine:

Actin ist die Hauptkomponente des Cytoskeletts und kommt in allen kernhaltigen Zellen vor. Es ist in eukaryotischen quantitativ das häufigste nachweisbare Protein. Die wichtigsten Aufgaben des Actin sind die Stabilisierung, Adhäsion und Fortbewegung der Zelle. Die Darstellung des Cytoskeletts in dieser Studie soll zusätzliche Informationen über die Zellmorphologie bereitstellen. F-Actin zeigt gleichermaßen in allen drei Zelltypen seine typische fibrilläre, zytoplasmatische Konfiguration. Entsprechend der Zellmorphologie imponieren hier auch Unterschiede in der strukturellen Anordnung der Actinfilamente, so dass die Phalloidinfärbung als geeignetes Instrument zur unterstützenden Darstellung der Zellmorphologie anzusehen ist. In hMSC ist ein entscheidender Zusammenhang zwischen mechanischen Reizen und der strukturellen Anordnung des zellulären Stützgerüsts bereits von anderen Arbeitsgruppen aufgezeigt worden (Pan et al. 2005, Liao et al. 2004). Als besonders ausgeprägtes, den gesamten Zelleib aufspannendes Netz stellt sich das Actingerüst in den hexagonalen Osteoblasten dar. In den Fibroblasten und spindelförmigen hMSC gibt die nahezu parallel verlaufende Anordnung der Actinfilamente die Ausrichtung der Zellpopulation wieder. Die Zellen beschreiben in höherer Konfluenz typischerweise ein fischzugartiges Verteilungsmuster (Pittenger et al. 1999).

Die RS-Zellen (Abb. 12 Ausschnitt f) innerhalb der hMSC Population weisen dagegen keine fibrillären Strukturen auf. Vielmehr zeigen sich hier prominente Ausstülpungen in der Zellmembran. Diese könnten Filopodien und Lamellopodien entsprechen, die entscheidend zur gerichteten Migration der Zelle beitragen und durch Komponenten des Actingerüsts stabilisiert werden (Lodish H et al. 2001). In Zusammenschau mit dem noch nicht vollständig organisiertem Cytoskelett könnte die spezielle Morphologie des Actinskeletts Ausdruck des schnellen Replikationszyklus der RS-Zellen und ihrer hohen zellbiologischen Aktivität sein.

## 5. Ausblick

Eine der größten Schwierigkeiten in der Erforschung humaner mesenchymaler Stammzellen ist die Identifizierung der idealen Zellpopulation innerhalb des heterogenen Zellpools (Kassem 2006, Kemp et al. 2005, Sekiya et al. 2002, Pittenger et al. 1999). Besonders das Fehlen eines einzelnen spezifischen Markers erfordert aufwendige Differenzierungsassays und umfangreiche Expressionsanalysen um den Stammzellbeweis innerhalb angestrebter Studien an hMSC anzutreten (Dominici et al. 2006, Horwitz et al. 2005). In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, über die simultane Detektion von sechs Antigenen mittels Immunfluoreszenzmarkierung eine eindeutige Identifizierung von hMSC zu gewährleisten und eine Unterscheidung gegenüber anderen Zelllinien zu treffen. Diese Methode lässt sich sinnvoll in vielen Bereichen und Versuchsanordnungen der adulten Stammzellforschung integrieren.

Die simultane Mehrfachmarkierung mittels Immunfluoreszenz ist geeignet, hMSC gegenüber differenzierten Zelltypen zu diskriminieren. Eine Anwendung, die in der Beurteilung von Primärkulturen aus Knochenmarksaspiraten von Bedeutung ist, da hier ein heterogenes Zellgemisch verschiedener mononukleärer Zellen in unterschiedlichen Reifegraden vorliegt (Colter et al. 2001).

Ferner bietet die beschriebene Methode den großen Vorteil neben der Anwendung in der Zellkultur, auch Gewebestrukturen in ihrer natürlichen Beschaffenheit und Aufbau bezüglich zellulärer Zusammensetzung zu analysieren. So kann der Nachweis und konsekutiv die Lokalisation einer Stammzelle Hinweise hinsichtlich der Beurteilung biologischer Stammzellnischen erbringen. Auch die histologische Aufarbeitung von implantierten, besiedelten Trägermaterialien ist durch beschriebene Methode möglich. Somit bietet die Mehrfach-Immunfluoreszenz viele Anwendungsmöglichkeiten in der Materialforschung. Die Proteinexpression und ihre Dynamik in verschiedenen Phasen der Besiedlung und Kultivierung von hMSC auf unterschiedlichen Trägermaterialien, sog. Scaffolds, kann Hinweise auf den Reifegrade der Stammzelle während eines bestimmten Untersuchungszeitpunkts auf dem Weg zu einer differenzierten Zelllinie zu erhalten. Im Bereich des Tissue Engineerings von Knochen ließe sich somit anstreben, Aussagen über die verschiedenen Eigenschaften von Leitschienen zu gewinnen.

Für weitere und fortführende Analysen kann das verwendete Markerprofil nahezu beliebig an die jeweiligen Ansprüche angepasst werden. So erfüllen die Oberflächen

Proteine wie CD105, CD106 und CD44 die Ansprüche an ein Markerprofil für die Charakterisierung von Stammzellen am besten. Eine Umstellung oder Ergänzung wäre z.B. möglich entsprechend Ergebnissen aus aktueller Literatur oder gemäß Empfehlungen internationaler Kommissionen wie der International Society for Cellular Therapy (Dominici et al. 2006).



## 6. Abstract

### Zielsetzung und Fragestellung:

Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) exprimieren eine Vielzahl verschiedener Antigene. Dennoch ist es nicht möglich eine eindeutige Phänotypisierung dieses Zelltyps vorzunehmen, da keiner der bekannten Zellmarker spezifisch ist. Daher war es Ziel dieser Studie, durch die Etablierung einer 7-Farben Fluoreszenz hMSC auf Einzelzellebene durch ein geeignetes Markerprofil zu charakterisieren und sie gegenüber Osteoblasten und Fibroblasten abgrenzen zu können.

### Material und Methoden:

Kommerziell erhältliche HMSC, humane Osteoblasten und Fibroblasten wurden als adhärenzte Zellen auf Einzelzellniveau einer simultanen Mehrfach-Immunfluoreszenzfärbung gegen die Antigene CD105, CD106, CD44, Kollagen IV, Fibronektin und F-Aktin unterzogen. Anschließend wurde mittels eines Sagnac Interferometers eine spectrale Bildanalyse mit Dekomposition der einzelnen Farbstoffe durchgeführt.

### Ergebnisse:

Hinsichtlich aller untersuchten Zellmarker zeigten hMSC ein positives Färbeergebnis, während in humanen Osteoblasten und Fibroblasten CD105 und CD106 nicht nachgewiesen werden konnte. Eine Unterscheidung zwischen letzteren Zelltypen konnte durch CD44 gewährleistet werden, welches nur in Osteoblasten ein positives Ergebnis zeigte. Alle verwendeten Farbstoffe konnten eindeutig in der Spectralanalyse bis zu einem Wellenlängenabstand von 10nm voneinander getrennt werden.

### Schlussfolgerungen:

Es ist in dieser Studie gelungen, ein geeignetes Markerprofil zu definieren, um hMSC von anderen Zellen des Binde- und Stützgewebes abzugrenzen. Besonders die Spectralanalyse eines simultan angewandten Phänotypisierungsprofils auf Einzelzellniveau erscheint bei der großen Heterogenität dieser Stammzellen als potentes Werkzeug zur Untersuchung gegenüber anderen Zelllinien. Besonders die Oberflächenproteine CD105, CD106 und CD44 erscheinen als äußerst geeignete Kandidaten zur Charakterisierung von hMSC.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Alon R, Kassner PD, Carr MW, Finger EB, Hemler ME, Springer TA (1995); The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1; *J Cell Biol* 128(6):1243-1253
2. Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, Seed B (1990); CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate; *Cell* 61(7):1303-1313
3. Aumailley M, Krieg T (1996); Laminins: a family of diverse multifunctional molecules of basement membranes; *J Invest Dermatol* 106(2):209-214
4. Awad HA, Boivin GP, Dressler MR, Smith FN, Young RG, Butler DL (2003); Repair of patellar tendon injuries using a cell-collagen composite; *J Orthop Res* 21(3):420-431
5. Baksh D, Song L, Tuan RS (2004); Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy; *J Cell Mol Med* 8(3):301-316
6. Barry FP, Boynton RE, Haynesworth S, Murphy JM, Zaia J (1999); The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105); *Biochem Biophys Res Commun* 265(1):134-139
7. Becker J, Schuppan D, Benzion H, Bals T, Hahn EG, Cantaluppi C et al. (1986); Immunohistochemical distribution of collagens types IV, V, and VI and of pro-collagens types I and III in human alveolar bone and dentine; *J Histochem Cytochem* 34(11):1417-1429
8. Bellon T, Corbi A, Lastres P, Cales C, Cebrian M, Vera S et al. (1993); Identification and expression of two forms of the human transforming growth factor-beta-binding protein endoglin with distinct cytoplasmic regions; *Eur J Immunol* 23(9):2340-2345

9. Berlin C, Bargatze RF, Campbell JJ, von Andrian UH, Szabo MC, Hasslen SR et al. (1995); alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow; *Cell* 80(3):413-422
10. Beutner EH (1961); IMMUNOFLUORESCENT STAINING: THE FLUORESCENT ANTIBODY METHOD; *Bacteriol Rev* 25(1):49-76
11. Beyer NN, da Silva ML (2006); Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization; *Handb Exp Pharmacol*(174):249-282
12. Bianco P, Gehron RP (2000); Marrow stromal stem cells; *J Clin Invest* 105(12):1663-1668
13. Bianco P, Robey PG (2001); Stem cells in tissue engineering; *Nature* 414(6859):118-121
14. Bilbe G, Roberts E, Birch M, Evans DB (1996); PCR phenotyping of cytokines, growth factors and their receptors and bone matrix proteins in human osteoblast-like cell lines; *Bone* 19(5):437-445
15. Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE (1997); Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation; *J Cell Biochem* 64(2):278-294
16. Bruder SP, Jaiswal N, Ricalton NS, Mosca JD, Kraus KH, Kadiyala S (1998); Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration; *Clin Orthop*(355 Suppl):S247-S256
17. Buchwalow IB, Minin EA, Boecker W (2005); A multicolor fluorescence immunostaining technique for simultaneous antigen targeting; *Acta Histochem* 107(2):143-148
18. Burgeson RE, Nimni ME (1992); Collagen types. Molecular structure and tissue distribution; *Clin Orthop Relat Res*(282):250-272
19. Camargo FD, Chambers SM, Goodell MA (2004); Stem cell plasticity: from transdifferentiation to macrophage fusion; *Cell Prolif* 37(1):55-65

20. Cancedda R, Bianchi G, Derubeis A, Quarto R (2003); Cell therapy for bone disease: a review of current status; *Stem Cells* 21(5):610-619
21. Caplan AI, Bruder SP (2001); Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century; *Trends Mol Med* 7(6):259-264
22. Caplan AI, Dennis JE (2006); Mesenchymal stem cells as trophic mediators; *J Cell Biochem* 98(5):1076-1084
23. Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G, Kapoor N, Meyers P, Chiarieri D et al. (1980); Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny; *Blood* 56(2):289-301
24. Chichester CO, Fernandez M, Minguell JJ (1993); Extracellular matrix gene expression by human bone marrow stroma and by marrow fibroblasts; *Cell Adhes Commun* 1(2):93-99
25. Cichy J, Pure E (2003); The liberation of CD44; *J Cell Biol* 161(5):839-843
26. Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ (2000); Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow; *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(7):3213-3218
27. Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ (2001); Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells; *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(14):7841-7845
28. Conget PA, Minguell JJ (1999); Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells; *J Cell Physiol* 181(1):67-73
29. Cuff CA, Kothapalli D, Azonobi I, Chun S, Zhang Y, Belkin R et al. (2001); The adhesion receptor CD44 promotes atherosclerosis by mediating inflammatory cell recruitment and vascular cell activation; *J Clin Invest* 108(7):1031-1040
30. De Rosa SC, Brenchley JM, Roederer M (2003); Beyond six colors: a new era in flow cytometry; *Nat Med* 9(1):112-117

31. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M et al. (2003); Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow; *Cells Tissues Organs* 174(3):101-109
32. Derubeis AR, Cancedda R (2004); Bone marrow stromal cells (BMSCs) in bone engineering: limitations and recent advances; *Ann Biomed Eng* 32(1):160-165
33. Deschaseaux F, Charbord P (2000); Human marrow stromal precursors are alpha 1 integrin subunit-positive; *J Cell Physiol* 184(3):319-325
34. DiGirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R, Prockop DJ (1999); Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate; *Br J Haematol* 107(2):275-281
35. Direkze NC, Forbes SJ, Brittan M, Hunt T, Jeffery R, Preston SL et al. (2003); Multiple organ engraftment by bone-marrow-derived myofibroblasts and fibroblasts in bone-marrow-transplanted mice; *Stem Cells* 21(5):514-520
36. Dominici M, Hofmann TJ, Horwitz EM (2001); Bone marrow mesenchymal cells: biological properties and clinical applications; *J Biol Regul Homeost Agents* 15(1):28-37
37. Dominici M, Le BK, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D et al. (2006); Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement; *Cytotherapy* 8(4):315-317
38. Engel J, Odermatt E, Engel A, Madri JA, Furthmayr H, Rohde H et al. (1981); Shapes, domain organizations and flexibility of laminin and fibronectin, two multifunctional proteins of the extracellular matrix; *J Mol Biol* 150(1):97-120
39. Foster LJ, Zeemann PA, Li C, Mann M, Jensen ON, Kassem M (2005); Differential expression profiling of membrane proteins by quantitative proteomics in a human mesenchymal stem cell line undergoing osteoblast differentiation; *Stem Cells* 23(9):1367-1377

40. Freedman AS, Munro JM, Rice GE, Bevilacqua MP, Morimoto C, McIntyre BW et al. (1990); Adhesion of human B cells to germinal centers in vitro involves VLA-4 and INCAM-110; *Science* 249(4972):1030-1033
41. Friedenstein AJ (1961); Osteogenetic activity of transplanted transitional epithelium; *Acta Anat (Basel)* 45:31-59
42. Gamby C, Waage MC, Allen RG, Baizer L (1996); Growth-associated protein-43 (GAP-43) facilitates peptide hormone secretion in mouse anterior pituitary AtT-20 cells; *J Biol Chem* 271(17):10023-10028
43. Gao JX, Issekutz AC (1996); Expression of VCAM-1 and VLA-4 dependent T-lymphocyte adhesion to dermal fibroblasts stimulated with proinflammatory cytokines; *Immunology* 89(3):375-383
44. Garini Y, Gil A, Bar-Am I, Cabib D, Katzir N (1999); Signal to noise analysis of multiple color fluorescence imaging microscopy; *Cytometry* 35(3):214-226
45. Gearing AJ, Newman W (1993); Circulating adhesion molecules in disease; *Immunol Today* 14(10):506-512
46. Giancotti FG, Ruoslahti E (1999); Integrin signaling; *Science* 285(5430):1028-1032
47. Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortessidis A et al. (2003); Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow; *J Cell Sci* 116(Pt 9):1827-1835
48. Grove JE, Bruscia E, Krause DS (2004); Plasticity of bone marrow-derived stem cells; *Stem Cells* 22(4):487-500
49. Guerrero-Esteo M, Lastres P, Letamendia A, Perez-Alvarez MJ, Langa C, Lopez LA et al. (1999); Endoglin overexpression modulates cellular morphology, migration, and adhesion of mouse fibroblasts; *Eur J Cell Biol* 78(9):614-623
50. Guo B, Rooney P, Slevin M, Li C, Parameshwar S, Liu D et al. (2004); Overexpression of CD105 in rat myoblasts: role of CD105 in cell attachment, spreading and survival; *Int J Oncol* 25(2):285-291

51. Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI (1992a); Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies; *Bone* 13(1):69-80
52. Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI (1992b); Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow; *Bone* 13(1):81-88
53. Honczarenko M, Le Y, Swierkowski M, Ghiran I, Glodek AM, Silberstein LE (2006); Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors; *Stem Cells* 24(4):1030-1041
54. Horwitz EM (2003); Stem cell plasticity: the growing potential of cellular therapy; *Arch Med Res* 34(6):600-606
55. Horwitz EM, Le BK, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC et al. (2005); Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement; *Cytotherapy* 7(5):393-395
56. Janus A, Holz GG, Theise ND, Hussain MA (2003); In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion; *J Clin Invest* 111(6):843-850
57. Ishii M, Koike C, Igarashi A, Yamanaka K, Pan H, Higashi Y et al. (2005); Molecular markers distinguish bone marrow mesenchymal stem cells from fibroblasts; *Biochem Biophys Res Commun* 332(1):297-303
58. Izadpanah R, Trygg C, Patel B, Kriedt C, Dufour J, Gimble JM et al. (2006); Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue; *J Cell Biochem*
59. Jaiswal RK, Jaiswal N, Bruder SP, Mbalaviele G, Marshak DR, Pittenger MF (2000); Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase; *J Biol Chem* 275(13):9645-9652
60. Jamal HH, Aubin JE (1996); CD44 expression in fetal rat bone: in vivo and in vitro analysis; *Exp Cell Res* 223(2):467-477

61. Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW (2004); Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging; *Exp Hematol* 32(5):414-425
62. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR et al. (2002); Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow; *Nature* 418(6893):41-49
63. Kansas GS (1996); Selectins and their ligands: current concepts and controversies; *Blood* 88(9):3259-3287
64. Karp G. *Cell and Molecular Biology - Concepts and Experiments*. 2005.
65. Kasperk C, Wergedal J, Strong D, Farley J, Wangerin K, Gropp H et al. (1995); Human bone cell phenotypes differ depending on their skeletal site of origin; *J Clin Endocrinol Metab* 80(8):2511-2517
66. Kassem M (2004); Mesenchymal stem cells: biological characteristics and potential clinical applications; *Cloning Stem Cells* 6(4):369-374
67. Kassem M (2006); Stem cells: potential therapy for age-related diseases; *Ann N Y Acad Sci* 1067:436-442
68. Kemp KC, Hows J, Donaldson C (2005); Bone marrow-derived mesenchymal stem cells; *Leuk Lymphoma* 46(11):1531-1544
69. Korblyng M, Estrov Z (2003); Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept?; *N Engl J Med* 349(6):570-582
70. Kotobuki N, Hirose M, Takakura Y, Ohgushi H (2004); Cultured autologous human cells for hard tissue regeneration: preparation and characterization of mesenchymal stem cells from bone marrow; *Artif Organs* 28(1):33-39
71. Krabbe C, Zimmer J, Meyer M (2005); Neural transdifferentiation of mesenchymal stem cells--a critical review; *APMIS* 113(11-12):831-844
72. Krampera M, Pizzolo G, Aprili G, Franchini M (2006); Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair; *Bone* 39(4):678-683



73. Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R et al. (2001); Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell; *Cell* 105(3):369-377
74. Lamvik J, Hella H, Liabakk NB, Halaas O (2001); Nonlabeled secondary antibodies augment/maintain the binding of primary, specific antibodies to cell membrane antigens; *Cytometry* 45(3):187-193
75. Lastres P, Letamendia A, Zhang H, Rius C, Almendro N, Raab U et al. (1996); Endoglin modulates cellular responses to TGF-beta 1; *J Cell Biol* 133(5):1109-1121
76. Lebrin F, Goumans MJ, Jonker L, Carvalho RL, Valdimarsdottir G, Thorikay M et al. (2004); Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF-beta/ALK1 signal transduction; *EMBO J* 23(20):4018-4028
77. Lee RH, Hsu SC, Munoz J, Jung JS, Lee NR, Pochampally R et al. (2006); A subset of human rapidly self-renewing marrow stromal cells preferentially engraft in mice; *Blood* 107(5):2153-2161
78. Lee RH, Kim B, Choi I, Kim H, Choi HS, Suh K et al. (2004); Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue; *Cell Physiol Biochem* 14(4-6):311-324
79. Leemans JC, Florquin S, Heikens M, Pals ST, van der NR, van der PT (2003); CD44 is a macrophage binding site for *Mycobacterium tuberculosis* that mediates macrophage recruitment and protective immunity against tuberculosis; *J Clin Invest* 111(5):681-689
80. Leo AJ, Grande DA (2006); Mesenchymal stem cells in tissue engineering; *Cells Tissues Organs* 183(3):112-122
81. Lesley J, Hascall VC, Tammi M, Hyman R (2000); Hyaluronan binding by cell surface CD44; *J Biol Chem* 275(35):26967-26975
82. Li C, Hampson IN, Hampson L, Kumar P, Bernabeu C, Kumar S (2000); CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor beta1 on human vascular endothelial cells; *FASEB J* 14(1):55-64

83. Liao S, Hida K, Park J, Li S (2004); Mechanical regulation of matrix reorganization and phenotype of smooth muscle cells and mesenchymal stem cells in 3D matrix; *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 7:5024-5027
84. Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, Radu A, Moseley AM, Deans R et al. (2000); Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep; *Nat Med* 6(11):1282-1286
85. Liu F, Malaval L, Gupta AK, Aubin JE (1994); Simultaneous detection of multiple bone-related mRNAs and protein expression during osteoblast differentiation: polymerase chain reaction and immunocytochemical studies at the single cell level; *Dev Biol* 166(1):220-234
86. Lodie TA, Blickarz CE, Devarakonda TJ, He C, Dash AB, Clarke J et al. (2002); Systematic analysis of reportedly distinct populations of multipotent bone marrow-derived stem cells reveals a lack of distinction; *Tissue Eng* 8(5):739-751
87. Lodish H, Berk A, Zipursky L, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. *Molekulare Zellbiologie*. 2001.
88. Lovell MJ, Mathur A (2004); The role of stem cells for treatment of cardiovascular disease; *Cell Prolif* 37(1):67-87
89. Lukashev ME, Werb Z (1998); ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour; *Trends Cell Biol* 8(11):437-441
90. Macville M, Veldman T, Padilla-Nash H, Wangsa D, O'Brien P, Schrock E et al. (1997); Spectral karyotyping, a 24-colour FISH technique for the identification of chromosomal rearrangements; *Histochem Cell Biol* 108(4-5):299-305
91. Madras N, Gibbs AL, Zhou Y, Zandstra PW, Aubin JE (2002); Modeling stem cell development by retrospective analysis of gene expression profiles in single progenitor-derived colonies; *Stem Cells* 20(3):230-240

92. Majumdar MK, Keane-Moore M, Buyaner D, Hardy WB, Moorman MA, McIntosh KR et al. (2003); Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells; *J Biomed Sci* 10(2):228-241
93. Malik Z, Dishi M, Garini Y (1996); Fourier transform multipixel spectroscopy and spectral imaging of protoporphyrin in single melanoma cells; *Photochem Photobiol* 63(5):608-614
94. Mareschi K, Ferrero I, Rustichelli D, Aschero S, Gammaitoni L, Aglietta M et al. (2006); Expansion of mesenchymal stem cells isolated from pediatric and adult donor bone marrow; *J Cell Biochem* 97(4):744-754
95. Matsuyama T, Yamada A, Kay J, Yamada KM, Akiyama SK, Schlossman SF et al. (1989); Activation of CD4 cells by fibronectin and anti-CD3 antibody. A synergistic effect mediated by the VLA-5 fibronectin receptor complex; *J Exp Med* 170(4):1133-1148
96. Mayer B, Jauch KW, Gunthert U, Figdor CG, Schildberg FW, Funke I et al. (1993); De-novo expression of CD44 and survival in gastric cancer; *Lancet* 342(8878):1019-1022
97. Mazo IB, Gutierrez-Ramos JC, Frenette PS, Hynes RO, Wagner DD, von Andrian UH (1998); Hematopoietic progenitor cell rolling in bone marrow microvessels: parallel contributions by endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule 1; *J Exp Med* 188(3):465-474
98. Mets T, Verdonk G (1981); In vitro aging of human bone marrow derived stromal cells; *Mech Ageing Dev* 16(1):81-89
99. Milstein C, Adetugbo K, Cowan NJ, Kohler G, Secher DS (1978); Expression of antibody genes in tissue culture: structural mutants and hybrid cells; *Natl Cancer Inst Monogr*(48):321-330
100. Minguell JJ, Erices A, Conget P (2001); Mesenchymal stem cells; *Exp Biol Med (Maywood)* 226(6):507-520

101. Musina RA, Bekchanova ES, Sukhikh GT (2005); Comparison of mesenchymal stem cells obtained from different human tissues; Bull Exp Biol Med 139(4):504-509
102. Narasimhan G, Sargios TN, Kalakuntla R, Homel P, Clain DJ, Theise ND et al. (2006); Treatment rates in patients with chronic hepatitis C after liver biopsy; J Viral Hepat 13(11):783-786
103. Nojima Y, Humphries MJ, Mould AP, Komoriya A, Yamada KM, Schlossman SF et al. (1990); VLA-4 mediates CD3-dependent CD4+ T cell activation via the CS1 alternatively spliced domain of fibronectin; J Exp Med 172(4):1185-1192
104. Noth U, Osyczka AM, Tuli R, Hickok NJ, Danielson KG, Tuan RS (2002); Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells; J Orthop Res 20(5):1060-1069
105. Osborn L, Vassallo C, Browning BG, Tizard R, Haskard DO, Benjamin CD et al. (1994); Arrangement of domains, and amino acid residues required for binding of vascular cell adhesion molecule-1 to its counter-receptor VLA-4 (alpha 4 beta 1); J Cell Biol 124(4):601-608
106. Otto WR, Rao J (2004); Tomorrow's skeleton staff: mesenchymal stem cells and the repair of bone and cartilage; Cell Prolif 37(1):97-110
107. Pan W, Petersen E, Cai N, Ma G, Run LJ, Feng Z et al. (2005); Viscoelastic properties of human mesenchymal stem cells; Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc 5:4854-4857
108. Pautke C, Schieker M, Tischer T, Kolk A, Neth P, Mutschler W et al. (2004); Characterization of osteosarcoma cell lines MG-63, Saos-2 and U-2 OS in comparison to human osteoblasts; Anticancer Res 24(6):3743-3748
109. Pautke C, Vogt S, Tischer T, Wexel G, Deppe H, Milz S et al. (2005); Polychrome labeling of bone with seven different fluorochromes: enhancing fluorochrome discrimination by spectral image analysis; Bone 37(4):441-445

110. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD et al. (1999); Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells; *Science* 284(5411):143-147
111. Prockop DJ (1997); Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues; *Science* 276(5309):71-74
112. Prockop DJ, Gregory CA, Spees JL (2003); One strategy for cell and gene therapy: harnessing the power of adult stem cells to repair tissues; *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 Suppl 1:11917-11923
113. Prockop DJ, Sekiya I, Colter DC (2001); Isolation and characterization of rapidly self-renewing stem cells from cultures of human marrow stromal cells; *Cytotherapy* 3(5):393-396
114. Pure E, Cuff CA (2001); A crucial role for CD44 in inflammation; *Trends Mol Med* 7(5):213-221
115. Raimondo S, Penna C, Pagliaro P, Geuna S (2006); Morphological characterization of GFP stably transfected adult mesenchymal bone marrow stem cells; *J Anat* 208(1):3-12
116. Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM (2001); Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells; *Blood* 98(9):2615-2625
117. Rice GE, Munro JM, Corless C, Bevilacqua MP (1991); Vascular and nonvascular expression of INCAM-110. A target for mononuclear leukocyte adhesion in normal and inflamed human tissues; *Am J Pathol* 138(2):385-393
118. Rifas L, Cheng SL (2003); IL-13 regulates vascular cell adhesion molecule-1 expression in human osteoblasts; *J Cell Biochem* 89(2):213-219
119. Rius C, Smith JD, Almendro N, Langa C, Botella LM, Marchuk DA et al. (1998); Cloning of the promoter region of human endoglin, the target gene for hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1; *Blood* 92(12):4677-4690
120. Roelen BA, Dijke P (2003); Controlling mesenchymal stem cell differentiation by TGF $\beta$  family members; *J Orthop Sci* 8(5):740-748

121. Romanov YA, Darevskaya AN, Merzlikina NV, Buravkova LB (2005); Mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue: isolation, characterization, and differentiation potentialities; *Bull Exp Biol Med* 140(1):138-143
122. Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN (2003); Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord; *Stem Cells* 21(1):105-110
123. Rothmann C, Bar-Am I, Malik Z (1998); Spectral imaging for quantitative histology and cytogenetics; *Histol Histopathol* 13(3):921-926
124. Roufosse CA, Direkze NC, Otto WR, Wright NA (2004); Circulating mesenchymal stem cells; *Int J Biochem Cell Biol* 36(4):585-597
125. Salomon DR, Crisa L, Mojcik CF, Ishii JK, Klier G, Shevach EM (1997); Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed by cortical thymic epithelial cells and mediates thymocyte adhesion. Implications for the function of alpha4beta1 (VLA4) integrin in T-cell development; *Blood* 89(7):2461-2471
126. Sammons J, Ahmed N, El-Sheemy M, Hassan HT (2004); The role of BMP-6, IL-6, and BMP-4 in mesenchymal stem cell-dependent bone development: effects on osteoblastic differentiation induced by parathyroid hormone and vitamin D(3); *Stem Cells Dev* 13(3):273-280
127. Sandberg M, Autio-Harmainen H, Vuorio E (1988); Localization of the expression of types I, III, and IV collagen, TGF-beta 1 and c-fos genes in developing human calvarial bones; *Dev Biol* 130(1):324-334
128. Schieker M, Pautke C, Reitz K, Hemraj I, Neth P, Mutschler W et al. (2004); The use of four-colour immunofluorescence techniques to identify mesenchymal stem cells; *J Anat* 204(2):133-139
129. Schmits R, Filmus J, Gerwin N, Senaldi G, Kiefer F, Kundig T et al. (1997); CD44 regulates hematopoietic progenitor distribution, granuloma formation, and tumorigenicity; *Blood* 90(6):2217-2233

130. Schrock E, Zscheschang P, O'Brien P, Helmrich A, Hardt T, Matthaei A et al. (2006); Spectral karyotyping of human, mouse, rat and ape chromosomes--applications for genetic diagnostics and research; *Cytogenet Genome Res* 114(3-4):199-221
131. Schwartz MA, Schaller MD, Ginsberg MH (1995); Integrins: emerging paradigms of signal transduction; *Annu Rev Cell Dev Biol* 11:549-599
132. Sreaton GR, Bell MV, Jackson DG, Cornelis FB, Gerth U, Bell JI (1992); Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons; *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(24):12160-12164
133. Sekiya I, Larson BL, Smith JR, Pochampally R, Cui JG, Prockop DJ (2002); Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality; *Stem Cells* 20(6):530-541
134. Sekiya I, Larson BL, Vuoristo JT, Cui JG, Prockop DJ (2004); Adipogenic differentiation of human adult stem cells from bone marrow stroma (MSCs); *J Bone Miner Res* 19(2):256-264
135. Sherman L, Wainwright D, Ponta H, Herrlich P (1998); A splice variant of CD44 expressed in the apical ectodermal ridge presents fibroblast growth factors to limb mesenchyme and is required for limb outgrowth; *Genes Dev* 12(7):1058-1071
136. Shi S, Gronthos S (2003); Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp; *J Bone Miner Res* 18(4):696-704
137. Shi S, Gronthos S, Chen S, Reddi A, Counter CM, Robey PG et al. (2002); Bone formation by human postnatal bone marrow stromal stem cells is enhanced by telomerase expression; *Nat Biotechnol* 20(6):587-591
138. Shimonishi M, Sato J, Takahashi N, Komatsu M (2005); Expression of type IV collagen and laminin at the interface between epithelial cells and fibroblasts from human periodontal ligament; *Eur J Oral Sci* 113(1):34-40

139. Shur I, Marom R, Lokiec F, Socher R, Benayahu D (2002); Identification of cultured progenitor cells from human marrow stroma; *J Cell Biochem* 87(1):51-57
140. Siggelkow H, Benzler K, Atkinson MJ, Hufner M (1998); The use of confluence stages does not decrease the overall variability in primary human osteoblasts but can give additional information on differentiation in vitro; *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 106(3):217-225
141. Silva WA, Jr., Covas DT, Panepucci RA, Proto-Siqueira R, Siufi JL, Zanette DL et al. (2003); The profile of gene expression of human marrow mesenchymal stem cells; *Stem Cells* 21(6):661-669
142. Smith JR, Pochampally R, Perry A, Hsu SC, Prockop DJ (2004); Isolation of a highly clonogenic and multipotential subfraction of adult stem cells from bone marrow stroma; *Stem Cells* 22(5):823-831
143. Temple S (2001); The development of neural stem cells; *Nature* 414(6859):112-117
144. Tondreau T, Meuleman N, Delforge A, Dejeneffe M, Leroy R, Massy M et al. (2005); Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity; *Stem Cells* 23(8):1105-1112
145. Tsurui H, Nishimura H, Hattori S, Hirose S, Okumura K, Shirai T (2000); Seven-color fluorescence imaging of tissue samples based on Fourier spectroscopy and singular value decomposition; *J Histochem Cytochem* 48(5):653-662
146. Tuan RS, Boland G, Tuli R (2003); Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering; *Arthritis Res Ther* 5(1):32-45
147. Tuli R, Tuli S, Nandi S, Wang ML, Alexander PG, Haleem-Smith H et al. (2003); Characterization of multipotential mesenchymal progenitor cells derived from human trabecular bone; *Stem Cells* 21(6):681-693



148. Vacanti CA, Langer R, Schloo B, Vacanti JP (1991); Synthetic polymers seeded with chondrocytes provide a template for new cartilage formation; *Plast Reconstr Surg* 88(5):753-759
149. van RN, Voskuil M, Hofer I, Jost M, de GS, Hedwig F et al. (2004); CD44 regulates arteriogenesis in mice and is differentially expressed in patients with poor and good collateralization; *Circulation* 109(13):1647-1652
150. Varner JA, Cheresch DA (1996); Integrins and cancer; *Curr Opin Cell Biol* 8(5):724-730
151. Vogel W, Grunebach F, Messam CA, Kanz L, Brugger W, Buhning HJ (2003); Heterogeneity among human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and neural progenitor cells; *Haematologica* 88(2):126-133
152. Wahlby C, Erlandsson F, Bengtsson E, Zetterberg A (2002); Sequential immunofluorescence staining and image analysis for detection of large numbers of antigens in individual cell nuclei; *Cytometry* 47(1):32-41
153. Weber GF, Ashkar S, Glimcher MJ, Cantor H (1996); Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1); *Science* 271(5248):509-512
154. Yoshimura H, Muneta T, Nimura A, Yokoyama A, Koga H, Sekiya I (2007); Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle; *Cell Tissue Res* 327(3):449-462
155. Yurchenco PD, Ruben GC (1987); Basement membrane structure in situ: evidence for lateral associations in the type IV collagen network; *J Cell Biol* 105(6 Pt 1):2559-2568
156. Zhou Z, Jiang EL, Wang M, Liu QG, Zhai WJ, Huang Y et al. (2005); [Comparative study on various subpopulations in mesenchymal stem cells of adult bone marrow]; *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 13(1):54-58
157. Zhu H, Mitsuhashi N, Klein A, Barsky LW, Weinberg K, Barr ML et al. (2006); The role of the hyaluronan receptor CD44 in mesenchymal stem cell migration in the extracellular matrix; *Stem Cells* 24(4):928-935

158. Zohar R, Sodek J, McCulloch CA (1997); Characterization of stromal progenitor cells enriched by flow cytometry; Blood 90(9):3471-3481

## 7.1. Anhang

### Protokoll 1 : Immunfluoreszenzfärbung

#### Aceton/Formalin Fixierung:

- Glasobjektträger (GOT) 2 min in PBS waschen
- 2 min in 3,7% gepuffertem Formalin bei RT waschen
- erneut 2 min in PBS waschen
- 3 min in -20°C Aceton fixieren, dann GOT trocknen lassen
- mit Fettstift 8 Felder abtrennen (siehe Abb. 2); GOT beschriften

#### Phalloidinfärbung:

- 25µl Antikörper-Lösung pro Feld auftragen
- 20 min bei RT in abgedunkelter Feuchtkammer inkubieren

#### Blocken:

- in PBS mit 1% Tween20 (PBS-T) rehydrieren, dann gut abklopfen
- 25µl Blockierungslösung (donkey Serum mit PBS 1:20)
- 1h mit bei RT in Feuchtkammer inkubieren

#### Primärantikörper:

- Blockierungslösung abklopfen
- 25µl Antikörper-Lösung pro Feld auftragen
- 30 min bei RT in abgedunkelter Feuchtkammer inkubieren
- 3 mal 5 min in PBS-T waschen

#### Sekundärantikörper:

- Blockierungslösung abklopfen
- 25µl Antikörper-Lösung pro Feld
- 30 min bei RT in abgedunkelter Feuchtkammer inkubieren
- 3 mal 5 min in PBS-T waschen

#### Kernfärbung:

- 20 µl DAPI (Verdünnung 1:10 000) pro Feld auftragen
- 1 min bei RT in Feuchtkammer im Dunkeln inkubieren

- 3 mal 5 min in PBS-T waschen

Eindeckeln:

- Pro Long Komponente B im Wasserbad oder Heizblock für 15 min auf 50°C erhitzen
- Komponente A und B mischen
- weitgehend die Flüssigkeit von den GOT abklopfen
- 70µl Eindeckelmedium pro GOT auftragen und gleichmäßig verteilen
- Deckgläschen aufbringen und die Luftblasen durch seitliches Ausstreichen entfernen, anschließend mind. 3 h im Dunkeln bei 4°C aushärten

Protokoll 2: Passageprotokoll hMSC

- Medium entfernen, Zellen waschen mit 3 ml PBS (ohne Ca, Mg, Fa. GibcoBRL)
- Zellen abtrypsinieren mit 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung (Fa. BioWhittaker)
- mikroskopische Kontrolle nach 5 min, max. 15 min Einwirkzeit des Trypsin/EDTA
- Zugabe von 3 ml Medium, nachdem Zellen gleichmäßig abgelöst waren; das Serum des Kulturmediums bewirkte die Neutralisierung des Trypsins
- Suspension zentrifugieren (600 g für 5 min), Überstand anschließend absaugen, um Trypsinreste zu entfernen
- Zellen in Kulturmedium resuspendieren und zählen.

Protokoll 3: Passageprotokoll hOB

- Medium entfernen, Zellen waschen mit 3 ml Hepes BSS (Fa. PromoCell)
- Zellen abtrypsinieren mit 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung (Fa. PromoCell)
- nach 3 min mikroskopische Kontrolle, max. 7 min Einwirkzeit des Trypsin/EDTA
- Zugabe von 2 ml Trypsin Neutralis Solution (Fa. PromoCell), nachdem Zellen homogen abgelöst waren
- Suspension zentrifugieren (220 g für 4 min), Überstand anschließend absaugen, um Trypsinreste zu entfernen
- Zellen in Medium resuspendieren und zählen.

Protokoll 4: Passageprotokoll HS27

- Medium entfernen, Zellen waschen mit 3 ml PBS (ohne Ca, Mg, Fa. GibcoBRL)
- Zellen abtrypsinieren mit 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung (Fa. BioWhittaker)

- mikroskopische Kontrolle nach 5 min, max. 15 min Einwirkzeit des Trypsin/EDTA
- Zugabe von 3 ml Medium, nachdem Zellen gleichmäßig abgelöst waren; das Serum des Kulturmediums bewirkte die Neutralisierung des Trypsins
- Suspension zentrifugieren (600 g für 5 min), Überstand anschließend absaugen, um Trypsinreste zu entfernen
- Zellen in Kulturmedium resuspendieren und zählen

#### Protokoll 5: Zellzählung

- Zufügen von Trypanblau zur Zellsuspension (z.B. Verhältnis Zellsuspension:Trypanblau 2:1)
- Zählkammer und Deckglas gründlich mit 70 %igem Ethanol reinigen
- Anfeuchten des Deckglases durch Anhauchen und auf die Zählkammer pressen, so dass Newton'sche Ringe sichtbar werden
- 10µl mit der Pipette aufziehen und an der Kante der Zählkammer aufsetzen. Zellsuspension durch die Kapillarkräfte zwischen Deckglas und Kammer saugen lassen
- Unter dem Mikroskop Auszählen der vier äußeren Großquadranten (je 16 Felder). Nur blau angefärbte Zellen zählen. Bei auf den Rändern liegenden Zellen, nur oberen und linken Rand berücksichtigen
- Zellzahl pro ml nach Formel  $Zellzahl = n \times 10^4 \times F$  ausrechnen. (Bei einer Verdünnung Zellsuspension: Trypanblau 2:1 z.B.  $F=1,5$ )

## 7.2. Abkürzungsverzeichnis

AMCA	amino-methylcyclohexane-carboxylic acid
BMSSC	bone marrow stromal cells
BP	Bandpass
CD	Cluster of Differentiation
CFU-F	colony forming unit-fibroblasts
Col IV	Kollagen IV
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	fluorescence activated cell sorting
FBS	fetales bovines Serum
FGF	fibroblast growth factor
FISH	fluorescence in situ hybridisation
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
GOT	Glasobjektträger
hMSC	Humane mesenchymale Stammzellen
hOB	Humane Osteoblasten
ISCT	International Society for Cellular Therapy
LP	Longpass
MAPC	multipotent adult progenitor cells
MSC	marrow stromal cells
MSC	Mesenchymal stem cells
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaktion
RNA	ribonucleic acid
RT	Raumtemperatur
qRT-PCR	quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaktion
SPC	stromal precursor cells
TBP	Triplebandpass
TGF $\beta$	transforming growth factor beta
VCAM-1	vascular adhesion molecule-1

### **7.3. Danksagung**

Meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. Wolf Mutschler, möchte ich für die Vergabe des Themas sowie seine stets freundliche und großzügige Unterstützung und Förderung herzlich danken.

Besonders meinem Doktorarbeitsbetreuer, Herrn Dr. Matthias Schieker, möchte ich für das Heranführen an das wissenschaftliche Arbeiten und das umfangreiche Gebiet des Tissue Engineerings sehr danken. Durch seine ständigen Beiträge und zahlreichen konstruktiven Anregungen wurde diese Arbeit erst ermöglicht.

Desweiteren möchte ich mich neben allen ständig hilfsbereiten Mitarbeitern des Chirurgischen Forschungslabors für Tissue Engineering und Regenerative Medizin im Besonderen bei Herrn Dr. Dr. Christoph Pautke für seine freundschaftliche Anleitung und Hilfestellung bedanken.

Herrn Professor Dr. Reinhard Putz und Herrn Professor Dr. Stefan Milz danke ich für die große Unterstützung und für die gute Zusammenarbeit von Seiten der Anatomischen Anstalt

Außerdem gilt mein besonderer Dank meiner Freundin Judith Reisner für ihre unermüdliche Geduld und meiner Familie für die immerwährende Unterstützung und ständige Motivation.

## 7.4. Curriculum vitae

### Persönliche Daten

---

Name	Florian Jörg Haasters
Geburtsdatum	21. Oktober 1978
Geburtsort	Essen
Nationalität	Deutsch

### Schulbildung

---

1985 - 1989	Hüholz Grundschule, Kappeln/Schlei
1989 - 1998	Klaus-Harms-Gymnasium, Kappeln/Schlei

### Hochschulbildung

---

1999 - 2002	Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg Vorklinischer Studienabschnitt
2002 - 2004	Technische Universität, München Klinischer Studienabschnitt
2004 - 2005	Ludwig-Maximilians-Universität, München Praktisches Jahr Chirurgische Klinik und Poliklinik – Innenstadt, LMU München Tertial Chirurgie Medizinische Poliklinik, Klinikum Innenstadt, LMU München School of Medicine & Health Science, Wellington, New Zealand Tertial Innere Medizin Universitätskinderspital Basel, Schweiz Universitätsspital Basel, Schweiz Tertial Orthopädie

### Klinische Tätigkeit

---

seit 01/2006	Assistenzarzt Chirurgische Klinik und Poliklinik - Innenstadt, Ludwig-Maximilians Universität München
--------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------



**Wissenschaftliche Tätigkeit**

---

seit 2003                    experimentelle Forschung Arbeitsgruppe Tissue Engineering  
Knochen ([www.agtek.de](http://www.agtek.de))  
Chirurgisches Forschungslabor für Regenerative Medizin und  
Tissue Engineering, Chirurgische Klinik und Poliklinik - Innen-  
stadt, LMU München

## 7.5. Publikationen

### Originalarbeiten:

Schieker M, Pautke C, Haasters F, Schieker J, Docheva D, Bocker W, Guelkan H, Neth P, Jochum M, Mutschler W.

*Human mesenchymal stem cells at the single-cell level: simultaneous seven-colour immunofluorescence.*

J Anat. 2007 May;210(5):592-9.

Böcker W, Yin Z, Drosse I, Docheva D, Rossmann O, Haasters F, Wierer M, Popov C, Locher M, Mutschler W, Schieker M

*Human mesenchymal stem cell line expressing hTERT after lentiviral gene transfer*  
Journal of Cellular and Molecular Medicine, in revision

Schieker M, Wierer M, Haasters F, Ern C, Shakibaei M, Docheva D, Mutschler W  
*Identification and differentiation of highly proliferating single human mesenchymal stem cells for tissue engineering applications*

Submitted

Docheva D, Haasters F, Schieker M

*Human mesenchymal stem cells and their surface receptors*

Curr Rheum Rev., Review, in progress

### Zitierfähige Abstracts:

Haasters F, Pautke C, Docheva D, Krump-Konvalinkova V, Ern K, Mutschler W, Schieker M

*Differenzierung zwischen humanen mesenchymalen Stammzellen, Osteoblasten und Fibroblasten mittels simultaner Mehrfachfluoreszenz auf Einzellzellniveau*

Vortrag: 2. Gemeinsamer Kongress Orthopädie – Unfallchirurgie

Berlin, 02.- 06. Oktober 2006

Haasters F, Wierer M, Pautke C, Gülkan H, Schieker J, Milz S, Mutschler W, Schieker M

*Charakterisierung einer Stammzell-Subpopulation auf Einzelzellniveau mittels Mehrfachfluoreszenz*

Vortrag: 1. Gemeinsamer Kongress Orthopädie – Unfallchirurgie  
Berlin, 19.- 22. Oktober 2005

Wierer M, Haasters F, Gülkan H, Ern K, Schieker J, Mutschler W, Schieker M

*Differenzierung von Stammzellen ausgehend von Einzelzellen*

Vortrag: 1. Gemeinsamer Kongress Orthopädie – Unfallchirurgie  
Berlin, 19.- 22. Oktober 2005

Wierer M, Haasters F, Ern C, Gülkan H, Schieker J, Milz S, Mutschler W, Schieker M

*Differentiation of single mesenchymal stem cells in three mesenchymal lineages*

Vortrag: 4<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Tissue Engineering Society (ETES)  
München, 31. August - 03. Sept. 2005

Schieker M, Haasters F, Pautke C, Gülkan H, Neth P, Milz S, Mutschler W

*Immunohistochemical characterisation of rapid-self renewing human mesenchymal stem cells in single cell culture*

Vortrag: International Conference of Strategies in tissue engineering, Würzburg, 17. – 19. Juni 2004

Pautke C, Haasters F, Neth P, Milz S, Mutschler W, Schieker M

*Charakterisierung von mesenchymalen Stammzellen durch 4-fach Fluoreszenz*

Vortrag: 54. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Aachen, 02. – 05. Juni 2004

Schieker M, Reitz K, Pautke C, Haasters F, Gülkan H, Neth P, Mutschler W, Milz S

*Four-color immunofluorescence of human mesenchymal stem cells*

Vortrag: 2<sup>nd</sup> International Meeting of the Stem Cell Network North Rhine Westphalia,  
Bonn, 01. - 02. April 2004

Pautke C, Haasters F, Reitz K, Neth P, Milz S, Mutschler W, Schieker M

Charakterisierung humaner mesenchymaler Stammzellen mittels Vierfachfluoreszenz auf einer Zelle

Vortrag: XXVI. Münchner Symposion für experimentelle Orthopädie, Orthopädische Klinik und Poliklinik - Großhadern , 6. / 7. Februar 2004

Haasters F, Pautke C, Gülkan H, Neth P, Jochum M, Milz S, Mutschler W, Schieker M

Charakterisierung von schnell-teilenden humanen mesenchymalen Stammzellen auf Einzelzellniveau

Vortrag: XXVI. Münchner Symposion für experimentelle Orthopädie, Orthopädische Klinik und Poliklinik - Großhadern, 6. / 7. Februar 2004

Haasters F, Pautke C

*Charakterisierung von humanen mesenchymalen Stammzellen durch immunhistochemische Vielfachfärbung*

Vortrag: Wissenschaftliches Kolloquium, Chirurgische Klinik und Poliklinik – Innenstadt, LMU München, 08.12.2003

Haasters F, Hemraj I, Guelkan H, Neth P, Hoelters J, Mutschler W, Schieker M

*Morphological characterization of human mesenchymal stem cells at the single cell level*

Vortrag: 2<sup>nd</sup> Annual Meeting of the European Tissue Engineering Society (ETES), Genua, 3.-6. September 2003