

Kultivierung und Differenzierung adulter Stammzellen und anderer Vorläuferzellen auf biomodifizierten Oberflächen

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES*

2010

vorgelegt von: **Diplom - Biologin Claudia Brose**

geb. am 09.11.1977 in Templin

Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg, Saar

Diese Arbeit wurde im Labor von Herrn Professor Günter R. Fuhr im Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik, Universität des Saarlandes, im Zeitraum von Oktober 2005 bis April 2009 unter der Betreuung von Herrn Professor Hagen von Briesen angefertigt.

Tag der Promotion: 28.01.2011
Dekan: Prof. Dr. M. D. Menger
Berichterstatter: Prof. Dr. G. R. Fuhr
Prof. Dr. A. Meyerhans

Inhaltsverzeichnis

<u>INHALTSVERZEICHNIS</u>	
<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	
<u>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</u>	
<u>1 EINLEITUNG</u>	1
1.1 <u>REGENERATIVE MEDIZIN UND TISSUE ENGINEERING</u>	1
1.2 <u>MONOZYTEN</u>	4
1.3 <u>STAMMZELLEN</u>	6
1.3.1 <u>Embryonale Stammzellen</u>	8
1.3.2 <u>Adulte Stammzellen</u>	9
1.3.3 <u>Entwicklung und Differenzierung von Zelltypen aus den Keimblättern der embryonalen Entwicklung</u>	15
1.4 <u>BIOMATERIALIEN IN DER REGENERATIVEN MEDIZIN</u>	20
1.4.1 <u>Biomodifizierte Oberflächen</u>	21
1.4.2 <u>Automatisierung und Miniaturisierung in der Zellkultur</u>	27
1.4.3 <u>Strukturierte Oberflächen</u>	28
1.5 <u>ZIELSETZUNGEN DER ARBEIT</u>	29
<u>2 MATERIAL UND METHODEN</u>	34
2.1 <u>MATERIALIEN</u>	34
2.1.1 <u>Geräte</u>	34
2.1.2 <u>Verbrauchsmaterial</u>	35
2.1.3 <u>Chemikalien</u>	36
2.1.4 <u>Antikörper</u>	38
2.1.5 <u>Wachstumsfaktoren</u>	39
2.1.6 <u>Primärzellen und Zelllinien</u>	39
2.1.7 <u>Medien und Medienzusätze</u>	41
2.1.8 <u>Zellkulturmedien</u>	42
2.1.9 <u>Immunhistochemie</u>	43
2.2 <u>ZELLBIOLOGISCHE METHODEN</u>	44
2.2.1 <u>Isolierung peripherer Blutzellen</u>	44
2.2.2 <u>In-Vitro-Differenzierung von mononukleären Zellen</u>	46
2.2.3 <u>Zellkultur der Glandulären Stammzellen (GSCs)</u>	47
2.2.4 <u>In Vitro-Differenzierung der GSCs</u>	48

2.3	<u>ANALYTISCHE METHODEN</u>	50
2.3.1	<u>Ermittlung der spezifischen Wachstumsrate</u>	50
2.3.2	<u>Immunzyto- und histochemische Methoden</u>	50
2.3.3	<u>Anfertigen von Gefrierschnitten</u>	54
2.3.4	<u>Durchflusszytometrie</u>	54
2.3.5	<u>Methoden zur Ermittlung der Proliferation und Zytotoxizität</u>	55
2.3.6	<u>Rasterelektronenmikroskopie</u>	59
2.4	<u>METHODEN ZUM BIOMODIFIZIEREN VON OBERFLÄCHEN</u>	60
2.4.1	<u>Kovalente Kopplung</u>	61
2.4.2	<u>Adsorptive Kopplung</u>	62
2.4.3	<u>Affinitätsbindung</u>	62
2.5	<u>ÜBERPRÜFUNG DER KOPPLUNGSSTABILITÄT</u>	63
2.5.1	<u>Protein-ELISA</u>	63
2.5.2	<u>Überstandstransfer-Assay</u>	64
2.6	<u>KONDITIONIERUNG DES MEDIUMS DURCH ZELLAKTIVITÄT</u>	65
2.6.1	<u>Transwell-Assay</u>	65
2.6.2	<u>Überstandstransfer-Assay</u>	66
3	<u>ERGEBNISSE</u>	67
3.1	<u>MAKROPHAGEN</u>	67
3.1.1	<u>Isolierung, Kultivierung und Differenzierung von Monozyten in Makrophagen mittels löslicher Faktoren</u>	67
3.1.2	<u>Kultivierung und Differenzierung von Makrophagen auf Oberflächen mittels löslichem Wachstumsfaktor</u>	68
3.1.3	<u>Differenzierung von Makrophagen auf Oberflächen mit immobilisiertem Wachstumsfaktor</u>	70
3.2	<u>ADULTE STAMMZELLEN AUS EXOKRINEM DRÜSENGEWEBE DER MAUS UND DES MENSCHEN (GLANDULÄRE STAMMZELLEN - GSCs)</u>	71
3.2.1	<u>Charakterisieren der humanen und murinen GSCs</u>	71
3.2.2	<u>Kultivierung und gezielte Differenzierung der GSCs mittels löslicher Wachstumsfaktoren</u>	74
3.3	<u>AUSWAHL GEEIGNETER OBERFLÄCHEN UND STRATEGIEN ZUR IMMOBILISIERUNG VON WACHSTUMSFAKTOREN FÜR DIE GEZIELTE ZELLDIFFERENZIERUNG</u>	81
3.3.1	<u>Oberflächen</u>	81
3.3.2	<u>Zytotoxizität der Oberflächen</u>	82
3.3.3	<u>Zytotoxizität der Substrate mit immobilisierten Wachstumsfaktoren</u>	87
3.4	<u>STABILITÄT DER IMMOBILISIERTEN WACHSTUMSFAKTOREN</u>	89
3.5	<u>DIFFERENZIERUNG DER GSCs MITTELS IMMOBILISierter WACHSTUMSFAKTOREN AUF UNTERSCHIEDLICH MODIFIZIERTEN OBERFLÄCHEN</u>	92
3.5.1	<u>Adipogene Differenzierung</u>	92
3.5.2	<u>Osteogene Differenzierung</u>	94
3.6	<u>KULTIVIERUNG UND DIFFERENZIERUNG HUMANER VORLÄUFERZELLEN SOWIE HUMANER UND MURINER ADULTER STAMMZELLEN IN EINEM MINIATURISIERTEN KULTURSYSTEM</u>	107

3.7	<u>KULTIVIERUNG UND DIFFERENZIERUNG DER MAKROPHAGEN UND GSCs AUF NANOSTRUKTURIERTEN OBERFLÄCHEN</u>	111
4	<u>DISKUSSION</u>	113
4.1	<u>SUBSTRATE UND KOPPLUNG DER WACHSTUMSFAKTOREN</u>	116
4.2	<u>DIFFERENZIERUNG VON MONOZYTEN ZU MAKROPHAGEN MITTELS GELÖSTEM UND IMMOBILISIERTEM WACHSTUMSFAKTOR</u>	121
4.3	<u>DIFFERENZIERUNGSPOTENTIAL DER HUMANEN UND MURINEN GLANDULÄREN STAMMZELLEN (GSCs)</u>	122
4.3.1	<i>Gezielte Differenzierung der humanen und murinen GSCs mittels gelöster Wachstumsfaktoren</i>	122
4.3.2	<i>Immobilisierte Wachstumsfaktoren induzieren die gezielte Differenzierung von humanen und murinen GSCs</i>	127
4.4	<u>AUTOMATISIERUNG UND MINIATURISIERUNG VON PROZESSEN ZUR ZELLKULTIVIERUNG UND ZELLDIFFERENZIERUNG</u>	134
5	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	137
6	<u>SUMMARY</u>	139
7	<u>LITERATUR</u>	141
8	<u>ANHANG</u>	165
	<u>VERÖFFENTLICHTE ARBEITEN</u>	178
	<u>ARTIKEL IN FACHZEITSCHRIFTEN</u>	178
	<u>POSTERBEITRÄGE</u>	178
	<u>ERKLÄRUNG</u>	179
	<u>DANKSAGUNG</u>	180
9	<u>LEBENS LAUF</u>	181

Abkürzungsverzeichnis

ALP	Alkalische Phosphatase
APTES	3-Aminopropyltriethoxysilan
BMP-2	Bone morphogenic Protein-2
BSA	Rinderserumalbumin
CD	Cluster of Differentiation
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindole
DCs	Dendritische Zellen
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EB	Embryoid Body (Embryoidkörper)
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
FCS	Fetal Calf Serum (Fötales Kälberserum)
g	Erdbeschleunigung
GDF-5	Growth Differentiation Factor-5
G-MCSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
GSCs	Glanduläre Stammzellen (Glandulary Stem Cells)
h	Stunde
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
ICM	Inner Cell Mass (Innere Zellmasse)
IGF-1	Insulin-like Growth Factor-1
kb	Kilobase (=1000 Basenpaare)
LDH	Lactatdehydrogenase
LIF	leukemia inhibitory factor
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
m	Milli

M	Molar
MAX.1	Carboxypeptidase M
M-CSF	Macrophage Colony Stimulating Factor
min	Minute
Mio	Million (1×10^6)
n	Nano
NAOH	Natronlauge
NHS	N-hydroxysuccinimid
Nm	Nanometer
OB	Organoid Body
OD	Optische Dichte
P	Phosphat
PBMCs	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PD	Populationsverdopplung
PDITC	Phenyldiisothiocyanat
PEG	Polyethylenglycol
PET	Polyethylenterephthalat
pH	Potentium Hydrogenii
PLA	Polylactatsäure, Polymilchsäure
PMMA	Polymethylmethacrylat
PPO	Polypropylenoxid
PS	Polystyren
PSCs	Glanduläre Stammzellen des Pankreas (Pancreatic Stem Cells)
PTFE	Polytetrafluoroethylen
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Revolutions Per Minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
S	Sekunde
SGSCs	Glanduläre Stammzellen der Speicheldrüse (Salivary Gland Stem Cells)
TGF β -3	Transforming Growthfactor-3
U	Unit

Vf Vervielfachung

1 Einleitung

1.1 Regenerative Medizin und Tissue Engineering

Die Regenerative Medizin ist bestrebt, neue und effiziente Therapieformen für den Ersatz von Geweben und Organen zu entwickeln. Ziel ist es, das Potential innovativer Ansätze zur Herstellung von spezialisierten Zellen und Zellverbänden zu ermitteln, um sie anschließend bei der Wiederherstellung von Geweben und Organen, die aufgrund von Krankheiten, Verletzungen oder Alterungsprozessen zerstört oder in ihrer Funktion eingeschränkt sind, einzusetzen. Die erfolgreiche Anwendung solcher Therapieansätze stellt jedoch für viele Gewebe aufgrund ihrer Komplexität auch weiterhin eine wissenschaftliche Herausforderung dar. Die enorme Vielfalt an Signalfaktoren und unterschiedlichen Zelltypen im Organismus, die für die Entwicklung und den Erhalt von Geweben und Organen sowie deren Rekonstruktion unabdingbar sind, gestaltet Regenerierungsprozesse sehr komplex. Weiterhin ist die Integration von Gewebeverbänden oder bereits ausdifferenzierten Zellen in die geschädigte Architektur oft schwierig. Aus diesem Grund müssen Stammzellen und andere Vorläuferzellen durch die gezielte Andifferenzierung auf die Integration in das Gewebe bei Regenerationsbedarf vorbereitet werden. Diese Aspekte sind nicht nur bei neurodegenerativen Erkrankungen zu finden, sondern spielen auch beim Gewebeersatz von Knochen, Knorpel sowie auch von Organen wie Herz, Haut oder Leber eine wichtige Rolle. Die Erkenntnisse auf dem Gebiet der Stammzellbiologie lassen Möglichkeiten zu, Therapieformen für die erfolgreiche Behandlung vieler dieser Krankheiten zu entwickeln.

Durch ihr hohes Wachstums- und Differenzierungspotential sind Stammzellen besonders hinsichtlich der Rekonstruktion von Geweben und Organen für das Tissue Engineering geeignet [Rahaman et al., 2005; Bianco et al., 2001]. Stammzellen haben die Fähigkeit in verschiedenste Zelltypen der ca. 220 körpereigenen Zelltypen zu differenzieren und verfügen darüber hinaus über das Potential zur Selbsterneuerung [Colter et al., 2001; Prockop et al., 2001]. Neben embryonalen Stammzellen [Thomson et al., 1998; Evans und Kaufmann, 1981], die auf Grund ihrer Gewinnung strengen ethischen Kontrollen unterworfen sind, stehen vor allem adulte Stammzellen im Fokus der wissenschaftlichen Arbeit zur Regenerierung von

Gewebe [Conrad et al., 2005]. Für die Geweberekonstruktion ist die Zelldifferenzierung Grundvoraussetzung, die durch zahlreiche Induktoren wie Wachstumsfaktoren, Zytokine, Proteine und Hormone geprägt ist [Metcalf und Ferguson, 2005].

Um dem enormen Bedarf an biologischem Material gerecht zu werden, muss eine hohe Anzahl an kultivierten und differenzierten Zellen für die Regenerationsmedizin bereitgestellt werden. Das Tissue Engineering [Vacanti et al., 1999; Langer et al., 1993] hat dabei das Potential und die Kapazität diesem Bedarf an Zellmaterial gerecht zu werden. Sicherlich muss in diesem Zusammenhang dennoch die Frage der Effizienz gestellt und sehr differenziert bei den verschiedenen Verfahren und Produkten diskutiert werden. Zurzeit wird an der Optimierung der Effizienz verschiedener Methodenansätze, welche vor allem durch die verstärkte Automatisierung gekennzeichnet sind, gearbeitet. Die zur Transplantation vorgesehenen Zellen und Gewebe werden zukünftig größtenteils von Robotersystemen standardisiert kultiviert und getestet [Falkner und Wild, 2008]. Individuelle Variationen in der Zellkulturtechnik können zudem Einfluss auf die Proliferation, Potenz und Differenzierung von Stammzellen haben. Um für die Regeneration von Geweben und Organen Zellen mit gleich bleibender Qualität herstellen zu können, bedarf es dieser zuverlässigen Standardisierung in der Zellkultivierung und Zelldifferenzierung. Die Immobilisierung von Wachstumsfaktoren und anderen Signalmolekülen an biokompatible Oberflächen schafft dabei die Möglichkeit, Zellen unter definierten Bedingungen in ähnlicher Medienzusammensetzung zu kultivieren. Die Nachbildung der natürlichen, zellulären Mikroumgebung von Stammzellen kann zudem auch durch die Kopplung von Signalfaktoren realisiert werden. Insbesondere das Gestalten der immobilisierten Wachstumsfaktoren in Form von Gradienten und Konzentrationsreihen auf geeignete Trägermaterialien bietet die Möglichkeit, die physiologische Umgebung von Stammzellen nachzuahmen. So befinden sich Stammzellen im Körper in einer speziellen Nischenumgebung, deren Milieu die Differenzierung der Stammzellen verhindert und somit für den Erhalt der charakteristischen Stammzeleigenschaften sorgt [Berger et al., 2008; da Silva Meirelles et al., 2008; Quesenberry und Aliotta, 2008]. Durch spezifische, exogene Reize regt diese Mikroumgebung im Gegenzug jedoch auch die Differenzierung der Stammzellen an [Scadden, 2006]. Weiterhin kann das Verhalten von Stammzellen in

diesen nachgebildeten Nischenumgebungen studiert werden und bietet somit die Chance, weiterführende Erkenntnisse in der Stammzellbiologie zu gewinnen.

1.2 Monozyten

Monozyten sind weiße Blutkörperchen von 12 bis 20 µm Durchmesser mit einem großen, nicht segmentierten und meist gelappten Kern. Sie stammen von Stammzellen ab und entstehen im Knochenmark über mehrere Zwischenstufen aus myeloischen Vorläuferzellen [Johnston, 1988]. Die Stammzelle produziert einen Monoblasten, der die erste Differenzierung darstellt. Der Monoblast reift schnell zum Promonoblasten heran, der dann zum ausgewachsenen Monozyten wird (Abbildung 1). Im Blut zirkulieren die Monozyten durchschnittlich drei Tage [Whitelaw, 1972] bevor sie, durch Chemokine angelockt, in verschiedene Organe und Gewebe wandern und sich dort zu Makrophagen und anderen spezialisierten Phagozyten ausdifferenzieren, die eine wichtige Rolle bei der angeborenen Immunität spielen (u.a. Phagozytose, Entzündungsbekämpfung, Tumorzerstörung). Die durch Phagozytose aufgenommenen Zellen, Bakterien und Pilze können im Zuge der erworbenen Immunität von Monozyten über ihre MHC-II Moleküle (Haupt-Histokompatibilitätskomplex-II) als Fremddantigene anderen Abwehrzellen präsentiert werden. Die Erkennung potenziell schädlicher Substanzen wird durch die Oberflächenrezeptoren für Immunglobuline und Komplementfaktoren erleichtert. Außerdem bilden sie zytotoxische Enzyme sowie Zytokine, die andere Immunzellen beeinflussen und so eine spezifische Immunreaktion aufrechterhalten und beenden können.

Abhängig von der Zusammensetzung des Kultivierungsmediums, in dem die Monozyten gehalten werden, können sie sich neben Makrophagen auch in Dendritische Zellen (DCs) entwickeln [Crawford, 1999; Yang, 1999; Czerniecki, 1997; Zhou, 1996]. In M-CSF (=CSF-1, *macrophages colony-stimulating factor*) inkubierte Monozyten differenzieren zu Makrophagen [Hashimoto, 1997; Murakami et al., 1996; Kreutz et al., 1992; Brugger et al., 1991], wohingegen die Anwesenheit von GM-CSF (*granulocytes macrophages colonic stimulating factor*) und IL-4 (*Interleukin-4*) die Reifung zu DCs bewirkt [Novak, 2001; Kreutz et al., 1999]. Neben Makrophagen und DCs lassen sich auch endothelähnliche Zellen aus Monozyten ableiten [Havemann, 2003].

Die Makrophagen („Fresszellen“) reifen kontinuierlich aus zirkulierenden Monozyten heran, welche den Blutkreislauf verlassen und im gesamten Körper in die Gewebe

einwandern. In besonders großer Zahl findet man sie im Bindegewebe, im Verdauungstrakt, sowie in Lunge, Leber und Milz. Ruhende Makrophagen exprimieren wenig oder keine MHC-II und B7-Moleküle (CD80 und CD86, Cluster of Differentiation), deren Bildung erst durch die Aufnahme von Mikroorganismen ausgelöst wird. Aufgenommene Fremdantigene werden in Endosomen und Lysosomen abgebaut und deren Peptide auf dem MHC-II-Molekül präsentiert [Janeway, 2002].

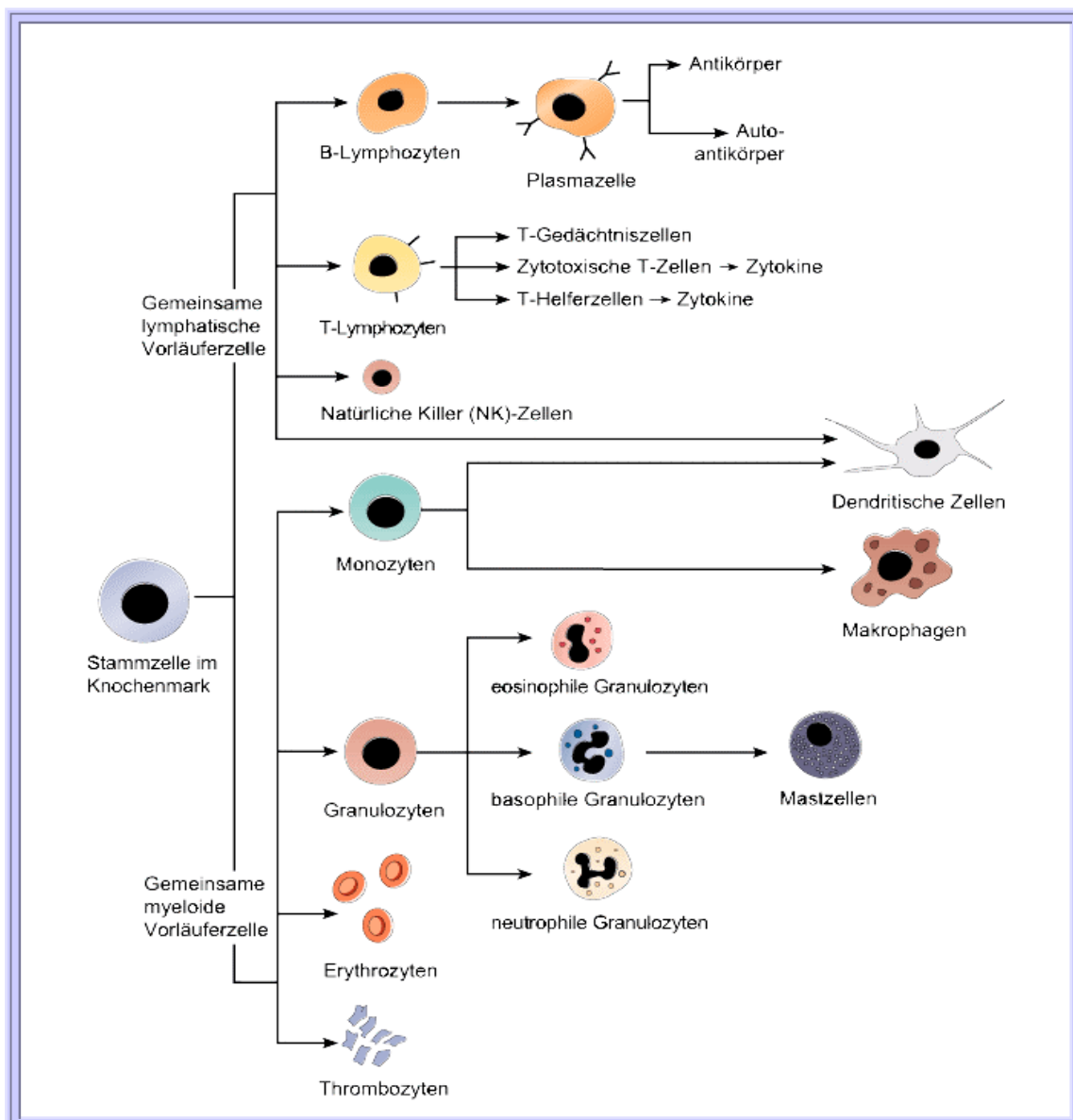


Abbildung 1: Blutzellen entstehen aus pluripotenten Stammzellen [Quelle: www.krebsinformationsdienst.de].

1.3 Stammzellen

Der menschliche Organismus setzt sich aus ca. 220 unterschiedlichen Zelltypen zusammen. Der Ursprung einer jeden Zelle beginnt dabei mit der Zygote. Im Verlauf der embryonalen Entwicklung entstehen aus unspezialisierten Vorläuferzellen zunehmend spezialisierte Zelltypen. Am Ende der Differenzierung setzt sich der Körper aus terminal differenzierten und hoch spezialisierten Zellen zusammen. An den vielen einzelnen Entscheidungspunkten der fortschreitenden Differenzierungsprozesse können sich die Zellen entweder reproduzieren oder ihre Differenzierung fortsetzen.

Die Stammzelle wird als eine Art Ursprungszelle betrachtet, die sich einerseits selbst erneuern und sich andererseits in reife Zellen mit definierten Eigenschaften umwandeln kann. Sie ist dafür verantwortlich, Reparaturfunktionen im Falle von Krankheiten oder Verletzungen auszugleichen. Je nach Gewebezugehörigkeit bzw. dem Gewebe, welches diese Zellen schließlich bilden, heißen sie embryonale Stammzellen (ES), germinale (geschlechtszellen-bildende), hämatopoetische (blutbildende), somatische (gewebebildende), mesenchymale (aus dem Mesenchym stammende) oder epitheliale (epithel- bzw. hautbildende) Stammzellen. Die Unterscheidung zwischen Stammzellen und Vorläuferzellen ist zunehmend schwieriger, seit diskutiert wurde, dass Zellen durch Dedifferenzierung und Reprogrammierung auf ein ontogenetisch früheres Stadium zurückfallen und anschließend in mehrere Gewebearten differenzieren können. Das dahinter stehende Konzept der Plastizität bzw. Transdifferenzierung, d.h. der Differenzierung einer Zelle über ihre Keimblattgrenze hinweg, wird vielfach in der Wissenschaft angezweifelt [Hochedlinger et al., 2004; Wagner et al., 2004]. Neuste Arbeiten zeigen die Reprogrammierung von differenzierten Zellen in induzierte pluripotente Stammzellen. Dies geschieht durch das Einschleusen der Reprogrammierungsgene durch ein virales System [Kim et al., 2009; Soldner et al., 2009; Kim et al., 2008; Hyun et al., 2007] oder mittels eines Transposons [Kaji et al., 2009; Woltjen et al., 2009].

Stammzellen haben die Fähigkeit zur Selbsterneuerung. Ihre Tochterzellen sind entweder selbst Stammzellen, die für weitere Zellerneuerung zur Verfügung stehen, oder sie sind differenzierter als die Stammzelle, aus der sie hervorgegangen sind. Diese Aufteilung hängt davon ab, ob sich die Stammzellen symmetrisch oder

asymmetrisch teilen (Abbildung 2). Der Bedarf an spezifischen Zellen wird dabei aus der Nischenumgebung der Zellen signalisiert. Diese Signale, welche maßgeblich an der Induktion eines Selbsterneuerungs- oder Differenzierungszyklus beteiligt sind, wurden in Modellsystemen untersucht [Blanpain et al., 2004; Yamashita et al., 2003].

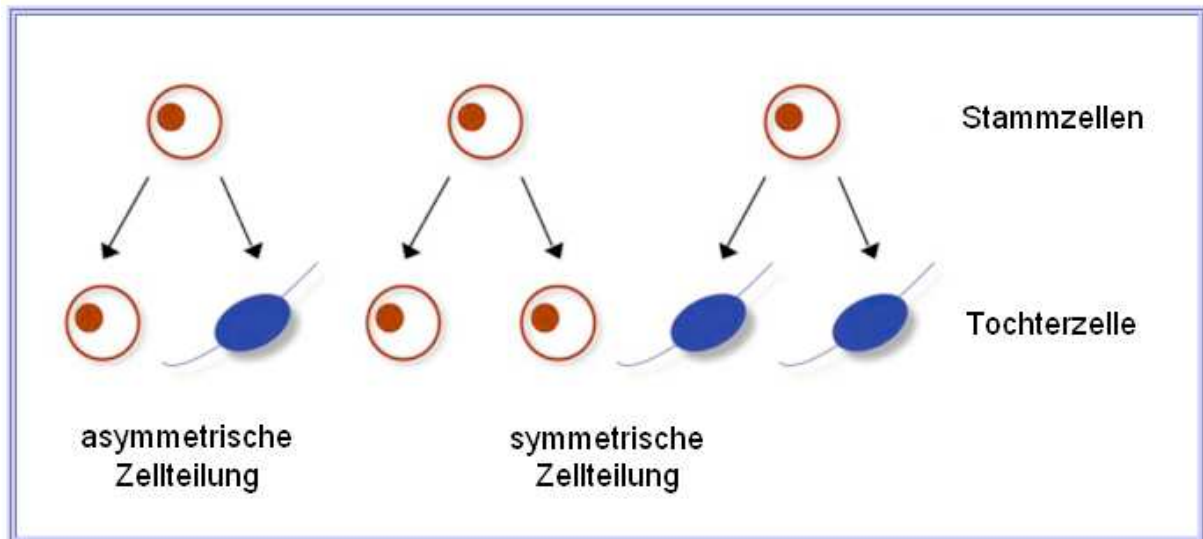


Abbildung 2: Stammzellen haben die Fähigkeit zur Selbsterneuerung. Stammzellen können sich entweder asymmetrisch oder symmetrisch teilen. Aus der asymmetrischen Teilung gehen aus der Stammzelle sowohl eine weitere Stammzelle als auch eine differenzierte Tochterzelle hervor. Zwei Stammzellen sind das Ergebnis einer symmetrischen Teilung. Endet die symmetrische Zellteilung in der Bildung zweier Tochterzellen, geht das Selbsterhaltungspotential verloren.

Laut Nomenklatur unterscheidet man zwischen totipotenten (lat. „zu allem fähig“) Zellen wie der Zygote, pluripotenten (lat. „zu vielem fähig“) Zellen wie den embryonalen Stammzellen und multipotenten (lat. „zu mehrerem fähig“) Zellen wie den mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark. Diese Klassifizierung der Stammzellen dient in Deutschland als Entscheidungsgrundlage, inwieweit die Forschung an bestimmten Zelltypen ethisch vertretbar ist. Die Arbeit mit adulten Stammzellen gilt dabei als unbedenklich, da aus diesen Zellen einzelne Gewebe und Organe, jedoch kein ganzer Organismus hervorgehen kann.

Stammzellen sind somit eine entscheidende Grundlage sowohl für die Entwicklung von Geweben und Organen als auch für die Regenerationsfähigkeit zahlreicher Gewebe.

1.3.1 Embryonale Stammzellen

Die Isolierung und Kultivierung der ersten embryonalen Stammzellen wurde Anfang der achtziger Jahre im Labor von Sir Martin J. Evans an der Universität Cambridge entwickelt [Evans und Kaufmann, 1981].

Wichtige Erkenntnisse für die Gewinnung der embryonalen Stammzellen basierten auf der Beobachtung, dass die so genannten Teratokarzinome (bösartige Wucherungen von Eierstock oder Hoden) in der Lage sind, viele verschiedene Gewebetypen auszubilden.

Embryonale Stammzellen lassen sich aus der inneren Zellmasse (Embryoblast) des Embryo im Blastozystenstadium gewinnen (Abbildung 3). Die Blastozyste, bestehend aus wenigen Zellen, wird von einer Hülle aus Trophektodermzellen umgeben, die später fötale Bestandteile der Plazenta bilden. ES-Zellen werden aus Blastozysten isoliert und anschließend *in vitro* weiter vermehrt.

Die Pluripotenz erlaubt es, aus ihnen Derivate aller drei Keimblätter (Ektoderm, Mesoderm und Endoderm) zu entwickeln. Murine ES-Zellen lassen sich in Anwesenheit von LIF (*leukemia inhibitory factor*) in diesem undifferenzierten Stadium nahezu unbegrenzt vermehren [Smith et al., 1988]. LIF ist ein Faktor, der die spontane Differenzierung von ES-Zellen inhibiert und es ermöglicht, manche ES-Zelllinien auch ohne so genannte Feederzellen (wachstumsinhibierte embryonale Fibroblasten) zu kultivieren. ES-Zellen stellen demnach eine Quelle dar, um nahezu beliebige Mengen verschiedenster Zelltypen *in vitro* zu erzeugen. Diese kontinuierliche Generierung von Spenderzellen hat den großen Vorteil, nicht immer wieder erneut auf embryonales Material zurückgreifen zu müssen. Zurzeit werden Protokolle entwickelt, mit deren Hilfe sich die ES-Zellen in die spezialisierten Zell- und Gewebearten differenzieren lassen.

Zudem ist es möglich, komplexe genetische Veränderungen an ES-Zellen durchzuführen. Diese Eigenschaft findet vor allem bei der Erzeugung transgener Tiere Anwendung. Über homologe Rekombination werden dabei einzelne Gene in ES-Zellen substituiert, inaktiviert oder modifiziert. Nach Keimbahntransfer und Gewinnung homozygoter Nachkommen kann an diesen Tieren die Bedeutung verschiedener Gene während der Entwicklung und im Krankheitsverlauf beobachtet werden [Brinster 1993; Zimmer 1992]. Die Transfektion von ES-Zellen ermöglicht es

ebenfalls, selektive Marker für spezielle Zelltypen einzubringen und aus den embryonalen Stammzellen somatische Zelltypen in hoher Reinheit zu generieren.

Zusammenfassend haben embryonale Stammzellen folgende Fähigkeiten:

- a) Die Zellen können unbegrenzt in Kultur gehalten werden.
- b) Sie sind pluripotent, d.h. sie können in unterschiedliche Gewebetypen ausdifferenziert werden.
- c) An ihnen können komplexe genetische Modifikationen durchgeführt werden.

1.3.2 Adulte Stammzellen

Adulte Stammzellen konnten bereits im sich in der Entwicklung befindlichen Embryo nachgewiesen werden. Jedoch sind sie zum größten Teil im reifen Organismus an verschiedensten Orten lokalisiert. Diese Stammzellen dienen der lebenslangen Erneuerung von Organen und Geweben. Sie sind in Organen, im Knochenmark und in der Nabelschnur zu finden. Das Entwicklungspotential dieser Zellen ist nach derzeitigem Wissenstand gegenüber fetalen und embryonalen Stammzellen erheblich reduziert, sie können sich immer nur zu Zellen einer bestimmten Gruppe entwickeln. Sie werden deshalb oft als multipotent bezeichnet. Genauso wie bei embryonalen Stammzellen kann ihre Differenzierung mittels Wachstumsfaktoren *in vitro* modifiziert werden.

Das Risiko, dass der Körper das Ersatzgewebe wieder abstößt, ist bei den adulten Stammzellen deutlich geringer, da es sich um Zellen handelt, die zuvor dem zu behandelnden Patienten entnommen werden. Nachteilig ist die im Gegensatz zu den embryonalen Stammzellen verminderte Telomeraseaktivität, die dazu führt, dass die adulten Stammzellen nur begrenzt expandierbar sind. Die Proliferationsgeschwindigkeit adulter Stammzellen ist im Vergleich zu embryonalen Stammzellen ebenfalls wesentlich herabgesetzt.

Bisher wurden adulte Stammzellen in zahlreichen Organen des Körpers nachgewiesen. Besonders gut untersucht sind die adulten Stammzellen des hämatopoetischen Systems. Zellen aus dem Knochenmark werden schon seit längerer Zeit in der Therapie bestimmter Blutkrebsarten eingesetzt. Aber auch in verschiedenen Organen wie Leber, Bauchspeicheldrüse, Haut und Verdauungstrakt konnten ebenfalls adulte Stammzellen nachgewiesen werden. In diesen Geweben

findet ein hoher Zellumsatz statt, so wird im Darm die Darminnenwand ständig abgestoßen und erneuert. Genauso sind die adulten Stammzellen bei Mäusen mit vollständig zerstörtem Knochenmark, die dadurch jegliche Immunabwehr verloren haben, in der Lage, das Abwehrsystem wieder vollständig neu aufzubauen. Daher werden diese Zellen auch bei Knochenmarktransplantationen beim Menschen schon seit längerer Zeit eingesetzt. Man versucht hier ebenfalls die entarteten Zellen vollständig zu zerstören und anschließend das Knochenmark von einer geeigneten Stammzellpopulation neu bilden zu lassen.

Die adulten Stammzellen sorgen für die anhaltende Regeneration dieser Gewebe und Organe.

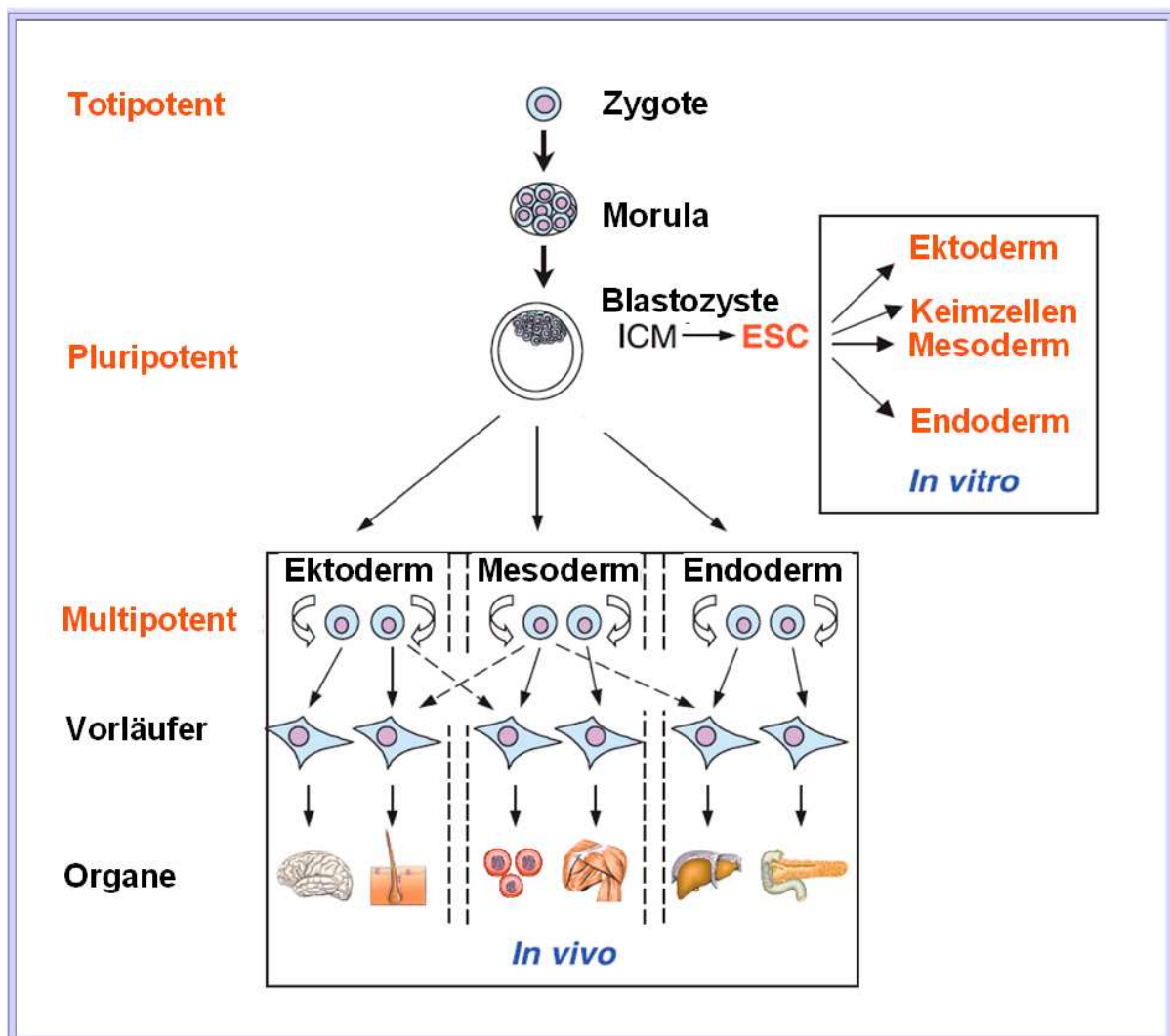


Abbildung 3: Hierarchie und Differenzierung von Stammzellen in verschiedene Gewebe der drei Keimblätter [modifiziert nach Wobus und Boheler, 2005].

Zusammenfassend verfügen adulte Stammzellen über folgende Eigenschaften:

- d) Die Zellen können sich über lange Zeiträume teilen (long-term-self-renewal).
- e) Sie können identische Kopien von sich selbst herstellen.
- f) Die Zellen sind multipotent, d.h. sie können nicht mehr in alle, aber in viele Gewebetypen ausdifferenzieren, jedoch keinen Gesamtorganismus mehr bilden.

1.3.2.1 Mesenchymale Stammzellen

Neben den bereits lange bekannten Blutstammzellen wurden im Knochenmark auch mesenchymale Stammzellen identifiziert [Krause et al., 2001; Pittenger et al., 1999]. Sie unterscheiden sich sowohl funktionell als auch in ihren Oberflächenmustern von den Stammzellen aus dem Blut. Diese Zellen mesodermalen Ursprungs besitzen ebenfalls die Fähigkeit der Selbsterneuerung. Zudem verfügen sie über das Potential, in Gewebe aller drei Keimblätter auszureifen [Jiang et al., 2002; Reyes et al., 2001; Reyes und Verfaillie, 2001]. Unter Einfluss von Differenzierungsfaktoren oder durch interzellulären Kontakt können sie in mesenchymale Gewebe wie Knochen, Knorpel oder Fettgewebe differenzieren. Zudem reicht die Plastizität der MSCs [Grove et al., 2004; Harris et al., 2004; Otto und Rao, 2004] über diese drei typischen Differenzierungswege hinaus. Da für diese Zellen die Spezialisierung in Zelltypen nicht-mesodermalen Ursprungs beschrieben werden konnte, wird ihr Differenzierungspotential als keimblattüberschreitend bezeichnet. Die MSCs können neben den mesenchymalen Gewebetypen auch in Tenozyten, Stromazellen, Astrozyten, Oligodendrozyten, Skelettmuskelzellen sowie längsgestreifte Muskel- und Herzmuskelzellen differenzieren [Xu et al., 2004]. Sie erfüllen in diesen Geweben Aufgaben zur Regeneration bei Defekten, Verletzungen und Erkrankungen. Die im Vergleich zu den embryonalen Stammzellen einfache Handhabung der MSCs, von der Isolation über die Vermehrung bis zu ihrem hohen Differenzierungspotential, rückt sie in das Zentrum des Interesses der Regenerativen Medizin sowie des Tissue Engineering und der Gentherapie. Vorteilhaft ist zudem die Verwendung patienteneigenen Zellmaterials, durch welches die Gefahr von Abstoßungsreaktionen bei Transplantationen ausgeschlossen werden kann [Barry et al., 2003].

Stammzellen mesenchymalen Ursprungs wurden erstmals von Friedenstein 1966 aus dem Knochenmark isoliert und anschließend identifiziert. Seit dieser Arbeit wurden zahlreiche Techniken zur Isolierung und Charakterisierung mesenchymaler Stammzellen aus höheren Tieren und dem Menschen entwickelt [Baksh et al., 2004; Barry und Murphy, 2004]. Diese Zellen lassen sich mittels Parametern wie Morphologie, Proliferationsaktivität und Detektierbarkeit von Oberflächenproteinen, Rezeptoren sowie Wachstumsfaktoren spezifizieren [Minguell et al., 2001]. Charakteristische Oberflächenmarker der mesenchymalen Stammzellen sind u. a. CD29, CD44 und CD105 [Sung et al., 2008].

1.3.2.2 Stammzellen aus exokrinem Drüsengewebe

Drüsen gehören meistens zum Epithelgewebe und bestehen aus Epithelzellen, die darauf spezialisiert sind, Sekrete zu bilden und diese in den Extrazellularraum bzw. das Lumen eines Ausführungsganges oder das Blut bzw. die Lymphe abzugeben. Jedoch sind alle Zellen, deren Hauptaufgabe in der Produktion und Freisetzung von Sekreten besteht, als Drüsenzellen anzusehen. Das bei den endokrinen Drüsen als Hormon bezeichnete Sekret wird ins Blut abgegeben. Nach der Ausschleusung des Sekrets aus der Zelle wird das Hormon über mehrere Zwischenstationen in das Blut geleitet und von diesem im Organismus verteilt. Beispiele für endokrine Drüsen sind die Langerhansschen Inseln der Bauchspeicheldrüse, die Zirbeldrüse, die Nebenniere, die Schilddrüse, die Nebenschilddrüse und die Leydigischen Zellen des Hodens. Die Sekrete des exokrinen Drüsengewebes hingegen werden entweder direkt in das Lumen eines Endstücks (Azinus, Tubulus oder Alveolus) oder in den Ausführungsgang einer exokrinen Drüse abgegeben. Im Magen und Darm kann die Abgabe auch direkt in das Lumen erfolgen, zum Beispiel bei Becherzellen. Beispiele für exokrine Drüsen sind Prostata (Vorsteherdrüse), Pankreas (Bauchspeicheldrüse), Tränendrüsen, Speicheldrüsen, Schweißdrüsen, Talgdrüsen und die Brustdrüsen der Frau.

Stammzellen aus exokrinem Drüsengewebe konnten in jüngster Zeit neben den Speicheldrüsen und der Bauchspeicheldrüse [Kruse et al., 2004] auch aus humanem [Conrad et al., 2008; Kerr et al., 2008; Payne und Braun, 2008] und murinen [Yoshida, 2008; Guan et al., 2007, 2006] Hoden isoliert werden. Dabei handelt es sich nur bei 0,03% der Keimzellen tatsächlich um spermatogoniale Stammzellen

[Kubota und Brinster, 2006; Olive und Cuzin, 2005; Nayernia et al., 2004], die jedoch erfolgreich in funktionale Herzmuskelzellen differenziert werden konnten [Guan et al., 2007]. Über die Pluripotenz [Conrad et al., 2008; Kerr et al., 2008; Payne und Braun, 2008; Oatley und Brinster, 2008; Guan et al., 2007] und die Bedeutung der spermatogonialen Stammzellen für die Regenerative Medizin [Skutella, 2009; Nayernia, 2007] und die Verfügbarkeit dieser Zellen aus einer dieser Quellen wird diskutiert.

Adulte Stammzellen aus exokrinem Drüsengewebe konnten weiterhin aus der Glandula submandibularis, einer der beiden Speicheldrüsen im Unterkiefer [Denny et al., 1997], und aus verschiedenen Bereichen des Pankreas isoliert werden. Die aus den Langerhans-Inseln, dem Drüsengewebe oder den exokrinen Acini isolierten Zellen [Lin et al., 2006; Choi et al., 2004; Seaberg et al., 2004] zeichnen sich durch eine hohe Proliferationsaktivität und durch das Potential in Zelltypen aller drei Keimblätter zu differenzieren aus [Gallo et al., 2007; Seeberger et al., 2006; Choi et al., 2004; Kruse et al., 2004; Seaberg et al., 2004]. Die aus exokrinem Drüsengewebe gewonnenen Zellen können über einen langen Zeitraum kultiviert werden, differenzieren in zahlreiche Zelltypen und dreidimensionale Aggregate, „organoid bodies“ (OBs) bilden. Die Generierung dieser OBs kann über die „hanging drop“-Kultur [Desbaillets et al., 2000; Keller et al., 1995; Wobus et al., 1991; Doetschman et al., 1985] oder durch das Ausplattieren der Zellen in Kulturschalen, die auf Grund ihrer Oberflächenbehandlung durch Plasmaaktivierung kein Adhärenz der Zellen zulassen, erreicht werden. Für die Durchführung der „hanging drop“-Methode werden die undifferenzierten Stammzellen aus ihrer Kulturschale entnommen und in einen Tropfen mit Kulturmedium überführt, der an der Deckelinnenseite einer neuen Schale haftet. Nachdem eine Vielzahl solcher Tropfen hergestellt wurde, wird der Deckel mit den anhaftenden Stammzell-Kulturmedium-Tropfen so umgedreht, dass diese am Kulturschalendeckel nach unten hängen. Die vorher vereinzelt vorliegenden Zellen lagern sich nun auf Grund der Gravitation zusammen und bilden pro Tropfen einen OB. Im OB fangen die Stammzellen über verschiedene Zwischenstufen an, sich in unterschiedliche Zelltypen zu entwickeln. Dieser Prozess konnte für die adulten Stammzellen aus exokrinem Drüsengewebe anhand spontaner Differenzierung gezeigt werden. So differenzieren diese Zellen spontan in Zelltypen aller drei Keimblätter wie Haut- und Nerven-, Herzmuskel- und Muskelzellen sowie Leber- und Langerhans-Insel-Zellen. Gleichzeitig konnte auch

die gerichtete Differenzierung der adulten Stammzellen aus dem Pankreas und der Glandula submandibularis gezeigt werden. Die humanen und murinen Zellen konnten dabei erfolgreich durch den gezielten Einsatz von Wachstumsfaktoren in Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten differenziert werden [Brose et al., 2009; Gorjup et al., 2009]. Die gerichtete Differenzierung dieser Zellen in Nervenzellen, exo- und endokrine pankreatische Zellen, Herzmuskel- und Leberzellen sowie in Magen-, Darmzellen und Eizellen konnte ebenfalls durch Stimulierung mittels spezifischer Differenzierungsinduktoren erreicht werden [Danner et al., 2007; Guldner et al., 2006; Choi et al., 2004; Seaberg et al., 2004; Suzuki et al., 2004].

Zusammenfassend ist für die Gruppe der adulten Stammzellen festzuhalten:

- a) Adulte Stammzellen sind zeitlebens im Körper vorhanden und regenerieren Gewebe und Organe.

- b) Adulte Stammzellen sind als mögliche Alternative zu embryonalen Stammzellen zu betrachten. Bei der Transplantation von adulten Stammzellen ist das Risiko einer unkontrollierten Reaktion am Zielort gemindert. Adulte Stammzellen aus dem Knochenmark können ohne vorherige Manipulation direkt in das geschädigte Areal eingebracht werden. Durch den Kontakt mit dem zugrunde gegangenen Gewebe werden sie zur Bildung neuer dem Gewebe entsprechender Zellen, zum Beispiel Nervenzellen, Herzkranzgefässen und Leberzellen, angeregt.

- c) Bei der Behandlung mit körpereigenen adulten Stammzellen sind keine Abstoßungsreaktionen zu erwarten. Körpereigene adulte Stammzellen besitzen gegenüber embryonalen Stammzellen einen weiteren, für die klinische Anwendung sehr wichtigen Vorteil. Aus dem eigenen Knochenmark entnommene Stammzellen, mit denen der Patient behandelt wird, rufen im Gegensatz zu Stammzellen eines fremden Spenders keine Abstoßungsreaktionen hervor. Daher kann auf Medikamente zur Unterdrückung des körpereigenen Abwehrsystems, die zu einer generell verminderten oder fehlenden Infektionsabwehr des Patienten führen und dadurch ein zusätzliches Risiko darstellen, verzichtet werden.

1.3.3 Entwicklung und Differenzierung von Zelltypen aus den Keimblättern der embryonalen Entwicklung

Als Keimblätter (Endo-, Meso- und Ektoderm) werden in der Entwicklungsbiologie verschiedene Zellschichten bezeichnet, die durch eine erste Differenzierung des Embryos während der Gastrulation entstehen. Aus ihnen entwickeln sich im weiteren Verlauf der Embryogenese unterschiedliche Strukturen, die für die Bildung von Geweben und Organen verantwortlich sind (Abbildung 3). Aus dem Ektoderm bilden sich Nervengewebe, Hypophyse, Haut, Nebennierenmark und das Bindegewebe von Kopf, Gesicht, Augen und Ohren. Knochen, Knochenmark, Blutzellen, Lymphgefäße, Nebennierenrinde sowie Skelett-, Herz- und glatte Muskeln gehen aus dem Mesoderm hervor. Das Endoderm ist für die Entwicklung von Leber, Lunge, Luftröhre, Kehlkopf, Thymus sowie ebenfalls für Pankreas und Schilddrüse verantwortlich.

1.3.3.1 Differenzierung von mesodermalen Zelltypen

Die Entwicklung von Stammzellen zu mesodermalen Gewebetypen wie Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten kann durch Einfluss von spezifischen löslichen Wachstumsfaktoren, wie für mesenchymale Stammzellen beschrieben, induziert werden [Gonzalez et al., 2008; Bianco et al., 2001].

1.3.3.1.1 Die osteogene Entwicklung

Der osteogene Differenzierungsprozess fächert sich in Proliferation, Entwicklung der extrazellulären Membran (ECM), Reifung sowie die Mineralisierung auf. Die Induktion der Knochendifferenzierung erfolgt u. a. durch den Zusatz von β -Glycerolphosphat, Dexamethason und Ascorbinsäure in das Zellkulturmedium [Jaiswal et al., 1997]. Neben MSCs konnten auch humane embryonale Stammzellen mit dieser Medienzusammensetzung in Osteoblasten differenziert werden und darüber hinaus konnte im Tiermodell die Knochenbildung bei Mäusen durch vordifferenzierte humane ES-Zellen gezeigt werden [Bielby et al., 2004]. Bestimmte Wachstumsfaktoren beeinflussen die Osteogenese sowohl während der Entwicklung als auch die Knochenheilung im Zuge von Läsionen (Abbildung 4). Eine wichtige Rolle spielen in diesem Zusammenhang die Proteine der TGF β -Superfamilie (Transforming Growth Factor-Superfamilie). Diese wird aufgrund der biologischen und strukturellen

Ähnlichkeiten der Mitglieder in verschiedene Unterfamilien unterteilt. In die Unterfamilie der BMPs (*bone morphogenic proteins*) gehört das BMP-2 neben mindestens 14 weiteren BMPs [Chen et al., 2004; Hoffmann und Gross, 2001; Reddi et al., 1997; Hogan et al., 1996]. Ihnen wurde die Fähigkeit zur Osteoinduktion und Knochenregeneration zugeschrieben [Urist, 1965]. Lokale Wachstumsfaktoren wie BMP-2 sind während der embryonalen Entwicklung wesentlich an der Modellierung der Knorpelstruktur und an der Extremitätenformierung beteiligt [Yi et al., 2000; Francis-West et al., 1994; Wozney et al., 1992; Lyons et al., 1990]. BMP-2 wird u. a. in der Knochenwachstumsfuge gebildet und reguliert dort die Chondrogenese und das Längenwachstum des Knochens [Barnes et al., 2001]. Zudem hat es einen stimulierenden Effekt auf die Synthese von Proteoglykan im Knorpel [Kim et al., 2003]. Untersuchungen zur Kondensierung von MSCs und deren Differenzierung in Osteoblasten und Chondrozyten zeigten die wichtige Funktion von BMP-2 [Schmitt et al., 2003; Hall und Miyake, 2000]. Durchgeführte Analysen zur Heilung von Knochenfrakturen wiesen die lokale osteogene und osteoinduzierende Aktivität von BMP-2 nach. Es induziert die osteogene und chondrogene Differenzierung zuvor rekrutierter Stammzellen [Bostrom et al., 1995]. Diese Wirkungsweise des BMP-2 wurde ebenfalls in einer klinischen Studie der Phase II nachgewiesen [Govender et al., 2002].

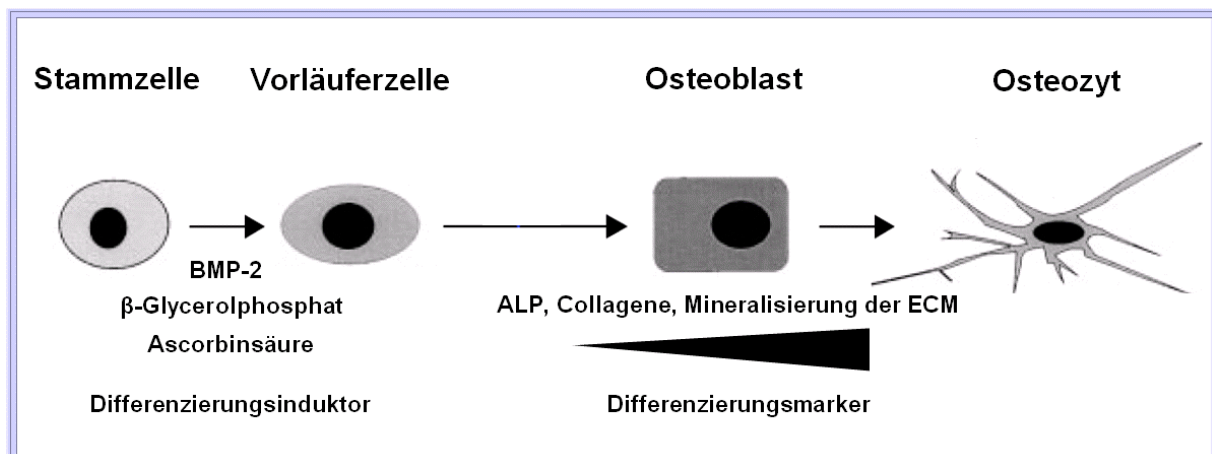


Abbildung 4: Schematische Darstellung der osteogenen Zelldifferenzierung. Die Knochendifferenzierung wird u. a. durch die Zugabe von β-Glycerolphosphat, Dexamethason und Ascorbinsäure in das Zellkulturmedium [Jaiswal et al., 1997] induziert. Der Verlauf der osteogenen Entwicklung kann durch die Ausbildung unterschiedlicher Marker wie die Alkalische Phosphatase (ALP), verschiedene Collagene und die Mineralisierung der extrazellulären Matrix (ECM) verfolgt werden [Schema modifiziert nach Raisz et al., 1999].

1.3.3.1.2 Die chondrogene Entwicklung

Die chondrogene Differenzierung bezeichnet die Entwicklung von Knorpel aus mesenchymalem Gewebe. Dieser Knorpel dient dem später entstehenden Knochen als Matrix bzw. er entwickelt sich zu artikulärem Knorpel. Die dafür rekrutierten Stammzellen aus dem mesenchymalem Gewebe aggregieren miteinander und reifen über chondrogene Vorläuferzellen zu Chondrozyten heran. Diese Prozessierung erfordert die Stimulation von spezifischen Wachstumsfaktoren und Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Interaktionen. Ebenfalls wurde die Bedeutung von mechanischen Einflüssen während der chondrogenen Entwicklung überprüft [Tuan et al., 2004; Shum et al., 2003].

Für die Differenzierung von Zellen in Knorpelstrukturen wird häufig das dreidimensionale Kultivierungssystem (3D, „high-density“) verwendet [Johnstone et al., 1998]. Es wird angenommen, dass dieses Kultursystem das Ausbilden von Zell-Zellkontakten, Zell-Matrix-Interaktionen und, die zur Differenzierung benötigte, Zelldichte begünstigt. Somit soll eine analoge Situation wie bei der Embryogenese vorhanden sein, die den stabilen Erhalt des Phänotyps und seiner Charakteristika gewährleistet [Fell, 1925]. Neben dem dreidimensionalen Kultivierungssystem konnte jedoch auch die erfolgreiche chondrogene Differenzierung für die Kultivierung von Zellen im Monolayer gezeigt werden [Brose et al., 2009; Guo et al., 2008]. Für die gerichtete chondrogene Differenzierung ist auch ein definiertes, serumfreies Differenzierungsmedium mit spezifischen Wachstumsfaktoren notwendig. Vielfach wurde gezeigt, dass wiederum Mitglieder der TGF β -Superfamilie eine entscheidende Rolle während der Knorpelentwicklung zukommt. Faktoren wie TGF β -1, -2 oder -3 wurden erfolgreich auf ihre Fähigkeit, die chondrogene Zelldifferenzierung zu induzieren, untersucht [Goessler et al., 2005; Heng et al., 2004; Barry et al., 2001; Mackay et al., 1998]. Sie haben einen stimulierenden Effekt auf die Proliferation, die Bildung von Collagenen und die Synthese von Glycosaminoglykanen [Lawrence, 1996]. Jedoch auch für Proteine der BMP-Unterfamilie wurde der Einfluss auf die Knorpeldifferenzierung nachgewiesen [Sekiya et al., 2002, 2001]. Ebenfalls fördern Faktoren wie GDF-5 (*growth differentiation factor-5*) und IGF-1 (*insuline-like growth factor*) die chondrogene Entwicklung [French et al., 2004; Fortier et al., 2002; Spiro et al., 2000].

1.3.3.1.3 Die adipogene Entwicklung

Die zellulären und molekularen Abläufe während der Adipogenese wurden vor allem an der murinen 3T3-L1 Präadipozyten Zelllinie untersucht [Green und Kehinde, 1975]. In einem die Adipogenese induzierenden Medium bilden diese Zellen im Zytoplasma Lipidvakuolen. Molekularbiologische Untersuchungen zeigten die Expression von Markergenen des normalen Fettgewebes [Mandrup und Lane, 1997]. Die adipogene Entwicklung von undifferenzierten, adulten Stammzellen zu Fettzellen kann vereinfacht als zweistufiger Prozess betrachtet werden (Abbildung 5). Im ersten Schritt erfolgt eine Determinierung der Zellen auf die adipogene Entwicklungslinie und die Bildung von Präadipozyten, welche schon kleine Lipidtröpfchen aufweisen. Im zweiten Schritt findet die Entwicklung zum reifen Adipozyten statt. Bei diesem Prozessabschnitt verschmelzen die kleinen Tröpfchen zu großen Fettvesikeln miteinander, welche für die fortgeschrittene Differenzierung charakteristisch sind. Die an der Festlegung beteiligten Faktoren sind noch weitgehend unbekannt. Zell-Zell-, Zell-Matrix-Kontakte und hormonelle Faktoren spielen potentiell eine Rolle [Rosen, 2002].

Die *in vitro*-Differenzierung der Zellen zu Adipozyten erfolgt oft in einem Standard Assay [Pittenger *et al.*, 1999; Gimble *et al.*, 1992]. Dabei ist einem High-Glucose-Medium Insulin, Dexamethason, Indomethacin und 3-Isobutyl-1-methylxanthin zugesetzt. Ein hoher Glucosegehalt bewirkt generell, dass die Zellen ein Überangebot an Substrat für verschiedene Biosynthesewege wie die Fettsynthese zur Verfügung haben.

Insulin und IGF-1 (*insuline-like growth factor*) sind an mehreren Prozessen der adipogenen Induktion beteiligt. IGF-1, auch als Somatomedin C bezeichnet, ist ein Wachstumsfaktor, der strukturell dem Insulin sehr ähnlich ist. Diese beiden adipogenen Wachstumsfaktoren weisen hohe Sequenzhomologien auf und sind Teil eines komplexen Systems, das Körperzellen nutzen, um mit ihrer Umgebung zu kommunizieren. So regen sie die Glukoseaufnahme in die Zelle durch eine Translokation des Glukosetransporters GLUT4 an. In der Zelle wird Glukose zu Glukose-6-Phosphat umgesetzt. Die Oxidation von Glukose-6-Phosphat zu Pyruvat (Glykolyse) sowie die Oxidation von Pyruvat zu Acetyl-CoA, dem Fettsäurebaustein, wird ebenfalls Insulin aktiviert [Lehninger *et al.*, 1994]. Zusätzlich wirken die adipogenen Faktoren auch an der Fettspeicherung mit.

Prädipozyten besitzen im Gegensatz zu den terminal adipogen differenzierten Zellen noch die Fähigkeit zur Zellteilung. Vor Beginn des Differenzierungsprozesses zu reifen Adipozyten muss die Proliferationsaktivität eingestellt werden. Im Zuge der Adipogenese verändert sich das Expressionsmuster diverser Gene und Marker zur Ausbildung des adipozytären Phänotyps, welcher u. a. durch die Aggregation von Triglyceriden gekennzeichnet ist. Die Inhibierung der Wachstumsaktivität wird wahrscheinlich u. a. durch den früh exprimierten Marker PPAR γ (*peroxisome-proliferator-activated receptor γ*) ausgelöst [Janderova et al., 2003; Altiok et al., 1997; Lin und Lane, 1994]. Neben der Hochregulierung verschiedener Faktoren ist der stark exprimierte pref-1 (*Prädipozytenfaktor-1*) nach Abschluss der Differenzierung der Zellen zu Adipozyten vollständig verschwunden [Smas und Sul, 1993]. Im Verlauf der terminalen Adipozytendifferenzierung beginnt die Bildung großer, Triglyceridgefüllter Fetttröpfchen und Perilipin [Greenberg et al., 1993] (Abbildung 5). Perilipine werden in hohem Maße in Adipozyten exprimiert [Greenberg et al., 1991] und sind dort an der Oberfläche bzw. Peripherie der Lipidtröpfchen lokalisiert [Blanchette-Mackie et al., 1995].

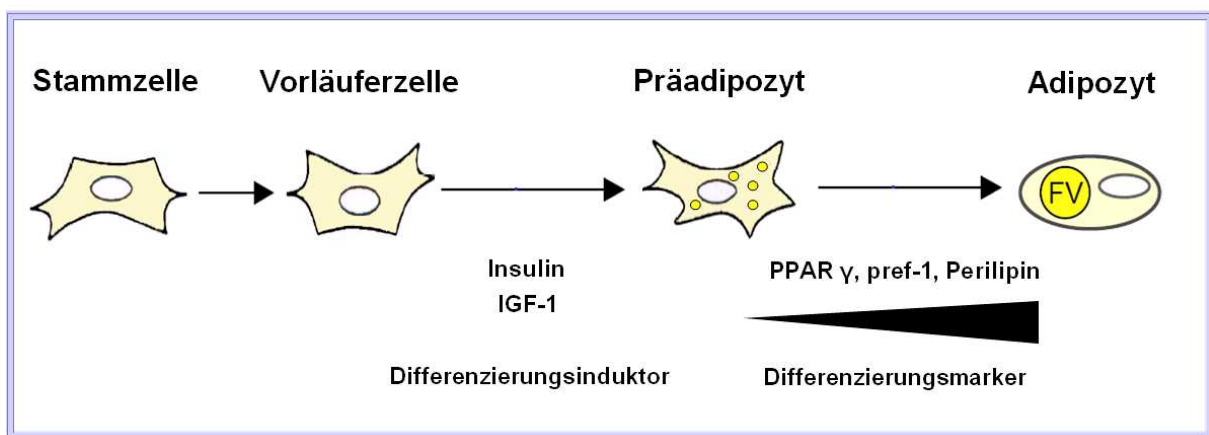


Abbildung 5: Übersicht der Entwicklungsphasen während der adipogenen Differenzierung. Während der Zelldeterminierung werden verstärkt frühe und späte Differenzierungsmarker exprimiert. In reifen Adipozyten ist keine Genexpression des PPAR γ (peroxisome-proliferator-activated receptor γ) und Prädipozytenfaktors-1 (pref-1) mehr nachweisbar. Zu einem späteren Zeitpunkt der Differenzierung wird Perilipin, ein Protein an der Fettvesikeloberfläche (FV), hochreguliert [Schema modifiziert nach Gregoire et al., 1998].

1.4 Biomaterialien in der Regenerativen Medizin

Der Einsatz von Biomaterialien, funktionsbezogen als biokompatible Werkstoffe bezeichnet, zum Wiederaufbau defekter Gewebe und Organe beschreibt ein komplexes Feld der Regenerativen Medizin. Mit steigendem Erkenntnisgewinn und wachsendem Verständnis für den menschlichen Organismus wurden Materialien untersucht, die sich durch ihre biologische Verträglichkeit und ein minimales Risiko vor immunologischen Reaktionen im Empfängerorganismus auszeichnen. Biomaterialien dienen dabei oft dem vorübergehenden oder dauerhaften Ersatz von Organen, Organteilen oder Körpergeweben, die aufgrund von Krankheit, Läsionen oder Alterungsprozessen zerstört wurden oder in ihrer Funktion eingeschränkt sind [Ratner, 2004]. Inzwischen stehen zahlreiche Substanzen zur Verfügung, die aufgrund ihres Einsatzortes unterschiedliche Eigenschaften besitzen. Die Einteilung in nicht-resorbierbare und resorbierbare Materialien wurde durch Refior et al. (1998) sowie Rueger (1996, 1998) verfeinert:

1. biologische, organische Substanzen, wie Knochenmatrix
2. synthetische, organische Materialien, wie Polyester als Beispiel für organische Polymere
3. synthetische, anorganische Materialien, wie Glas
4. Kompositwerkstoffe, ergeben sich aus Kombination von Verbindungen der drei vorangegangenen Gruppen

In den vergangenen Jahren ist der Bedarf und Einsatz an Biomaterialien enorm angestiegen. So werden mit Gefäßprothesen Blutgefäße ersetzt, Stents dienen der Abstützung der Wand von Blutgefäßen [Ring, 2001], Gold und Kunststoffe werden als Zahnersatzmaterial genutzt. Titan als gängiges Implantatmaterial wird sowohl in der Orthopädie und Unfallchirurgie als auch für Dentalimplantate verwendet [Kashiwagi et al., 2009]. Beispiele für den Ersatz kompletter Organe oder Teilen davon durch biokompatible Verbindungen sind künstliche Harnblasen, synthetisch hergestellte Herzklappen und Herzschrittmacher oder Kunstherzen sowie Cochlea-Implantate im Ohr [Ratner, 2004]. Mit diesen zahlreichen Einsatzmöglichkeiten rücken auch die komplexen Interaktionen von Organismus und Biomaterial in den

Vordergrund, weswegen die vorklinische Testung der genutzten Substanzen auf ihre biologische Verträglichkeit besonders wichtig ist. Um die Biokompatibilität eines Materials beurteilen zu können, muss daher eine eindeutige Definition des Begriffs Biomaterial festgelegt sein. Im Rahmen der Konsensuskonferenz für Biokompatibilität wurde 1993 eine Begriffsklärung, eine eindeutige Nomenklatur und die Standardisierung der Testverfahren festgelegt [Klinkmann et al., 1994; Klinkmann et al., 1993; Klinkmann und Ivanovich, 1993].

Die Weiterentwicklung, der für die Regenerative Medizin bestimmten Biomaterialien, führte zu resorbierbaren Verbindungen mit zusätzlichen bioaktiven Komponenten. Sie haben neben ihrer Funktion als tragendes Matrixgerüst auch die Aufgabe, stimulierende Signale und Faktoren für eine gezielte Geweberegeneration in die zelluläre Umgebung auszusenden. Als biologisches Vorbild dient für diesen Ansatz die ECM, die im Organismus bei Prozessen wie der Wundheilung und als körpereigene Leitstruktur eine wichtige Rolle für den Wiederaufbau beeinträchtigter Gewebe und Organe spielt [Kleinmann et al., 2003; Streuli, 1999]. Um die Biomaterialien für ihren Einsatz im Gewebewiederaufbau zu optimieren, wurden sie mit molekularen Strukturen wie Integrinen; Collagenen, Laminin und Fibronectin als Bestandteile der ECM [Flaim et al., 2005; Rhee et al., 2004] und spezifischen Adhäsionsmustern wie RGD-Sequenzen [Gasteier et al., 2007; Groll et al., 2005; Hersel et al., 2003; Pierschbacher und Ruoslahti, 1984] sowie Wachstumsfaktoren [Ito, 2008; Soen et al., 2006] versehen. Sie steuern das Adhäsions-, Proliferations- und Differenzierungsverhalten der Zellen und tragen somit zur Entwicklung und Regeneration von Geweben bei [Hubbell, 2003].

1.4.1 Biomodifizierte Oberflächen

Für die Entwicklung und Gestaltung von Biomaterialien zur Regeneration von Geweben und Organen stellen die Zellen und die Proteine an ihrer Oberfläche eine entscheidende Rolle dar [Hirano und Mooney, 2004; Spatz, 2007]. Eine besondere Bedeutung kommt dabei Signalproteinen wie Wachstumsfaktoren und Zytokinen zu. Bisher ist eine Vielzahl von Materialkompositionen zur Erhöhung der Zelladhäsion bekannt, jedoch liegen bisher nur wenige Entwicklungen zur Unterstützung von Regulationsprozessen in der Zelle wie Proliferation, Differenzierung, Sezernieren von Proteinen oder Apoptose vor [Ito, 2008].

1.4.1.1 Immobilisierung von Biomolekülen

Für einen Großteil der Anwendungsmöglichkeiten von Biomaterialien werden die Oberflächeneigenschaften der Verbindungen so modifiziert, dass nach Applizieren der Zellen gezielt bestimmte Verhaltensweisen und Entwicklungsrichtungen durch die neue biologische Umgebung induziert werden. Die angestrebte Entwicklung kann sowohl durch die Verringerung oder Inhibierung von Proteinadsorption als auch durch die gezielte Kopplung von spezifischen Molekülen oder Zellen beeinflusst werden. Ist es das Ziel spezifische Proteine oder Zellen an Oberflächen zu binden, muss ein geeignetes Molekül identifiziert werden, welches spezifisch mit dem zu bindenden Partner reagiert und somit die Anbindung ermöglicht. Hierzu sind Ligand-Rezeptor- und Enzym-Substrat-Systeme besonders geeignet, da diese sich durch hochspezifische Bindungen auszeichnen. Zur Anbindung eines Moleküls dieser Systeme stehen prinzipiell folgende Bindungsarten zur Verfügung: Adsorption, affine Reaktionen, kovalente und photochemisch induzierte Kopplung sowie elektrochemische Reaktionen und Anbinden durch Selbstanordnung (*self assembled monolayer*, SAM). Die Reaktion der Proteine mit der Trägeroberfläche findet in den meisten Fällen direkt statt. Ist eine gewisse Beweglichkeit der Proteine erforderlich oder die Oberflächeneigenschaften von Protein und zu koppelnder Oberfläche sehr unterschiedlich, kann die Immobilisierung über sogenannte Spacer ermöglicht werden [Soyez et al., 1996]. Die Verwendung von Spacern zwischen Ligand und Oberfläche soll zudem die Kopplungsdichte der zu koppelnden Biomoleküle erhöhen [Le Berre et al., 2003; Southern et al., 1999]. Je weiter die Rezeptoren der starren Oberfläche entfernt sind, desto beweglicher sind diese und erhöhen damit die Wahrscheinlichkeit der reaktiven Zusammenstöße von Ligand und Rezeptor.

Erstmals wurde Insulin von Cuatrecasas [1969] an eine Festphase immobilisiert. Dies diente der Untersuchung der Insulinregulation. In nachfolgenden Arbeiten wurde Insulin in der Funktion als Wachstumsfaktor an eine Platinoberfläche gekoppelt. Hierbei stand der differenzierungsinduzierende Effekt von Zellen in Adipozyten im Mittelpunkt [Liu et al., 1992; Ito et al., 1991]. Eine Vielzahl von weiteren Arbeiten wurden auf dem Gebiet der Immobilisierung von Biomolekülen an Oberflächen zur Regulation von zellulären Vorgängen durchgeführt (Tabelle 1). So wurde neben EGF (*epidermal growth factor*) auch Insulin für die Erhöhung des Zellwachstums an die Festphase gekoppelt [Klenker et al., 2006, 2005; Watanabe et al., 2003]. Bei der Immobilisierung des osteogenen Differenzierungsfaktors BMP-2 wurde eine

verstärkte ALP-Aktivität, die Einlagerung von Calcium und Phosphaten in die ECM der auf modifizierten Oberflächen ausplattierten Zellen nachgewiesen. Zudem konnte eine verstärkte Genexpression von BMP-2 nachgewiesen werden [Park et al., 2006; Tsujigiwa et al., 2006, 2005; Schlipf et al., 2005; Puleo et al., 2002]. Das immobilisierte TGF β -1 konnte erfolgreich sowohl die Collagensynthese in Zellen induzieren [Fischer et al., 2003; Mann et al., 2001] als auch die Entwicklung von Chondrozyten zu prehypertrophen Chondrozyten und osteogene Zellen inhibieren [Chou et al., 2006]. Die neurale Differenzierung von Zellen aus einem Nebennierentumor (PC-12-Zellen) konnte durch gekoppeltes NGF (*nerve growth factor*) in Form von Neuritenwachstum gezeigt werden [Gomez et al., 2006; Shibata et al., 2006; Chen et al., 2005]. Die Immobilisierung von LIF konnte die gleich bleibende Kolonienmorphologie von embryonalen Stammzellen gewährleisten [Alberti et al., 2008; Cetinkaya et al., 2007]. Neben den ES-Zellen konnte auch für adulte Stammzellen und andere Vorläuferzellen gezeigt werden, dass immobilisierte Wachstumsfaktoren die spezifische Differenzierung stimulieren. So wurden im Rahmen dieser Arbeit in Zusammenarbeit mit C. Leclerc am Institut Pasteur in Paris humane und murine Monozyten mittels immobilisiertem M-CSF und GM-CSF in Makrophagen bzw. Dendritische Zellen differenziert [Leclerc et al., 2007]. Jedoch ist für die Differenzierung von Stammzellen durch immobilisierte Wachstumsfaktoren bisher noch nicht viel bekannt. Die besondere Anforderung im Arbeitsfeld der Stammzellendifferenzierung ist die anhaltende Induzierung der Differenzierung über einen Zeitraum von mehreren Wochen als auch die Mehrstufigkeit dieses Prozesses. Die Literatur beschreibt meist die Zelldifferenzierung von Vorläuferzellen, die innerhalb von wenigen Tagen erreicht ist [Phillipi et al., 2008; Nakajima et al., 2006; Soen et al., 2006; Rhee et al., 2004].

Tabelle 1: Übersicht über kovalent gebundene Biomoleküle an einer Oberfläche zum Einsatz in der Zellkultur.

Wachstumsfaktor	Oberflächen	Zelltyp	Referenz
BMP-2 <i>bone morphogenic protein-2</i>	- oberflächenmodifiziertes Titan - Collagen Typ I - Chitosan Nanofibrillen	- murine mesenchymale Stammzellen (MSCs) - murine Osteoblasten - MSCs aus dem Kaninchen	- Puleo et al., 2002 - Tsujigiwa et al., 2006, 2005 - Park et al., 2006
TGFβ-1 <i>transforming growth factor β-3</i>	- Collagen Typ I-beschichtetes Titan	- Osteoblasten	- Fischer et al., 2003
IGF-1 <i>Insuline-like growth factor-1</i>	- Photoimmobilisierung	- murine Myoblasten	- Watanabe et al., 2003
Insulin	- oberflächenhydrolysiertes PMMA (Poly(methyl Methacrylat)) - oberflächenbehandeltes Glas oder Polyacrylamid - biodegradierbare Polymere - biodegradierbare Polymere mit Collagenen, RGDs beschichtet	- murine, embryonale Fibroblasten - murine Osteoblasten - Ovarienzelllinie des chinesischen Hamsters	- Ito et al., 1996, 1992, 1991; Liu et al., 1993, 1992 - Ito et al., 1992 - Ito et al., 1994 - Ito et al., 1997, 1995; Li et al., 1997; Zeng et al., 1995, 1994; - Ito et al., 1997, 1996
EGF <i>epidermal growth factor</i>	- oberflächenmodifiziertes Glas - oberflächenhydrolysiertes PMMA - oberflächenmodifiziertes PDMS	- neurale Stammzellen - humane Epithelcarzinomazelllinie - Ovarienzelllinie des chinesischen Hamsters - humane Corneaepithelzellen	- Nakajima et al., 2007; Ichinose et al., 2006; Kuhl et al., 1996 - Ito et al., 1997 - Klenker et al., 2006, 2005
NGF <i>nerve growth factor</i>	- oberflächenmodifiziertes Glas - Gelatine mit Tricalciumphosphat vernetzt - Micropatterning	- humane Epithelcarzinomazelllinie - Nebennierentumorzelllinie der Ratte - Ovarienzelllinie des chinesischen Hamsters - embryonale Neurone aus dem Hippocampus	- Ichinose et al., 2006; Shibata et al., 2006 - Chen et al., 2005 - Gomez et al., 2007; Ito et al., 1998
LIF <i>leukemia inhibitory factor</i>	- Photoimmobilisierung - ungewebte Polyesterfasern	- murine embryonale Stammzellen	- Makino et al., 2004 - Cetinkaya et al., 2007

1.4.1.2 Effekte der Immobilisierung von Biomolekülen

Um die Differenzierung einer Zelle in eine spezielle Richtung zu induzieren, sind spezifische Signale, Rezeptoren und daraus resultierende Signalkaskaden notwendig. Unabhängig von der Natur des Signals antwortet die Zielzelle mit Hilfe des komplementären Rezeptors. Die meisten Rezeptoren sind Transmembranproteine, die an der Zelloberfläche lokalisiert sind. Die Bindung eines extrazellulären Signalmoleküls bewirkt die Aktivierung des Rezeptors, die eine Kaskade intrazellulärer Signale auslöst und schließlich zur Veränderung der Zelle führt. Liegt der differenzierungsinduzierende Faktor gelöst im Medium vor, ist die Wahrscheinlichkeit, dass Rezeptor und Ligand aufeinander treffen geringer als bei immobilisierten Faktoren. Adhärenz wachsende Zellen sinken nach Ausplattieren in der Zellkultur direkt auf die signalmolekülmodifizierte Oberflächen ab, und es kann direkt eine Interaktion zwischen Signalmolekül und passendem Rezeptor stattfinden. So wurde in der Literatur beschrieben, dass immobilisiert vorliegende Faktoren einen größeren stimulierenden mitogenen Effekt induzieren als es mit gelösten Molekülen möglich war (Abbildung 6 A) [Ito, 2008, Ito et al., 1996]. Hierfür wird sowohl die hohe lokale Konzentration der differenzierungsauslösenden Faktoren herangezogen (Abbildung 6 B) als auch die daraus resultierenden multivalenten Wechselwirkungen (Abbildung 6 D) zwischen Signalmolekül und dem entsprechenden Rezeptor. Eine hohe Anzahl an Signalmolekülen kann zum gleichen Zeitpunkt eine hohe Zahl von Rezeptoren, die in unmittelbarer Nachbarschaft liegen, binden und somit aktivieren. Diese mögliche Multivalenz und Kooperativität von Liganden und komplementären Rezeptoren führt somit zu einer Verstärkung der differenzierungsinduzierenden Signale und Signalkaskaden. So haben beispielsweise Kiessling et al. [2006] den Einsatz synthetisch hergestellter multivalenter Liganden als Sonden für die Signaltransduktion vorgeschlagen und diskutiert. Dabei sind Multiprotein-Signalkomplexe bereits bekannte wichtige Signaleinheiten in neuronalen Synapsen [Kennedy, 2000; Kim et al., 1999], Immunsynapsen zum Beispiel bei T-Zellen [Matsuuchi und Gold, 2001; Dustin und Chan, 2000; Germain, 1997], fokalen Adhäsionskomplexen [van der Flier und Sonnenberg, 2001] und in bakteriellen Chemorezeptorfeldern [Shimizu et al., 2000; Bray et al., 1998].

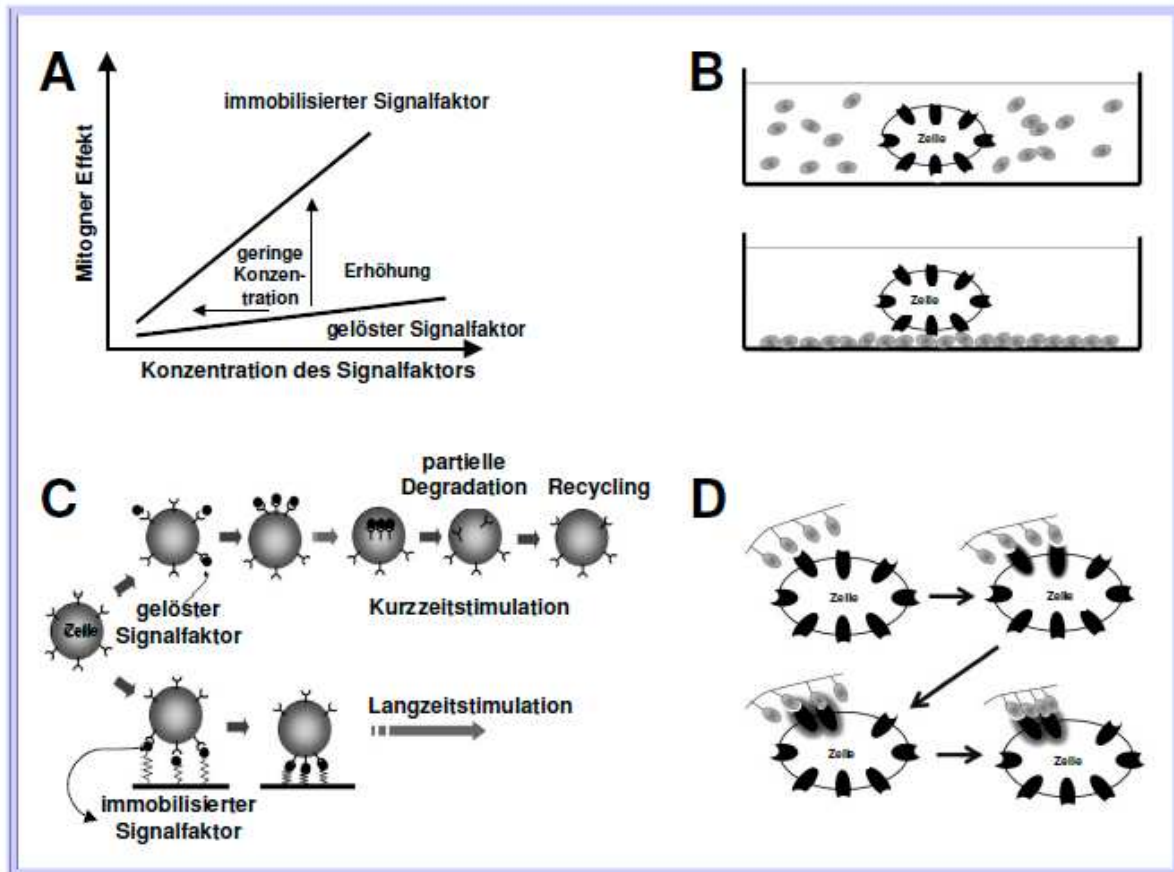


Abbildung 6: Immobilisierte Signalmoleküle induzieren die Verstärkung mitogener Effekte wie Zelladhäsion, Zellproliferation und Zelldifferenzierung (A). Zu begründen sind diese Effekte mit dem direkten Anhaften von adhären wachsenden Zellen auf faktormodifizierten Oberflächen. Dort interagieren die Zellen mit einer höheren Anzahl an Signalmolekülen als mit löslich im Medium vorliegenden Faktoren (B). Weiterhin unterstützen immobilisierte Signalfaktoren die Langzeitstimulation von Zellen im Gegensatz zu gelösten Faktoren, die nach einem gewissen Zeitraum degradiert und dem Recycling zugeführt werden (C). Außerdem führt die hohe lokale Konzentration von immobilisierten Faktoren auf der Kulturoberfläche zu multivalenten Wechselwirkungen (D) [nach Ito, 2008].

Die Inhibierung des Signalfaktorabbaus und Signalfaktorrecyclings wird als ein weiterer positiver Aspekt für die Immobilisierung von Wachstumsfaktoren genannt [Ito et al., 2008]. So bauen Zellen die Signalfaktoren nach einer gewissen Zeit ab und reduzieren somit die Stimulation der signalmolekülinduzierten Reaktionen. Durch die Immobilisierung der Faktoren ist dieses Herunterregulieren der Zellantwort nicht möglich und die Stimulierung hält über einen langen Zeitraum ohne Reduktion der Biomoleküle an (Abbildung 6 C). Um diese Hypothese zu unterstützen, wurden verschiedene Untersuchungen mit sowohl gelöstem als auch immobilisiertem Insulin und EGF durchgeführt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die gekoppelten

Wachstumsfaktoren einen länger anhaltenden Effekt hervorriefen als im Vergleich dazu die in Lösung vorliegenden Faktoren [Ito et al., 1997, 1996].

1.4.2 Automatisierung und Miniaturisierung in der Zellkultur

Der Einsatz von stammzellabgeleiteten Zellen im pharmakologischen und toxikologischen Arbeitsgebiet oder im Bereich der Regenerativen Medizin zum Wiederherstellen geschädigter Gewebe setzt ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit und Standardisierung in der Kultivierung und Differenzierung der entsprechenden Zellpopulationen voraus. Bereits die unterschiedliche Handhabung der verschiedenen Zelllinien oder auch die variablen Strategien bei der Kultivierung und Differenzierung gleicher Zellen macht die Komplexität dieses Entwicklungsbereiches deutlich.

Die Zellkulturtechnologie schafft die Voraussetzungen sowohl für den großtechnischen als auch für den miniaturisierten Einsatz zahlreicher biotechnologischer Entwicklungen. Während zahlreiche molekularbiologische Anwendungen und Analysemethoden zur Charakterisierung von Zellen wie PCR (Polymerase Chain Reaction) bereits erfolgreich im Miniaturmaßstab durchgeführt werden können, ist die Kultivierung und Differenzierung von Zellen lange unbeachtet geblieben. So werden zum Beispiel in der pharmazeutischen Industrie Bio-Chips als Diagnostikinstrumente verwendet und Mikroreaktoren zur Herstellung von Feinchemikalien verwendet. Auch die Miniaturisierung und Automatisierung in der Genomik und Proteomik sind schon weit vorangeschritten. Die Analyse von Hirnschnitten oder auch Ableitungs- und Impedanzmessungen sind bereits auf Mikroelektronen-Assays möglich. Bisherige Arbeiten konnten in miniaturisierten Systemen, zur Testung von adhären Zellen, die Reaktionen und Interaktionen von ES-Zellen auf verschiedenen Biomaterialien [Anderson et al., 2004] und die Kultivierung und Differenzierung über verschiedene ECM-Moleküle über einen kurzen Zeitraum von maximal sieben Tagen [Flaim et al., 2004; Revzin et al., 2004] zeigen. In fluidischen Miniatursystemen konnte bisher die Sortierung und Charakterisierung von Zellen vorgenommen werden [Revzin et al., 2005].

Die Aufrechterhaltung von Zellkulturen und deren gezielte Differenzierung über einen längeren Zeitraum, in welchen Medienwechsel mit eingeschlossen werden müssen, wurden bisher nur ungenügend umgesetzt. So wird zurzeit an Entwicklungen von

miniaturisierten Bioreaktoren für dreidimensionale Zellkulturen sowie von Assays und Assay-Reihen für Zellkulturen gearbeitet. Ein möglicher Ansatz ist dabei die Integration von Biosensoren und fluidischen Messsystemen in miniaturisierten Bioreaktoren zum Einsatz in der biomedizinischen Forschung. Ein weiterer Ansatz ist die Kultivierung und Differenzierung von Zellen auf sogenannten Carriern.

1.4.3 Strukturierte Oberflächen

Die Strukturierung von Materialien und Oberflächen wird zu einem großen Teil zur Optimierung der Eigenschaften von Knochenersatzmaterialien, orthopädischen Implantaten und bakteriziden Oberflächen angewendet. Gerade für die Verbesserung der Oberflächeneigenschaften und der Erhöhung der Verschleißfestigkeit von Implantaten ist die Anwendung von strukturierten Oberflächenbeschichtungen von besonderer Bedeutung [Wang et al., 2008]. Die Verlängerung der Implantatlebensdauer kann auf diesem Weg wesentlich erhöht werden. Hierbei wird in einen erhöhten Forschungsaufwand zur Untersuchung von nanostrukturierten Diamant-, Hydroxylapatit- und Metallkeramikbeschichtungen investiert. Ein hoher Forschungsbedarf besteht zudem in der weiteren Analyse der Grenzfläche zwischen Zelle und Material. Über die Ursachen für das verbesserte Adhäsions- und Proliferationsverhalten von Zellen auf strukturierten Materialien ist der Kenntnisstand bislang gering. Bekannt ist jedoch, dass Nanostrukturen in erheblichem Maße die physikalischen und chemischen Prozesse auf der Oberfläche wie etwa Diffusions- und Wachstumseigenschaften beeinflussen [Mommel und Bertel, 1995]. Um Nanomaterialien in der Implantattechnologie einsetzen zu können, sind weiterführende Untersuchungen notwendig. Forschung an Nanomaterialien für die Herstellung bakterizider Oberflächen scheint besonders im Hinblick auf die Einsatzmöglichkeiten, die über den klinischen Sektor hinausreichen, interessant. Insbesondere der Einsatz von Titandioxid-Nanopartikeln im hygienischen Bereich wie beispielsweise der Trinkwasserversorgung wurden dabei in Betracht gezogen [VDI-Technologiefrüherkennung, Nanotechnologie II, 2004].

1.5 Zielsetzungen der Arbeit

In Anbetracht des Bedarfs an zellulärem Material mit gleich bleibender Qualität zum Einsatz in der Regenerativen Medizin hat die vorliegende Arbeit die Entwicklung von bioaktiven Materialien für die Langzeitkultivierung und Langzeitdifferenzierung von Stammzellen unter definierten und kontrollierten Bedingungen zum Ziel. Ein Ansatz, der die Standardisierung der Zellkultur unterstützt, ist die Immobilisierung von Wachstumsfaktoren auf biokompatiblen Oberflächen. Die Anwendung solcher bioaktiver Materialien bietet zudem den Vorteil, die Bereitstellung qualitativ gleichbleibender Zellen für den Einsatz in der Rekonstruktionsmedizin zu sichern. Die Immobilisierungstechnologie von Wachstumsfaktoren und anderen Signalgebern ermöglicht zudem die Nachahmung der natürlichen und zellulären Mikroumgebung von Stammzellen und anderen Zelltypen. Insbesondere das Gestalten dieser Stammzellnischen in Form von Gradienten und Konzentrationsgefällen eröffnet Chancen, das Verhalten von Stammzellen in ihrer natürlichen, physiologischen Umgebung studieren zu können und somit weiterführende Erkenntnisse über die Grundlagen des Stammzellverhaltens bei der Kultivierung und Differenzierung zu gewinnen.

Die Standardisierung in der Zellkulturtechnik kann weiterhin über die Prozessautomatisierung und Prozessparallelisierung unterstützt werden. Dabei ist die Zellkultivierung und Zelldifferenzierung auf Carriersystemen denkbar, die durch eine elektromagnetische Manipulation parallel verschiedensten Analyse- und Differenzierungsmodulen zugeführt werden können. In einem ersten Schritt zur Entwicklung eines solchen automatisierten Systems soll in dieser Arbeit die Übertragung der gezielten Stammzelldifferenzierung sowohl über lösliche als auch immobilisierte Signalfaktoren von der Laborstandardgröße auf ein miniaturisiertes Zellkultursystem umgesetzt werden.

Folgende Ziele werden in der vorliegenden Arbeit verfolgt:

1. Gezielte Differenzierung von humanen Monozyten und adulten Stammzellen (CEsub2b, MApan9i) mittels löslicher Faktoren als Grundlage für die gerichtete festphaseninduzierte Stammzelldifferenzierung
2. Induktion der direkten Differenzierung von humanen Monozyten und adulten Stammzellen (CEsub2b, MApan9i) mittels immobilisierter Faktoren über die Festphase
3. Übertragung der gezielten Differenzierung von der Oberfläche in Laborstandardgröße auf ein miniaturisiertes System (Zellcarrier-System).

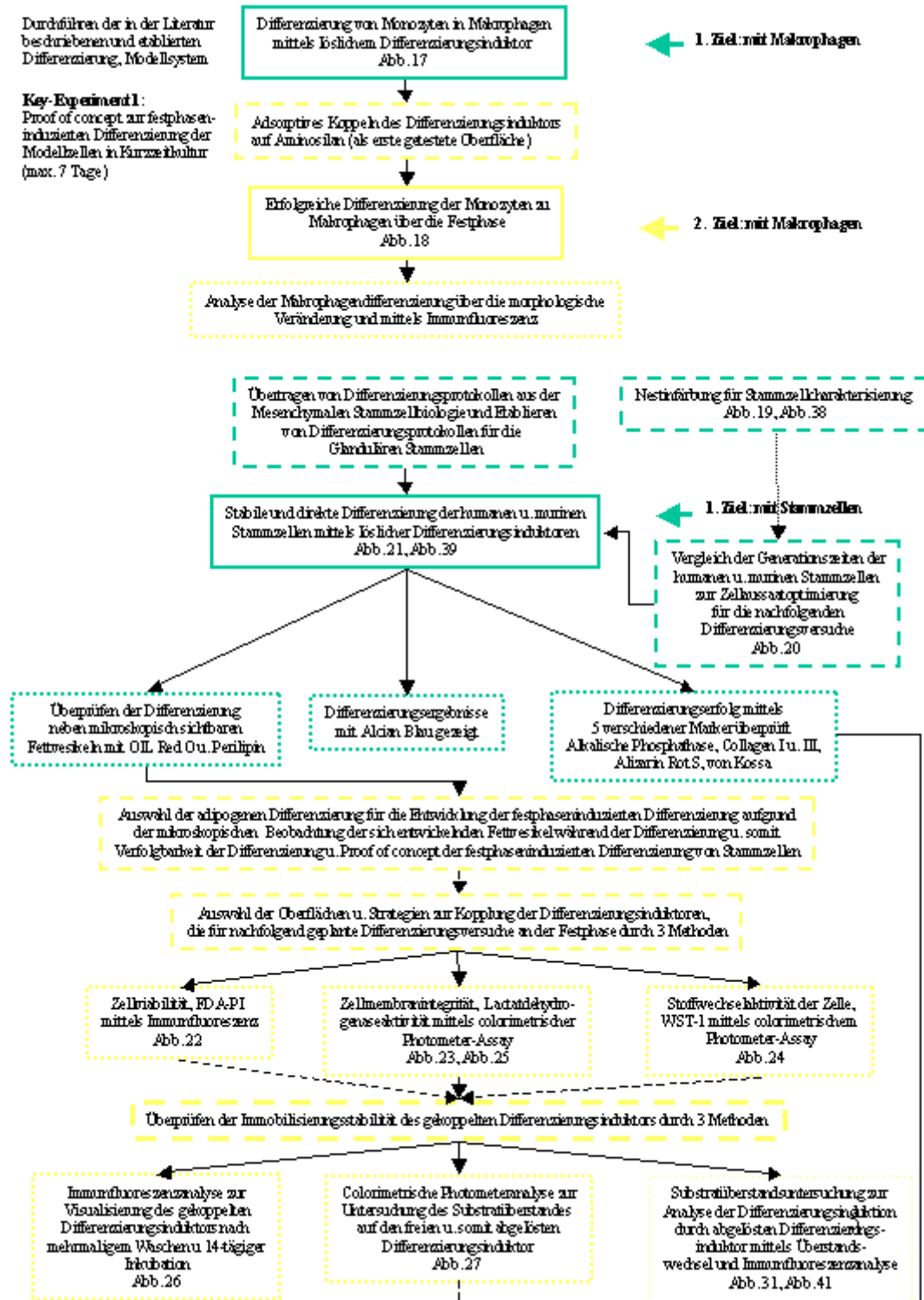
1.6 Strukturierung der Experimente zur Erarbeitung der Zielsetzungen

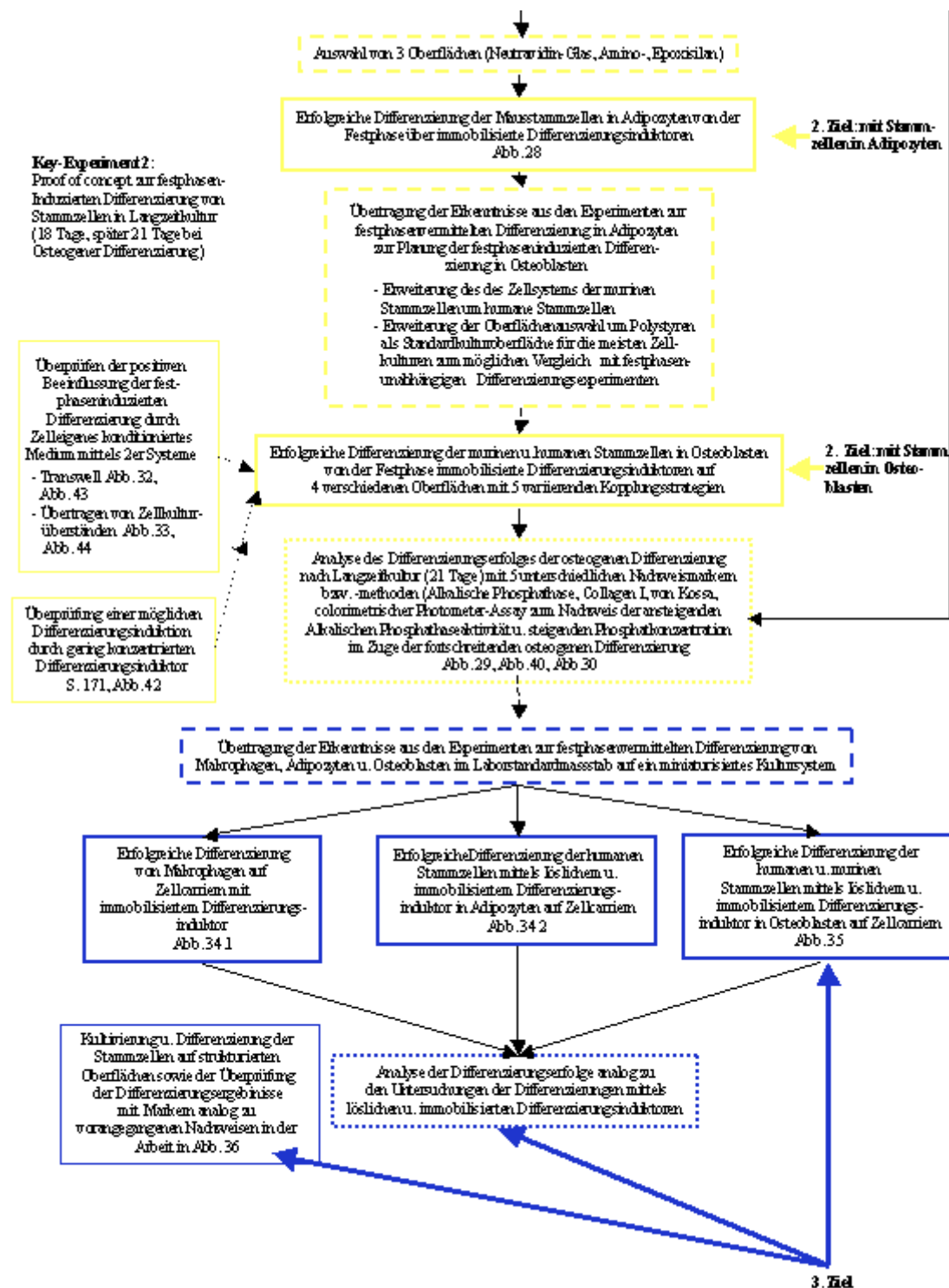
Zur Übersichtlichkeit und Nachvollziehbarkeit der durchgeführten Experimente wurden diese in der nachstehenden Graphik schematisch dargestellt und farblich den entsprechenden Zielsetzungen zugeordnet.

Aus der graphischen Darstellung der Versuchsabfolgen dieser Arbeit ist ersichtlich, wie die Experimente zum Erreichen der drei Zielsetzungen durch Keyexperimente methodisch vorbereitet, mittels ergänzender Experimente abgerundet und anschließend analysiert wurden. Den drei Zielsetzungen der Arbeit wurde jeweils eine einzelne Farbe zugewiesen. Dem ersten Ziel wurde hierfür in der graphischen Darstellung die Farbe Grün zugewiesen. Die Versuche und Analysen, die der Erarbeitung des zweiten Zieles dienten, sind in der Farbe Gelb dargestellt. Der Block des dritten Zieles ist durch die Farbe Blau ersichtlich.

Durchführen der in der Literatur beschriebenen und etablierten Differenzierung, Modellsystem

Key-Experiment 1:
Proof of concept zur festphasen-induzierten Differenzierung der Modellzellen in Kurzzeitzkultur (max. 7 Tage)





Legende:

1. Ziel



2. Ziel



3. Ziel



Vorarbeiten



Ergebnis



Analyse



Ziel erreicht



aufeinander folgende Bereiche, die einer gemeinsamen Einheit gehören



Verbindung einzelner Einheiten

Ergänzende Versuche, die nicht in den Zielvorgaben enthalten sind,
jedoch die Arbeit abrunden

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller	Sitz
Bildbearbeitung	Adobe Photoshop	Microsoft	München
Brutschrank	BBD 6220	Heraeus Instruments GmbH	Hanau
Durchflusszytometrie (fluorescence activated cell sorting)	FACS Calibur	BD Bioscience GmbH	Heidelberg
Feinwaage	CP 64	Sartorius	Göttingen
Fluoreszenzlampe	USH-1030L	Olympus Deutschland GmbH	Hamburg
Fluoreszenzmikroskop	Axiosphot	Carl Zeiss	Jena
Fluoreszenzmikroskop	Observer Z1	Carl Zeiss	Jena
-70°C-Gefrierschrank	HERA freeze	Heraeus Instruments GmbH	Hanau
Inverses Durchlichtmikroskop mit Fluoreszenzeinheit	IX-70	Olympus Deutschland GmbH	Hamburg
Mikrotome, Kryostat	CM 3050	Leica	Wetzlar
Magnetrührer	IKAMAG Ret-GS	Jahnka und Kunkel	Staufen
Mehrkanalpipetten	Research pro	Eppendorf	Hamburg
Mikroskopkamera	IX-TVAD, CC-12	Olympus Deutschland GmbH	Hamburg
Mikrotiterspektrophotometer	Spectra Flour, infinite F200	Tecan	Crailsheim
N ₂ -Kryobehälter	Kryo ARPEGE 40	Omnilab	Mettmenstetten, Schweiz
pH-Meter	Portamess Typ 911 pH	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co	Berlin
Photometer	Absorptions- Einstrahlphotometer mit	Eppendorf	Hamburg

	Referenzstrahl		
Pipetten	resaerch	Eppendorf	Hamburg
Pipette Boy	Pipete Boy acu	IBS Integra Bioscience	Chur, Schweiz
Sterile Werkbank	BDK	Luft- und Reinraumtechnik GmbH	Sonnenbühl-Genkingen
Zellzählgerät	CASY	Schärfe System GmbH	Reutlingen
Zentrifuge	Megafuge 3.0 R	Heraeus Instruments GmbH	Hanau
Rotor	8074	Heraeus Instruments GmbH	Hanau
Zentrifuge	Biofuge primo R	Heraeus Instruments GmbH	Hanau
Rotor	7591	Heraeus Instruments GmbH	Hanau
Vakuum-Absaugpumpe	Vacusafe	IBS Integra Bioscience	Chur, Schweiz
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries	New York, USA
Wasserbad	Julabo 13	Julabo	Seelbach

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Material	Katalog-Nr.	Hersteller	Sitz
Feinpipetten		Eppendorf	Hamburg
Filtereinheit (0,2µm)	120-0020	Nalgene	Hereford, UK
Filtereinheit (0,4 µm)	90491022	Sarstedt	Nümbrecht
Kryoröhrchen (1,8ml)	377267	Nunc	Wiesbaden
Küvette (UVette®)	0030 106.300	Eppendorf	Hamburg
Objekträger (silanisiert)	0800000	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG	Lauda-Königshofen
Pap Pen	Pap Pen 35	Kisker	Steinfurt
96-, 12-, 24-, 6-well-Platten		Costa Corning	Schiphol-Rijk, Niederlande
Reagent Reservoirs	82026-352	VWR International GmbH	Darmstadt
Tissue Freezing Medium	020108926	Jung	Nussloch
Transwell; 0,4µm	353090	BD Bioscience GmbH	Heidelberg
Zellkulturschalen		Greiner Bio-One GmbH	Frickhausen

2.1.3 Chemikalien

Chemikalie	Katalog-Nr.	Hersteller	Sitz
Alcian Blue 8GX	AS-268	Sigma Aldrich	Taufkirchen
Alizarin Red S	05600	Fluka	Taufkirchen
Alkalische Phosphatase-Kit	86R-1KT	Sigma Aldrich	Taufkirchen
Amine Coupling Kit	BR-1000-50	Biacore	Uppsala, Schweden
Ascorbinsäure	255564	Sigma Aldrich	Taufkirchen
Ammoniumheptamolybdat-tetrahydrat	M1019	Sigma Aldrich	Taufkirchen
B-Glycerolphosphat	35675	Calbiochem	Darmstadt
BSA	B9001	New England Biolabs	Frankfurt
Chloroform	160044	Merck	Darmstadt
Coating Buffer pH 7,4	120125 o. 120500	Candor Bioscience GmbH	Weißensberg
Coating Buffer pH 9,6	121125 o. 121500	Candor Bioscience GmbH	Weißensberg
Dexamethason	D4902	Sigma Aldrich	Taufkirchen
DMEM	41965	GIBCO	Karlsruhe
DMSO	D-2650	Sigma Aldrich	Taufkirchen
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS, 1x), pH 7,2	20012	GIBCO	Karlsruhe
Ethanol	UN 1170	Merck	Darmstadt
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid	22980	Pierce	Bonn
EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotinylierungs-Kit	21435	Pierce	Bonn
Formalin	F-8775	Sigma Aldrich	Taufkirchen
Fötales Kälberserum	F7524	Sigma Aldrich	Taufkirchen
Indomethacin	57413	Fluka	Taufkirchen
3-Isobutyl-1-methylxanthin	15879	Sigma Aldrich	Taufkirchen
Isopropanol	1.09634.2511	Merck	Darmstadt
Laktatdehydrogenase-Kit	11644793001	Roche	Mannheim

L-Glutamin	35050	GIBCO	Karlsruhe
MEM Alpha Medium TM -I	32561	GIBCO	Karlsruhe
Methanol	K32118909 322	Merck	Darmstadt
1-Methylimidazol	67560	Fluka	Taufkirchen
Natriumpyruvat	3068353	GIBCO	Karlsruhe
Neutravidin	31000	Pierce	Bonn
Oil Red O	O0625	Sigma Aldrich	Taufkirchen
Penicillin/ Streptomycin	15140	GIBCO	Karlsruhe
p-Nitrophenyl Phosphate Liquid Substrate System	N 7653	Sigma Aldrich	Taufkirchen
BMP2-, IGF-1-Quantikin-Kit	DBP200, DG100	R&D Systems GmbH	Wiesbaden
RPMI 1640	F1215	Biochrom AG	Berlin
Silbernitrat	S6506	Sigma Aldrich	Taufkirchen
Triton-X 100	37240	Serva	Heidelberg
Trypsin-EDTA (10x)	25400-054	GIBCO	Karlsruhe
Vectashield	H-1400	Vector Laboratories	Burlingame,CA,USA
WST-1-Kit	05015944001	Roche	Mannheim

2.1.4 Antikörper

Primäre Antikörper

Antigen	Antigen-Beschreibung	Verdünnung/ Vorbehandlung	Art	Katalog-Nr.	Hersteller
BMP-2	gehört zu der TGF β -Superfamilie und spielt neben verschiedenen Prozesse während der embryonalen Entwicklung eine wichtige Rolle bei der Formierung von Knorpel und Knochen	1:150 -	human, IgG1	PK-AB913-183	Promocell
Collagen Typ I	hauptsächlich im Knochen lokalisiert, außerdem in Haut, Faszien, Sehngewebe	1:150 Triton	human, IgG1 mouse, IgG	C2456 AB765P	Sigma Aldrich Chemicon
Collagen Typ II	vor allem im Knorpel anzutreffen, essentielle Rolle während der embryonalen Entwicklung des Skeletts und sorgt für Festigkeit bei Druckbelastung	1:150 Triton	mouse, IgG	AB2031	Chemicon
Collagen Typ III	Hauptbestandteil von retikulären Fasern, ist im retikulären Bindegewebe zu finden	1:150 Triton	human, IgG1 mouse IgG	C 7805 ab49436	Sigma Aldrich Abcam
IGF-1	ähnelt der Molekularstruktur von Insulin, reguliert Glukoseaufnahme und die Synthese von Fett	1:150 -	mouse, IgG	PK-AB815-60840	Promocell
MAX.-1	weist den Oberflächenmarker Carboxypeptidase M auf reifen Makrophagen nach, dessen Expression während der <i>in vitro</i> Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen stark ansteigt	1:100 -	human	-	Marina Kreutz Universität Regensburg
Nestin	Marker für undifferenzierte Stammzellen und Zytoskelettbestandteil u.a. neuraler Vorläuferzellen	1:150 Triton	human, IgG1 mouse, IgG1	MAB1259 ab6142	R&D Systems Abcam
Perilipin A	intrazelluläres Oberflächenprotein in Lipidtropfen neuraler Fette von Adipozyten	1:150 -	human mouse	P 1998	Sigma Aldrich
IgG1	Isotypkontrolle, FITC-markiert	1:150 Triton	human, IgG1	ab81032	Abcam

Sekundäre Antikörper

Konjugat	Verdünnung	Art	Katalog-Nr	Hersteller
Alexa Fluor 488	1:300	Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L)	A11034	Invitrogen, Molecular Probes
Alexa Fluor 488	1:300	Ziege anti-Maus IgG (H+L)	A11029	Invitrogen, Molecular Probes
Alexa Fluor 546	1:300	Ziege anti-Maus IgG (H+L)	A11003	Invitrogen, Molecular Probes

2.1.5 Wachstumsfaktoren

Material	Katalog-Nr.	Bezeichnung	Hersteller	Sitz
h-BMP-2	40-261	Bone Morphogenic Protein-2	NatuTech	Frankfurt
h-IGF-1	40-216	Insuline-like Growth Factor-1	NatuTech	Frankfurt
h-M-CSF	C-60442	Macrophage Colony Stimulating Factor	Promokine	Heidelberg
h-TGFβ-3	C-63505, 40-368	Transforming Growth Factor-3	Promokine, NatuTech	Heidelberg, Frankfurt
AB-Serum	P-302501	Humanserum Typ AB	PAN Biotech GmbH	Aidenbach

2.1.6 Primärzellen und Zelllinien

Primäre Vorläuferzellen

Monozyten bzw. mononukleäre Zellen

Diese Zellen des peripheren Blutes wurden aus Leukozyten-Konzentraten von Blutproben gesunder Spender mittels Dichtegradienten-Zentrifugation isoliert.

Adulte Stammzellen: Glanduläre Stammzellen (GSCs)

CEsub2b (Glanduläre Stammzellen der Speicheldrüse, salivary gland stem cells - SGSCs)

Hierbei handelt es sich um eine Zelllinie, die aus humanem Gewebe der Glandula submandibularis, einer der beiden Speicheldrüsen des Unterkiefers, isoliert wurde.

MApan9i (Glanduläre Stammzellen des Pankreas, pancreatic stem cells - PSCs)

Diese murine Zelllinie wurde aus dem Pankreas gewonnen.

Alle oben aufgeführten Zelllinien wurden anhand des von Charlie Kruse [2004, 2006] entwickelten Protokolls isoliert und nach anschließender Kultivierung Dauerkulturen in flüssigem Stickstoff angelegt.

2.1.7 Medien und Medienzusätze

Das Inaktivieren der den Medien zugesetzten Seren erfolgte grundsätzlich für 30 min bei 56 °C im Wasserbad.

Medien und Medienzusätze für die Zellkultur der mononukleären Zellen

Medium zur Differenzierung von M-CSF-Makrophagen

- RRPMI 1640
 - 20% hitzeinaktiviertes FKS (Fötales Kälberserum)
 - 500 U/ml M-CSF
- zu RPMI 1640 geben

Medium zur Differenzierung von AB-Makrophagen

- RRPMI 1640
 - 10% hitzeinaktiviertes FKS
 - 10% hitzeinaktiviertes humanes AB-Serum
- zu RPMI 1640 geben

Medien und Medienzusätze für die Zellkultur der GSCs

DMSO-Einfriermedium

- 90% FKS
- 10% DMSO

Formaldehyd/PBS

→ 4% Formaldehyd in PBS

Trypsin/EDTA 1x (0,125%)

- 1 ml 10x Trypsin/EDTA
- in 9 ml PBS lösen

2.1.8 Zellkulturmedien

Medien zur Kultivierung und Differenzierung der GSCs

Medium zur Kultivierung der GSCs

- DMEM
 - 10% FKS
 - 50 U/ml Penicillin
 - 50 µg/ml Streptomycin
- bei + 4 °C aufbewahren

Medien zur Differenzierung von adulten Stammzellen mittels löslicher Faktoren

Adipogenes Differenzierungsmedium

- MEM Alpha Medium TM -I
 - 15% (v/v) hitzeinaktiviertes FKS
 - 50 U/ml Penicillin
 - 50 µg/ml Streptomycin
 - 10 nm Dexamethason (+/-)
 - 500 µM IBMX
 - 60 µM Indomethacin
 - Differenzierungsinduktoren: IGF-1 (100 ng/ml)
- bei + 4 °C aufbewahren

Osteogenes Differenzierungsmedium

- MEM Alpha Medium TM -I
 - 15 % hitzeinaktiviertes FKS
 - 50 U/ml Penicillin
 - 50 µg/ml Streptomycin
 - 10 nm Dexamethason (+/-)
 - 50 µM Ascorbinsäure
 - 5 mM β-Glycerolphosphat
 - Differenzierungsinduktoren: BMP-2 (100 ng/ml)
- bei + 4 °C aufbewahren

Chondrogenes Differenzierungsmedium

- MEM Alpha Medium™ -I
 - 1% (v/v) IST-Supplement
 - 50 U/ml Penicillin
 - 50 µg/ml Streptomycin
 - 10 nm Dexamethason
 - 50 µM Ascorbinsäure
 - 1 mM Natriumpyruvat
 - Differenzierungsinduktoren: TGF β-3 (10 ng/ml)
- bei + 4 °C aufbewahren

Medien zur Zelldifferenzierung mit immobilisierten Faktoren

Für die Differenzierung der hier verwendeten adulten Stammzellen mittels immobilisierter Wachstumsfaktoren wurde für die adipo- bzw. osteogene Differenzierungsrichtung das entsprechende Medium ohne differenzierungs-induzierende Zytokine appliziert. Die Faktoren wurden ausschließlich von der Oberfläche angeboten. In gleicher Weise wurde für die Differenzierung der Makrophagen mittels des immobilisierten Zytokines M-CSF verfahren.

2.1.9 Immunhistochemie

Formaldehyd/PBS

→ 4% Formaldehyd in PBS

Antikörper-Verdünnungs-Lösung

- 1% NGS (Normal Goat Serum) oder FKS in PBS
- 0,1% Natrium-Azid
- 0,1% Triton (optional)

Block-Lösung

- 5% NGS oder NDS oder FKS in PBS
- 0,1% Triton (optional)

DAPI-Puffer

- 10 mM NaHCO₃
- in ddH₂O gelöst und pH 2 M HCL auf 8,2 eingestellt

2.2 Zellbiologische Methoden

Die Kultivierung und Differenzierung humaner Zellen sowie Zellen aus der Maus erfolgte grundsätzlich bei einer Temperatur von 37 °C, einem CO₂-Gehalt von 5% und einer 95%igen Luftfeuchtigkeit.

Um Kontaminationen mit Pilzen und Bakterien zu vermeiden, wurde bei der Kultur von Zellen stets steril und unter aseptischen Bedingungen gearbeitet.

2.2.1 Isolierung peripherer Blutzellen

2.2.1.1 Blutspender

Leukozyten-Konzentrate („buffy coats“) wurden von der Blutbank der Winterbergklinik in Saarbrücken zur Verfügung gestellt. Die Blutproben der Spender wurden dabei auf HIV-1-, HIV-2 sowie Hepatitis B- und-C-Virus getestet.

2.2.1.2 Isolierung mononukleärer Zellen mittels Dichtegradienten-Zentrifugation

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs, peripheral blood mononuclear cells) wurden aus Leukozyten-Konzentraten mittels Dichtegradienten-Zentrifugation isoliert. „Buffy coats“ fallen bei der Herstellung von Blutkonserven durch Zentrifugieren und Abnahme des Plasmas an und enthalten neben PBMCs auch Erythrozyten, Thrombozyten und Granulozyten. Die Konservenbeutel, in welche das Blut bei der Entnahme gelangt, enthalten Antikoagulationen. Diese wirken der Gerinnung des Blutes entgegen.

Der Inhalt eines „buffy coat“ wurde zu gleichen Teilen mit PBS verdünnt. 20 ml Ficoll Paque[®]-Lösung (Dichte: 1,077 ± 0,001 g/ml) wurden in einem 50-ml-Röhrchen vorgelegt und vorsichtig mit 30ml der verdünnten Suspension überschichtet. Nach 30minütiger Zentrifugation bei 2000 rpm (943 g) trennten sich die Zellen aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte in verschiedene Banden auf. Das Zentrifugieren der

Suspension aus „buffy coat“ und PBS erfolgte dabei ohne Bremse, so dass die entstehenden Gradienten beim Bremsvorgang nicht wieder zerstört wurden. Die Erythrozyten und Granulozyten besitzen eine hohe Dichte und sedimentieren, während sich die PBMCs in der Interphase zwischen Serum/PBS und Ficoll Paque[®] befinden. Aufgrund der geringen Dichte der Thrombozyten sammelten sich diese im Überstand oberhalb der Zwischenschicht. Die PBMCs-enthaltende Zwischenschicht wurde nach dem Zentrifugationsschritt vorsichtig mit einer 10-ml-Pipette abgezogen. Beim Aufnehmen der Zwischenschicht wurde stets ein Teil des Überstandes mit überführt, so dass die PBMCs mit Thrombozyten verunreinigt waren. Um die Thrombozyten und auch die anhaftenden Ficoll[®]-Rückstände zu entfernen, schloss sich an das Abziehen der Interphase ein dreimaliger Waschschrift an, bei dem das Pellet in 50 ml PBS resuspendiert und danach bei 1000 rpm fünf Minuten zentrifugiert wurde. Anschließend wurde eine Zellzahlbestimmung im CASY[®] durchgeführt.

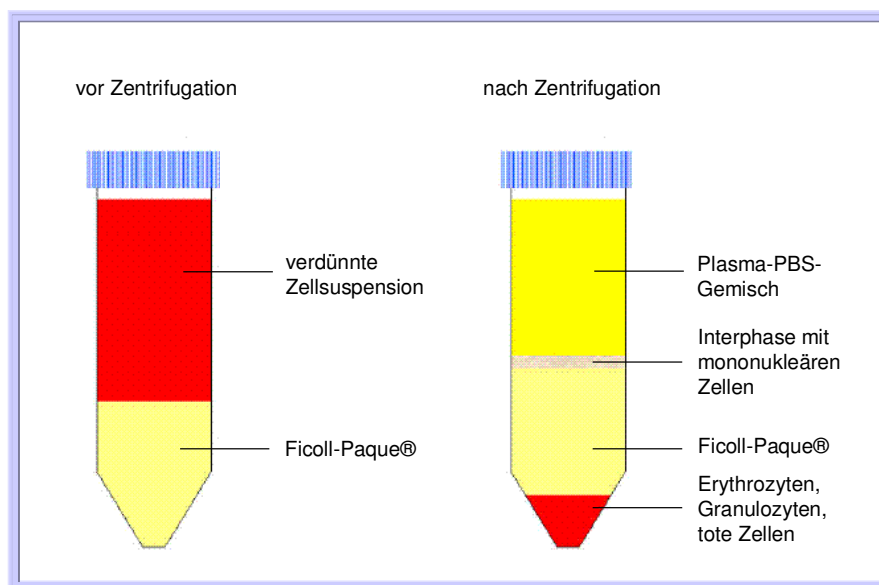


Abbildung 7: Funktionsprinzip der Dichtegradientenzentrifugation.

2.2.1.3 Adhärenz von Monozyten an Plastikoberflächen

Die PBMCs wurden mittels Adhärenz an Plastik weiter in unterschiedliche Zellpopulationen getrennt. Hierzu wurden die Zellen in RPMI mit 1% FKS aufgenommen, in eine 175 cm²-Zellkulturflasche überführt und zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Die nicht adhärenen Lymphozyten des peripheren Blutes (PBLs, peripheral blood lymphocytes) wurden abgenommen und verworfen. Die adhärenen Monozyten hingegen wurden vorsichtig mit PBS gewaschen und durch Zugabe von Zytokinen zu Makrophagen ausdifferenziert.

Die nicht adhärenente Zellpopulation machte einen Anteil der PBMCs von ca. 90% aus, bei den verbleibenden 10% der Zellen handelte es sich dann um adhärenente Monozyten.

2.2.2 *In-Vitro*-Differenzierung von mononukleären Zellen

2.2.2.1 *In-Vitro*-Differenzierung von AB- und M-CSF-Makrophagen

Nach Isolierung und Aufreinigung der Monozyten wurden die Zellen in RPMI + „Makrophagenmix“ über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

Zur Differenzierung von Makrophagen mittels M-CSF wurden PBMCs am nächsten Tag in geeignete Zellkulturgefäße überführt und mit RPMI + „Makrophagenmix“ und 500 U/ml M-CSF ausgesät. Im Anschluss wurden die Zellen ein bis sechs Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Um eine Ausdifferenzierung der Monozyten zu AB-Makrophagen zu erreichen, wurden die Zellen mit RPMI + „Makrophagenmix“ und 4% humanem AB-Serum überschichtet.

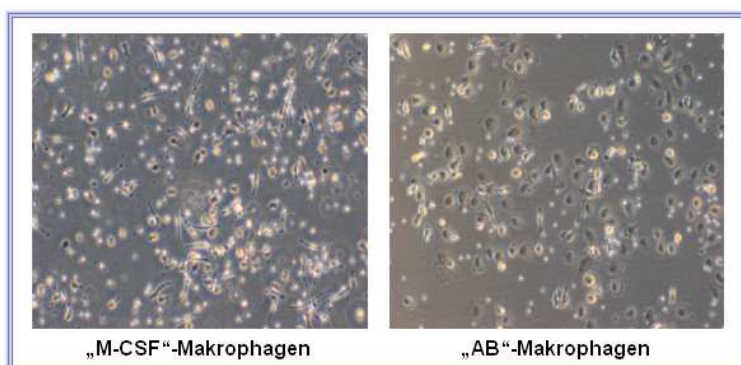


Abbildung 8: *In-vitro*-Differenzierung von Monozyten in AB- und M-CSF-Makrophagen

2.2.3 Zellkultur der Glandulären Stammzellen (GSCs)

2.2.3.1 Auftauen der GSCs

Ein Kryoröhrchen mit der gewünschten Zell-Linie wurde zügig im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in ein 15 ml Falcon-Röhrchen mit 6 ml DMEM überführt. Um zu gewährleisten, dass alle Zellen dem Röhrchen entnommen wurden, wurde mit 1 ml Medium gespült. Die Zellen wurden bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet in DMEM resuspendiert und die Suspension wurde in Abhängigkeit vom experimentellen Aufbau in geeignete Zellkulturgefäße, überführt, in denen bereits Kultivierungsmedium vorlag. Die Kulturen wurden anschließend bei 37°C, 5% CO₂ und bei gesättigter Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert.

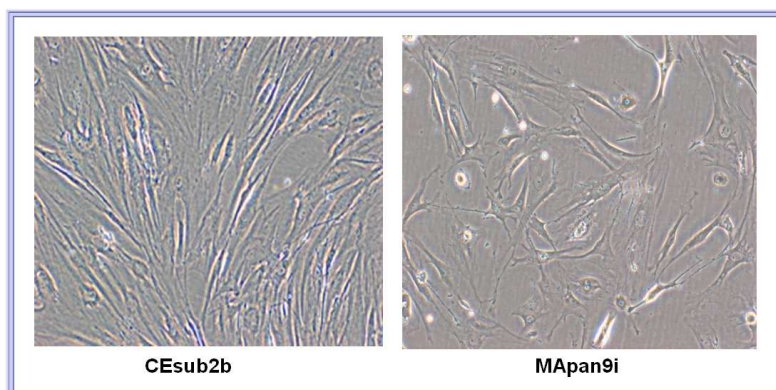


Abbildung 9: Mikroskopische Aufnahmen im Phasenkontrast von adulten Stammzellen isoliert aus exokrinem Drüsen- gewebe unterschiedlicher Spezies.

2.2.3.2 Passagieren der GSCs

Um zu gewährleisten, dass das im Kulturmedium enthaltene FKS restlos entfernt wurde und eine anschließende Trypsinierung zum Ablösen der Zellen vom Schalenuntergrund erfolgen kann, wurde nach Absaugen des Mediums der Zellrasen dreimal mit PBS gewaschen. Nachdem der Zellrasen vier bis fünf Minuten mit Trypsin/EDTA im Brutschrank inkubiert wurde, konnten die Zellen durch zusätzliches „kräftiges Schlagen“ („Shake-off“-Verfahren) gegen den Rand des Kulturgefäßes von der Wachstums-oberfläche abgelöst werden. Dieser Vorgang wurde unter dem Mikroskop verfolgt. Um die Wirkung des Trypsins zu stoppen, wurde das Kulturmedium zugegeben und die Zellsuspension für fünf Minuten bei RT und 1000 rpm (285 x g) zentrifugiert. Der Überstand wurde danach verworfen und das Zellsediment in einem entsprechenden Volumen des Kulturmediums resuspendiert.

Es erfolgte anschließend, abhängig von den Experimenten, die Inkubation der Zellen unter spezifischen Bedingungen.

2.2.3.3 Kryokonservieren der GSCs

Um bei fortschreitenden Experimenten immer auf Zellen zurückgreifen zu können, müssen Dauerkulturen zur Lagerung in flüssigem Stickstoff angelegt werden.

Hierzu wurden die Zellen durch Trypsinierung geerntet und anschließend für fünf Minuten bei RT und 1000 rpm (285 x g) zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in eiskaltem Einfriermedium resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Die Röhrchen wurden danach in einen „MisterFrosty“ gestellt und dieser wurde 24 h bei -70°C gelagert. Der mit Isopropanol gefüllte „MisterFrosty“ gewährleistet ein langsames und schonendes Einfrieren der Zellen mit einer hohen Überlebensrate. Am nächsten Tag wurden die Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.4 *In Vitro*-Differenzierung der GSCs

Adipogene Differenzierung der GSCs

Die adulten Stammzellen, isoliert aus exokrinem Drüsengewebe des Menschen und der Maus, wurden in sechs Wells ausplattiert und bis zu einer Konfluenz von 80% in Kulturmedium bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Im Anschluss daran wurde das Kulturmedium durch das Differenzierungsmedium ersetzt und es erfolgte eine weitere Inkubation für zwei bis drei Wochen, wobei ein Mediumwechsel alle drei bis vier Tage vorgenommen wurde. Die adipogene Differenzierung wurde hierbei durch IGF-1 induziert. Parallel dazu wurden die Kontrollzellen im Differenzierungsmedium ohne Induktoren kultiviert.

Osteogene Differenzierung der GSCs

Die GSCs des Menschen und der Maus wurden ebenfalls bis zum Erreichen einer Konfluenz von 80% in Kulturmedium gehalten. Anschließend wurde die Induktion der Osteogenese durch den Wechsel des Mediums auf osteogenes Differenzierungsmedium eingeleitet. Als differenzierungsinduzierendes Zytokin kam hierbei BMP-2 zum Einsatz. Für einen Zeitraum von 21 Tagen wurden die Zellen in osteogenem Differenzierungsmedium kultiviert, wobei ein Austausch des Mediums

alle drei bis vier Tage erfolgte. Als Kontrollen wurden die hier eingesetzten adulten Stammzellen kultiviert, die identisch zu den Zellen in Differenzierungsmedium behandelt wurden. Im Anschluss an den Differenzierungszeitraum wurden die Zellen mit 4% Formaldehydlösung fixiert und in den nachfolgenden Schritten eine Alkalische Phosphatase-Färbung durchgeführt bzw. das intrazelluläre Collagen Typ I oder III mittels Fluoreszenz nachgewiesen.

Chondrogene Differenzierung der GSCs

Wie für die beiden vorangegangenen Differenzierungsrichtungen wurden die GSCs für die chondrogene Differenzierung bis zu einer Dichte von 80% kultiviert und anschließend in einem chondrogenen Differenzierungsmedium, welches bzw. TGF β -3 enthielt, kultiviert. Nach 21 Tagen wurde eine Alcian Blau- bzw. eine anti-Collagen Typ II- Färbung durchgeführt.

Zusätzlich zu der Differenzierung im Monolayer wurde die chondrogene Differenzierung auch in Pelletkulturen durchgeführt. Hierbei wurden die Pelletkulturen einen Tag nach Einsaat in die Röhrchen zur chondrogenen Differenzierung verwendet. Das Kulturmedium wurde dabei durch 1ml chondrogenes Differenzierungsmedium ersetzt und es folgte eine Inkubation von 21 Tagen, wobei alle drei bis vier Tage ein Mediumwechsel stattfand. Zur Kontrolle wurden ebenfalls Pellets im Differenzierungsmedium ohne TGF β -3 inkubiert. Nach Abschluss der Inkubationszeit wurden Kryoschnitte der Zellaggregate angefertigt. Die Bildung der chondrogenen extrazellulären Matrix wurde analog zu der Differenzierung im Monolayer durch Alcian Blau- und anti-Collagen Typ II- Färbungen analysiert.

2.3 Analytische Methoden

2.3.1 Ermittlung der Populationsverdopplung

Zur Abschätzung der proliferativen Aktivität der gegebenen Zellkulturen wurde aus den ermittelten Lebendzellzahlen die Populationsverdopplung (PD) der für die Arbeit herangezogenen Zellen berechnet.

Die zu untersuchenden Zellen wurden in einer bestimmten Zellzahl ausplattiert. Über einen Zeitraum von zehn Tagen wurde täglich die Zellzahl mit Hilfe des Zellsystems CASY ermittelt. Aus diesen Messergebnissen konnte mittels der Formel:

$$PD = \frac{\lg V_f}{\lg 2}$$

die Populationsverdopplung berechnet werden.

V_f = Vervielfachung

2.3.2 Immunzyto- und histochemische Methoden

2.3.2.1 Fluoreszenzfärbung

Zum Anfärben spezifischer Proteine benutzt man fluoreszenzmarkierte, zelltypspezifische Antikörper. Dabei handelt es sich um Proteine, die vom Vertebraten-Immunsystem als Abwehr gegen Infektionen gebildet werden. Antikörper erkennen spezifische Zielmoleküle, die man als Antigene bezeichnet. Man unterscheidet monoklonale und polyklonale Antikörper. Monoklonale Antikörper erkennen nur einen spezifischen Teil des Antigens. Sie werden aus einem immortalisierten Zellklon eines einzelnen antikörperproduzierenden B-Lymphozyten hergestellt. Polyklonale Antikörper gewinnt man durch die Injektion des Antigens in ein Tier und Sammeln des antikörperreichen Serums. In diesem Antiserum ist eine heterogene Mischung von Antikörpern enthalten, die alle von unterschiedlichen B-

Lymphocyten gegen das Antigen gebildet wurden. Wenn die Antikörper an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind, können sie mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden und so das spezifische Protein, das mit ihnen markiert wurde, kennzeichnen. Um eine Signalverstärkung zu erreichen, benutzt man einen unmarkierten primären Antikörper. Dieser wird durch mehrere Moleküle des sekundären Antikörpers erkannt. Dieser sekundäre Antikörper ist kovalent mit einem Fluoreszenzmolekül gekoppelt und macht so das gesuchte Protein sichtbar. Eine weitere Verstärkung des Signals wird erreicht, wenn als sekundärer Antikörper ein biotinyliertes Protein zum Einsatz kommt, das durch einen avidingekoppelten Farbstoff erkannt wird. Die Fluoreszenzfarbstoffe selbst absorbieren Licht bei Anregung durch eine bestimmte Wellenlänge und emittieren anschließend Licht einer längeren Wellenlänge.

Die zu färbenden Zellen der unterschiedlichen Differenzierungsrichtungen wurden mit 4% Formaldehyd für 10 min fixiert und anschließend dreimal für 10 min mit PBS gewaschen. Die Aufbewahrung erfolgte in PBS/Azid. Um eine unspezifische Bindung von Antikörpern zu vermeiden, wurden die Zellen 20 min mit Blockreagenz behandelt. Die primären Antikörper wurden entsprechend der Konzentration mit PBS/5% NGS verdünnt und über Nacht inkubiert. Danach wurde dreimal für je 15 min gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen und so die Hintergrundfärbung zu vermindern. Die sekundären Antikörper wurden ebenfalls in PBS/5% NGS verdünnt und für 45 min bis eine Stunde aufgetragen. Ab diesem Schritt wurden die Zellen stets abgedunkelt gehalten, um ein Ausbleichen des Farbstoffs zu verhindern. Im nächsten Schritt wurde dreimal mit PBS gewaschen und für zwei Minuten mit DAPI (1:10.000 in PBS), welches das Chromatin im Zellkern anfärbt und somit eine Unterscheidung von vitalen und toten Zellen möglich macht, inkubiert. Anschließend wurde weitere drei Male gewaschen, die Präparate mit Vectashield eingedeckelt und konserviert. Dazu wurde ein Tropfen des Eindeckelmediums auf die Zellen gegeben und mit einem Deckglas luftblasenfrei abgedeckt.

2.3.2.2 Lebend-Tod-Färbung

Mit einer Lebend-Tod-Färbung können tote von lebenden Zellen unterschieden werden. Der Farbstoff Fluoreszeindiazetat wird von toten und lebenden Zellen aufgenommen, wobei nur vitale Zellen diesen Farbstoff enzymatisch zu dem

fluoreszierenden Endprodukt Fluoreszein umsetzen können. Propidiumjodid kann die Zellmembran intakter Zellen nicht passieren und wird daher nur von geschädigten oder toten Zellen aufgenommen, in denen es dann in die DNA interkaliert.

Es wurde eine Färbelösung aus 100 µl Propidiumjodid und 30 µl Fluoreszeindiazetat in 5 ml PBS angesetzt. Die zu untersuchenden Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und für 15 s mit 2 ml Färbelösung im Dunkeln inkubiert. Es folgte ein neuer Waschschrift. Zur Dokumentation der Färbung mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops wurden in die Kulturgefäße 2 ml frisches PBS gegeben.

2.3.2.3 Oil Red O-Färbung

Oil Red O ist ein Farbstoff, der im Lipidanteil von Zellen und Geweben abgelagert wird und somit zum Nachweis der Bildung von Lipidtröpfchen in den Zellen herangezogen werden kann. In dieser Färbung erscheinen neutrale Fette rot.

Nach einer Formalinfixierung (4%) der Zellen fanden drei Waschschriffe mit ddH₂O dest. statt. Anschließend wurden die Zellen mit 60% Isopropanol für zwei bis fünf Minuten inkubiert und danach folgte eine Inkubation mit der Oil Red O-Arbeitslösung für 5 min, so dass alle Zellen mit Lösung bedeckt waren. Der nicht gebundene Farbstoff konnte in mehreren Waschschriffen mit Wasser abgespült und die Zellen bis zur Mikroskopie feucht gehalten werden.

2.3.2.4 Nachweis von Proteoglykanen durch Alcian Blau-Färbung

Proteoglykane und somit die extrazelluläre Matrix von Gewebe werden durch die Alcian Blau-Färbung detektiert. Das Prinzip der Färbung beruht auf der Bindung des kationischen Farbstoffs Alcian Blau (pH 2,5) an die polysulfatierten GAG (Glykosaminoglykane)-Ketten von Proteoglykanen. Die Selektivität der Bindung des kationischen Farbstoffes an Proteoglykanen wird dabei über eine Absenkung des pH-Wertes erreicht.

Die zu färbenden Zellen werden in 4% Formaldehyd fixiert, dreimal mit PBS gewaschen und anschließend für 30 min in Alcian Blau-Lösung (1% Alcian Blau in 3% Essigsäure) inkubiert. Der nicht gebundene Farbstoff konnte in mehreren Waschschriffen mit Wasser abgespült und die Zellen bis zur Mikroskopie feucht gehalten werden. Erfolgreich gefärbte Zellen erschienen dabei blau.

2.3.2.5 Nachweis der Alkalischen Phosphatase-Aktivität

Alkalische Phosphatase (ALP) ist ein Oberflächenenzym, das bei Osteoblasten eine erhöhte Aktivität aufweist. Die ALP kann durch den Zusatz von Reagenzien einen Farbstoff umsetzen, der kovalent im Gewebe gebunden bleibt und sich daher nicht durch Diffusion verteilt.

Die mit 4% Formalin fixierten Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen. Zum Nachweis der zellulären ALP wurden der Zellrasen 15 min bei RT im Dunkeln mit dem ALP-Nachweisreagenz, welches nach Herstellerangaben (Sigma Aldrich) angesetzt wurde, inkubiert. Die gefärbten Zellen konnten über mehrere Wochen bei 4 °C gelagert werden.

2.3.2.6 Von Kossa-Färbung

Die von Kossa-Färbung ist eine erstmalig von Romeis 1963 erwähnte Versilberung von Kalziumsalzen. Es ist eine indirekte Färbung, die mit den anionischen Bestandteilen der Kalziumverbindungen wie zum Beispiel Karbonaten und Phosphaten reagiert. Dabei wird bei dieser Nachweismethode das Kalzium in Phosphaten und Karbonaten gegen Silberionen ausgetauscht und dadurch kalziumhaltige Strukturen braun-schwarz angefärbt. Mit Hilfe dieser Methode konnte eine Mineralisierung in osteogen differenzierten Zellen nachgewiesen werden.

Dazu wurden die Zellen zweimal mit PBS gespült, für 10 min mit 4% Formaldehyd fixiert, mit PBS gespült und für eine Stunde in Silbernitratlösung inkubiert. Nach drei weiteren Spülschritten mit ddH₂O erfolgte eine einminütige Inkubation in 5% NaCO₃-25% Formaldehyd-Lösung mit anschließenden ddH₂O-Waschschritten. Anschließend konnte die mikroskopische Analyse der Färbung vorgenommen werden.

2.3.2.7 Alizarin Rot S-Färbung

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit 4% Formalin/PBS für 10 min bei RT fixiert. Im Anschluss wird dreimal mit PBS gewaschen. Die Färbung erfolgt mit Alizarin Rot-Lösung (0.5% Alizarin Rot S, pH 4) für 10 min bei RT. Im Anschluss wurden die Kulturen zweimal mit ddH₂O gespült und standen für die Dokumentation bereit.

2.3.3 Anfertigen von Gefrierschnitten

Pelletkulturen der humanen und murinen GSCs wurden im Anschluss an den Differenzierungszeitraum von 21 Tagen in 15 ml-Röhrchen mit PBS gewaschen und anschliessend mit 4% Formalin für 30 min bei RT fixiert. Nach erneutem Waschen mit PBS erfolgte eine Lagerung der Pellets über Nacht in 25% Succrose/PBS-Lösung. Gefrierschnitte mit einer Dicke von sieben Mikrometern wurden mittels eines Kryostaten hergestellt und auf silanisierte Objektträger platziert. Bis zum Durchführen der Analysen konnten die Schnitte bei – 20 °C gelagert werden.

2.3.4 Durchflusszytometrie

2.3.4.1 Charakterisierung und Zellzahlbestimmung mit dem Zellanalysegerät CASY®

Die Zelldichte einer Kultur wurde routinemässig im „cell counter and analyser system“ CASY® bestimmt. Dieses Gerät arbeitet nach dem Prinzip der elektronischen Pulsflächenanalyse, mit der auch kleine Membranschädigungen festgestellt werden können, da die Zellvitalität hier auf Basis der Membranintegrität ermittelt wird. Bei der Pulsflächenanalyse wird das entstehende Signal, das beim Durchtritt einer Zelle durch die Messpore entsteht, über ein gepulstes Niederspannungsfeld und Puls Processing ausgewertet. Durch dieses Verfahrensprinzip werden Zellzahl, Zellvolumen, Zellgrößenverteilung und Zellaggregation sowie die Vitalität der Zellen gemessen. Nach Messung einer Zellsuspension wird die statistisch am häufigsten vorgefundene Zellgröße ermittelt und deren Volumen bestimmt. Aus dem Volumen dieser „repräsentativen Zelle“ und dem Gesamtvolumen errechnet die im System integrierte Software anschließend die richtige Zellzahl, in dem aus drei Messsignalen ein Mittelwert in Form eines Integrals, welches dem Zelldurchmesser proportional ist, gebildet wird. Das Ergebnis der Messung ergibt ein Histogramm, bei dem die relative Zellzahl gegen den Zelldurchmesser aufgetragen wird.

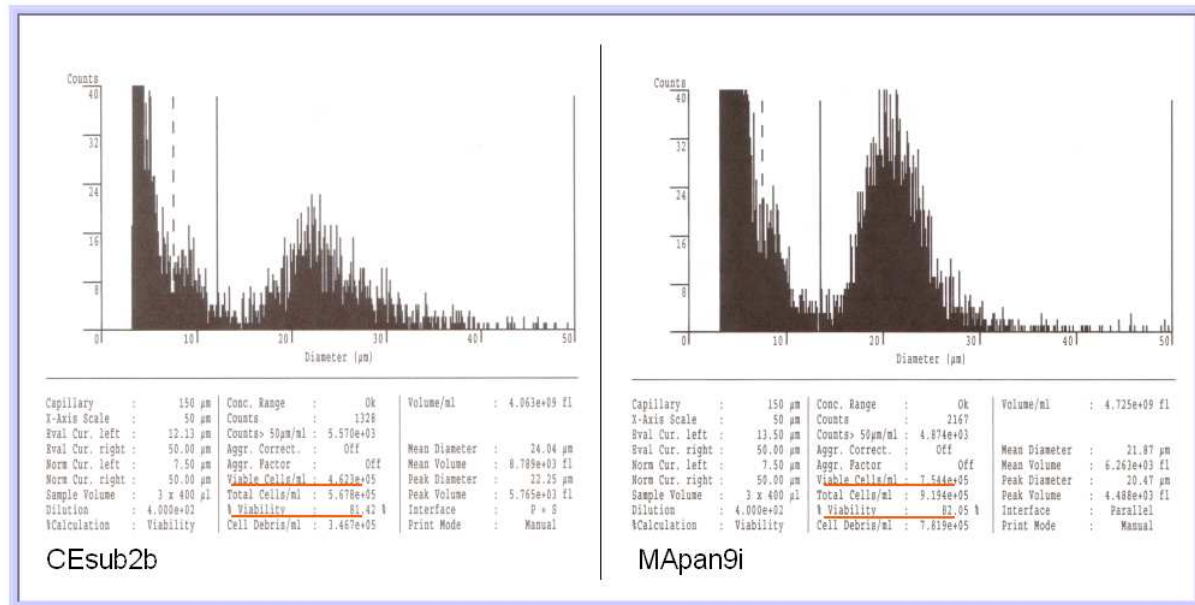


Abbildung 10: Darstellung einer Zellzählung mit dem Zellzählgerät CASY-Messung zweier Zelllinien.

2.3.5 Methoden zur Ermittlung der Proliferation und Zytotoxizität

Für Zytotoxizitäts- oder Proliferationsuntersuchungen an Zellen in Kulturen ist ein direktes Zählen der Zellen mit mikroskopischer Unterstützung oder einem elektronischen Zellzähler nicht immer geeignet. Aus diesem Grund wurden diese Methoden häufig durch indirekte Ansätze ersetzt. Dabei werden bestimmte Komponenten der Zellen, wie DNA- und Proteingehalt, die Aktivität bestimmter Enzyme, die zelluläre Aufnahme von Farbstoffen oder fluoreszierenden Stoffen, aber auch Radioaktivität von Zellen nach Einbau eines Nukleotid-„Labels“, bestimmt. Somit werden Parameter charakterisiert, die zudem Indikatoren für überlebensnotwendige Zellfunktionen sind. Zu diesen gehören die Zellteilung und Proliferation, Proteinsynthese und Proteingehalt, Anhaftungs- und Ablöseverhalten, Sauerstoffverbrauch sowie Membranintegrität und Energieverbrauch.

2.3.5.1 Laktatdehydrogenase-Test

Der Zelltod wird häufig über die Quantifizierung der Membranschädigung bestimmt. Oft werden die Aufnahme oder die Extinktion von Farbstoffen, wie zum Beispiel Trypanblau oder Ethidiumbromid, genutzt oder das Abgeben von radioaktiven Isotopen, wie zum Beispiel $[3H]$ -Prolin oder Thymidin. Eine weitere Möglichkeit ist

das Bestimmen von zytosolischen Enzymen im Kulturmedium, die aus geschädigten Zellen diffundieren können, wobei die Enzymaktivität direkt proportional zur Zahl der lysierten Zellen ist. Eines der im Zytoplasma lokalisierten Enzyme aller Zellen ist die Laktatdehydrogenase (LDH), welche bei Zellschädigung schnell in das Kulturmedium abgegeben wird. Somit ist das Ausmaß der Freisetzung der LDH in das Kulturmedium ein direktes Maß für die Abnahme der Zellmembranintegrität und der Viabilität der Zelle. Die Enzymaktivität der LDH wurde mit Hilfe des Cytotoxicity Detection Kits der Roche Diagnostics GmbH bei einer Absorptionsmessung bei 450 nm bestimmt. Nach der Kultivierung der Zellen auf den zu untersuchenden biomodifizierten Oberflächen über zwei und sieben Tage wurden 25 µl des Mediums aus jedem Well auf eine 96-Well-Platte überführt. Anschließend wurden jeweils 100 µl des Reaktionsgemisches zugegeben. Im ersten Schritt wird Laktat durch die freigesetzte Laktatdehydrogenase zu Pyruvat oxidiert, während NAD^+ zu $\text{NADH} + \text{H}^+$ reduziert wird. In der zweiten enzymatischen Reaktion werden zwei Wasserstoffatome von $\text{NADH} + \text{H}^+$ auf das gelbe Tetrazoliumsalz INT (2-[4-Iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazoliumchlorid) transferiert und es entsteht das rote Formazan-Salz. Hierbei wird Diaphorase als Katalysator eingesetzt. Da fetales Kälberserum auch LDH enthält, ist es unbedingt notwendig immer eine Mediumblindprobe mitzuführen. Das Ausmaß der Zytotoxizität wurde durch den Vergleich mit der LDH-Freisetzung durch 100%ig letale Zellen quantifiziert. Diese wurden mit Medium unter Zusatz von 2% Triton behandelt. Ebenso befand sich auf jeder Platte ein Vergleich mit Zellen, die nur auf Standardkulturoberflächen gewachsen sind (0% Toxizität). Somit war es möglich, die minimale, versuchsbedingte, und die maximal mögliche LDH-Freisetzung der Zellen zu bestimmen.

Zur Bestimmung des LDH-Gehaltes wurden die Katalysator/ NAD^+ -Lösung und die Färbelösung direkt vor Versuchsbeginn vermengt und 1:1 mit 100 µl des zu testenden Mediumüberstandes vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei RT im Dunkeln wurde die Bildung des rötlichen Formazans im Spektralphotometer bei 492 nm (Referenzwellenlänge 620 nm) gemessen. Zur Ermittlung eines Messwertes wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Als Nullkontrolle wurde nicht in der Zellkultur eingesetztes Medium herangezogen.

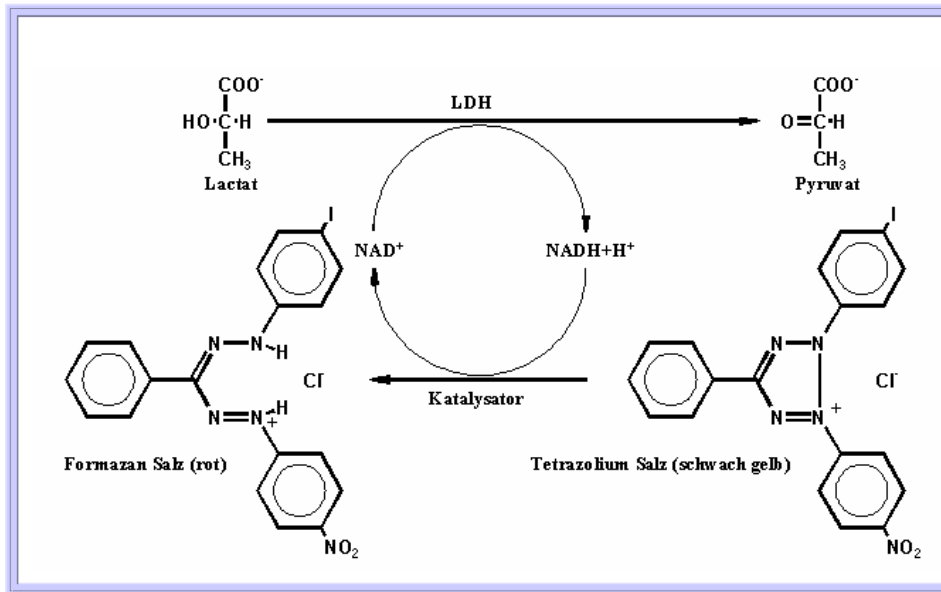


Abbildung 11: Das Testprinzip der LDH-Bestimmung basiert auf einer gekoppelten katalytischen Reaktion.

2.3.5.2 WST-1-Test

Der angewandte WST-1-Test der Firma Roche beruht wie vergleichbare Tests (MTT, XTT und MTS) auf der enzymkatalytischen Generierung eines Formazans aus einem löslichen Tetrazoliumsalz. Diese Reaktion wird von mitochondrialen Dehydrogenasen katalysiert, deren Gesamtkonzentration mit ansteigender Zellzahl anwächst. Das Verwenden des löslichen WST-1-Reagenz, welches ebenfalls zu einem löslichen Formazan umgesetzt wird, bietet deutliche Vorteile im Vergleich zu anderen Proliferationstests wie ^3H -Thymidin oder BrdU-Einbau in die DNA. Beim Anwenden des WST-1-Tests müssen weder verschiedene Waschschriffe noch unterschiedliche Inkubationszeiten eingehalten werden. Vielmehr können Kultivierung, Inkubieren mit dem WST-1-Reagenz und die eigentliche Messung im Mikrotiterspektrophotometer in derselben Platte durchgeführt werden.

Die WST-1-Lösung wurde dem Medium im Verhältnis 1:10 zugesetzt. Das alte Medium wurde abgesaugt und durch das angesetzte Reaktionsgemisch ersetzt. Zum homogenen Durchmischen des Ansatzes wurde die Platte bei 600 UPM auf einem Mikrotiterplattenschüttler geschüttelt. Nach einer Inkubation von 30 min bei 37°C wurde die Formazanbildung durch die Messung der optischen Dichte mittels eines Spektralphotometers bei 450 nm (Referenzwellenlänge 690 nm) gegen einen Nullwert gemessen.

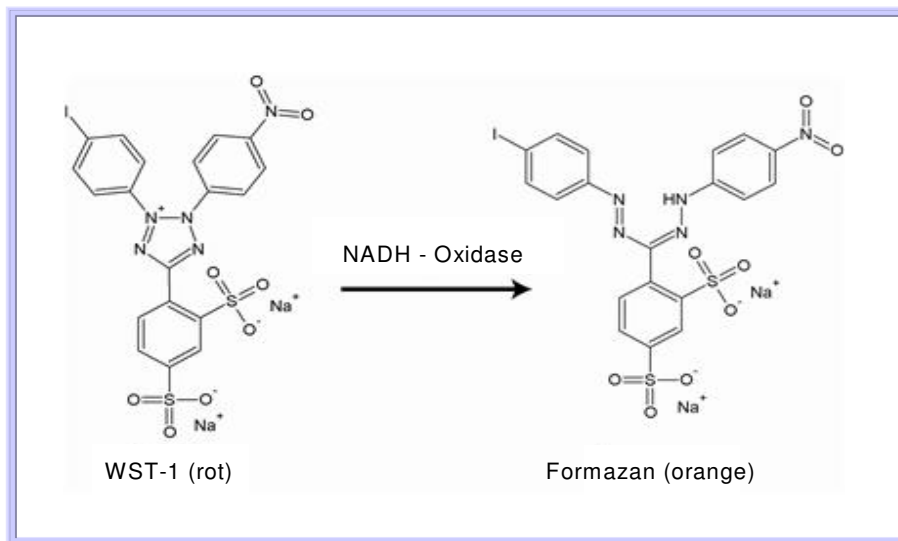


Abbildung 12: Prinzip des WST-1-Tests.

2.3.5.3 Alkalische Phosphatase Aktivität

Zur Quantifizierung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase wurde der Umsatz des farblosen Substrats para-Nitrophenylphosphat (pNPP) zu dem gelb gefärbten Nitriphenol durch Bestimmung der Absorption bei 405 nm in einem Mikrotiter-spektralphotometer gemessen. Die ALP ist der bekannteste frühe Marker für osteogene Vorläuferzellen. Sie liegt während der *in vitro*-Kultivierung sowohl membrangebunden, über einen Phospholipidanker an der Membran der Osteoprogenitoren, als auch löslich vor.

2.3.5.3.1 Quantifizierung der löslichen Alkalischen Phosphatase im Zellkulturüberstand

Zur Aktivitätsbestimmung der löslich vorliegenden ALP im Differenzierungsmedium wurden Mediumproben von 150 µl aus dem Kulturüberstand entnommen. Die Proben, die in einem Zeitraum von insgesamt 21 Tagen gewonnen wurden, konnten bis zur Analyse bei – 20°C gelagert werden. Nach dem Auftauen der Proben bei RT wurden diese jeweils in sechs Aliquots zu je 20 µl in die Wells einer 96-Well-Platte pipettiert. Dazu wurden 200 µl der pNPP-Reaktionslösung gegeben und um eine homogene Durchmischung von Probe und Reaktionsreagenz zu gewährleisten, wurde die Platte anschließend bei 700 UPM für 30 s geschüttelt. Im nachfolgenden

Schritt wurde die Platte für 24 h bei 37°C inkubiert und anschließend bei einer Wellenlänge von 405 nm (Referenzwellenlänge 492 nm) im Spektralphotometer vermessen. Als Nullkontrolle wurde zellfreies Medium demselben Prozess unterzogen.

2.3.5.4 Bestimmung der Phosphatkonzentration im Zellkulturüberstand

Zur Analyse der Phosphatkonzentration im Zellkulturüberstand während der osteogenen Differenzierung wurde der Molybdat-Ascorbinsäure-Test herangezogen. Dieser beruht auf der Reduktion eines Phosphat-Molybdat-Komplexes durch Ascorbinsäure in saurer Lösung und der Detektion des dabei auftretenden Farbumschlags [Saheki et al., 1985].

Kurz vor Gebrauch wurden sechs Teile der Lösung A (10% Ascorbinsäure in ddH₂O) mit einem Teil der Lösung B (0,42% Ammoniumheptamolybdat-tetrahydrat in 1 N H₂SO₄) vermischt. 100µl dieser Mischung wurden in einer 96-Well-Platte zu 10 µl Probe gegeben und anschließend für 20 min bei 37°C inkubiert. Mit einem Spektralphotometer wurde abschließend die Extinktion bei 630 nm gemessen und die in der Probe detektierte Phosphatkonzentration mit Hilfe einer Eichkurve ermittelt.

2.3.6 Rasterelektronenmikroskopie

Im Elektronenmikroskop wird ein Elektronenstrahl durch elektromagnetische Linsen auf ein entsprechend vorbereitetes Objekt fokussiert. Durch die geringe Wellenlänge der Elektronen können dabei sehr viel höhere Auflösungen als mit einem Lichtmikroskop erreicht werden. Aufgrund des Messprinzips, entweder durchdringen die Elektronen die Probe und werden dabei gebeugt oder sie werden an der Oberfläche reflektiert, wird zwischen der Transmissionselektronenmikroskopie (transmission electron microscopy, TEM) und der Rasterelektronenmikroskopie (REM oder scanning electron microscopy, SEM) unterschieden. In der vorliegenden Arbeit wurde die letzte Methode eingesetzt. Mit der Rasterelektronenmikroskopie lassen sich Oberflächenstrukturen darstellen. Dazu werden die jeweiligen Proben mit einer dünnen goldhaltigen Schicht überzogen. Im REM tastet dann ein energiereicher, dünner Elektronenstrahl die Oberfläche der Probe ab. Der Elektronenstrahl setzt in Abhängigkeit des Auftreffwinkels Sekundärelektronen aus

der Oberflächenschicht frei, die fokussiert und zu einem räumlichen Bild der Probe verarbeitet werden. Der Bildkontrast im REM ist dabei vom Einfallswinkel der Primärelektronen und der Lage des Detektors zur Probenoberfläche (Topographieeffekt) abhängig. Die Auflösungsgrenze liegt bei 6 nm.

Nach entsprechender Kultivierung der für die Elektronenmikroskopie bestimmten Zellen wurde das Medium vorsichtig abgenommen, die Zellen einmal mit PBS bzw. 0,25 M HEPES bei RT gewaschen und anschließend mit einer Glutaraldehyd-Lösung (25%) in Cacodylatpuffer (0,3 M) überschichtet und bei 4°C gelagert. Nach der Goldbedampfung konnten die Proben im Elektronenmikroskop analysiert werden.

2.4 Methoden zum Biomodifizieren von Oberflächen

Zur Immobilisierung von Wachstumsfaktoren auf Glas muss die zu modifizierende Oberfläche zuvor beschichtet werden. Für diese Beschichtung wurden die Amino- bzw. Epoxysilanisierung und Neutravidinierung ausgewählt. Die Glasoberflächen, die einer Epoxysilanisierung unterzogen wurden, wurden von Dr. Stefan Gerbes vom Institut für neue Materialien (INM) in Saarbrücken für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Die mit APTES aminosilanierten Glasoberflächen wurden von Rothin Strehlow aus dem Fraunhofer Institut, Institutsteil Golm, angefertigt. Auf einen Teil dieser mit APTES silanierten Oberflächen wurde mittels einer affinen Kopplung Neutravidin aufgebracht. Dieser Arbeitsschritt wurde ebenfalls in Golm durchgeführt. Dem Aufbringen der Biomaterialien gehen einfache Reinigungsschritte mit ddH₂O und Ethanol voraus. Dadurch werden eventuell vorhandene organische Oberflächenverunreinigungen entfernt, die sich auf die nachfolgenden Kopplungsprozesse störend auswirken können.

2.4.1 Kovalente Kopplung

Für die kovalente Immobilisierung mittels 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid (EDC)-Methylimidazol wurden die aktivierten Wachstumsfaktoren auf die zuvor silanisierten Glasoberflächen aufgebracht. Hierbei erfolgte die Aktivierung durch die Aufnahme der verwendeten Faktoren in einer 50 mM Methylimidazol-Lösung (pH 6). Anschließend wurde zu diesem Gemisch EDC dazugegeben, sodass die Wachstumsfaktoren mit einer Endkonzentration von 1000 ng/ml, 100 ng/ml oder 10 ng/ml zum Auftragen auf die modifizierten Oberflächen vorlagen.

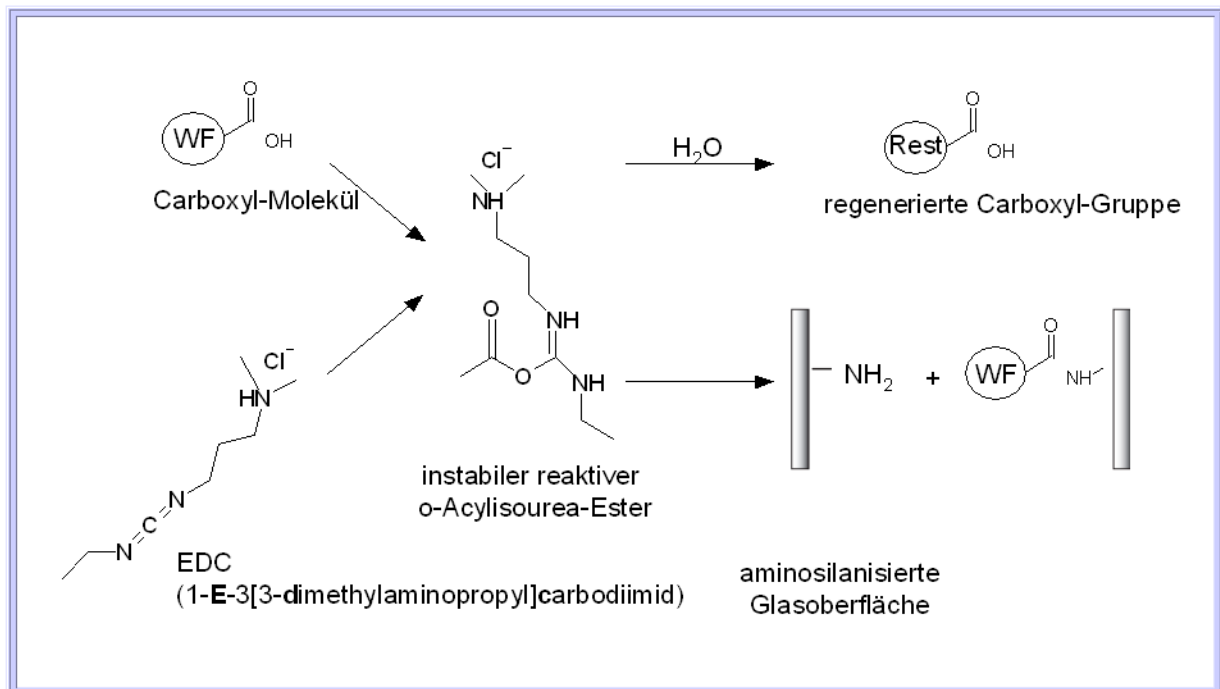


Abbildung 13: Reaktionsverlauf der chemischen Kopplung von Proteinen und Wachstumsfaktoren (WF) auf silanisierten Oberflächen mittels 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid.

Im ersten Schritt der kovalenten Kopplung von aktivierten Proteinen erfolgt ein elektrophiler Angriff des EDC auf die Hydroxylgruppe des Proteinphosphat-Rests. Das daraus resultierende Intermediat hydrolysiert leicht und wird durch Zugabe von Methylimidazol stabilisiert. Im Anschluss können die so aktivierten Wachstumsfaktoren auf die silanisierten Oberflächen aufgetragen werden, was eine kovalente Bindung an den Aminogruppen der silanisierten Substrate zur Folge hat.

Als Alternative zur Kopplung mit Hilfe von EDC-Methylimidazol auf amino- und epoxysilanisierten Oberflächen wurde das EDC- N-hydroxysuccinimid (NHS)-System

genutzt. Dabei handelt es sich um ein kommerziell erworbenes Amine Coupling Kit der Firma Biacore.

2.4.2 Adsorptive Kopplung

Die adsorptive Kopplung wurde sowohl mit dem Coating-Puffer (pH 7,4 und 9,6) der Firma Candor Bioscience GmbH auf Polystyrenoberflächen, als auch zur Immobilisierung von M-CSF (*macrophages stimulating factor*) auf Aminosilanoberflächen vorgenommen. Der verwendete Candor-Puffer wurde direkt vor dem Gebrauch 1:10 verdünnt und anschließend mit den zur Immobilisierung vorgesehenen Wachstumsfaktoren (Endkonzentration: 1000 ng/ml, 100 ng/ml, 10 ng/ml) vermischt.

Zur Ankopplung von M-CSF auf Aminosilan wurde das Zytokin in einer Konzentration von 100ng/ml in einem Tropfen auf die Substratoberfläche aufpipettiert, um sich nach Applizieren eines Deckgläschens (20 x 20mm) auf ein Drittel des Substrates (Abbildung 18) zu verteilen.

Nach dem Auftragen der Wachstumsfaktoren auf die der Kopplungsmethode entsprechenden Oberflächen wurden die Substrate bei 4°C über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden alle Oberflächen dreimal kräftig mit ddH₂O gewaschen und standen anschließend für die Zellkultur bereit.

2.4.3 Affinitätsbindung

Für die affine Kopplung wurde das Avidin-Biotin-System herangezogen. Die Bindung von Biotin an die tetrameren Proteine Avidin, Strept- und Neutravidin erfolgt dabei sehr spezifisch mit einer besonders geringen Dissoziationskonstanten ($K_D = 10^{-15}$ M).

Die mit Biotin modifizierten Wachstumsfaktoren wurden vor dem Auftragen auf die Neutravidinoberfläche mit ddH₂O auf eine Endkonzentration von 1000 ng/ml, 100 ng/ml oder 10 ng/ml gebracht. Die Biotinylierung der beiden eingesetzten Wachstumsfaktoren wurde dabei mittels des EZ-Link-Sulfo-NHS-LC-Biotinylierungs-Kits der Firma Pierce nach Herstellerangaben durchgeführt.

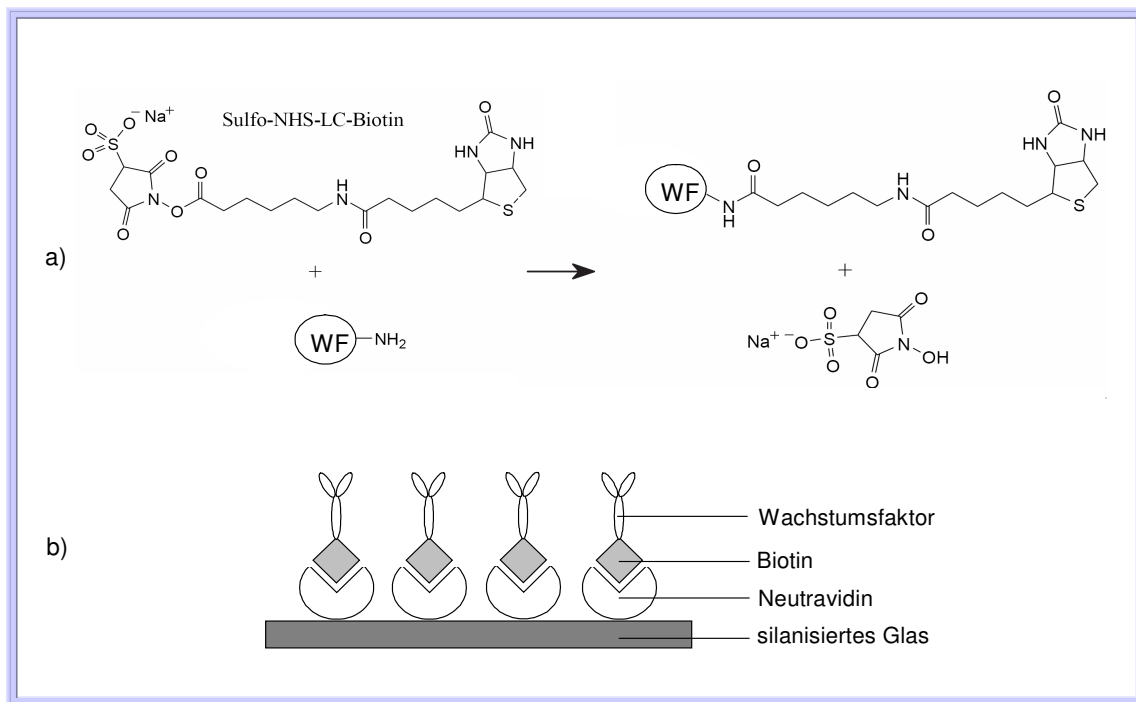


Abbildung 14: Prozessablauf zur Immobilisierung von Proteinen und Wachstumsfaktoren (WF) durch adsorptive Kopplung. Im ersten Schritt erfolgt die Modifizierung der verwendeten Wachstumsfaktoren mit Biotin. Im weiteren Verlauf werden die modifizierten Proteine auf neutravidin-beschichtete Glasoberflächen aufgetragen. Die Kopplung der Wachstumsfaktoren an das Substrat erfolgt durch das Avidin-Biotin-System.

2.5 Überprüfung der Kopplungsstabilität

2.5.1 Protein-ELISA

Mit der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)-Methode sollte die Kopplungseffizienz des immobilisierten Wachstumsfaktors indirekt bestimmt werden. Ein monoklonaler Antikörper, der das zu untersuchende Protein spezifisch bindet, ist auf einer 96-Well-Platte immobilisiert und bindet die im Überstand vorhandenen Moleküle. Diese werden durch einen spezifischen polyklonalen Antikörper gebunden, der mit einem Enzym gekoppelt ist. Nach Zugabe des Substrats wird durch das am Antikörper gebundene Enzym eine Farbreaktion vermittelt, die der Menge des initial gebundenen Proteins entspricht. Die Farbentwicklung wird anschließend gestoppt

und bei 450 nm im Spektralphotometer gemessen. Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte über den Vergleich mit einem Standard des zu untersuchenden Proteins, welcher entsprechend der Anleitung verdünnt und auf der 96-Well-Platte mitgeführt wurde.

Dabei werden die mit Wachstumsfaktoren beschichteten Oberflächen ohne Zellen über einen Zeitraum von 21 Tagen inkubiert und an Tag eins, zwei, drei, sieben, 14 und 21 Proben entnommen, welche bei -20°C bis zur Analyse gelagert wurden. Die Durchführung der Quantikin-ELISAs erfolgt nach der Anleitung der Firma R&D Systems GmbH.

2.5.2 Überstandstransfer-Assay

Um die Stabilität der immobilisierten Wachstumsfaktoren weiterhin und die Aktivität eventuell gelöster Faktoren zu untersuchen, wurde ein Überstandstransfer-Assay durchgeführt. Dabei befanden sich in der ersten Platte Substrate mit Wachstumsfaktorbeschichtung ohne Zellen und in der zweiten Platte ausschließlich Zellen, die auf der normalen Kultivierungsoberfläche kultiviert wurden (Abbildung 15a). Der Transfer des Substratüberstandes von der ersten in die zweite Platte erfolgte in einem Intervall von drei bis vier Tagen, wobei der Platte mit den beschichteten Oberflächen neues Medium zugeführt wurde.

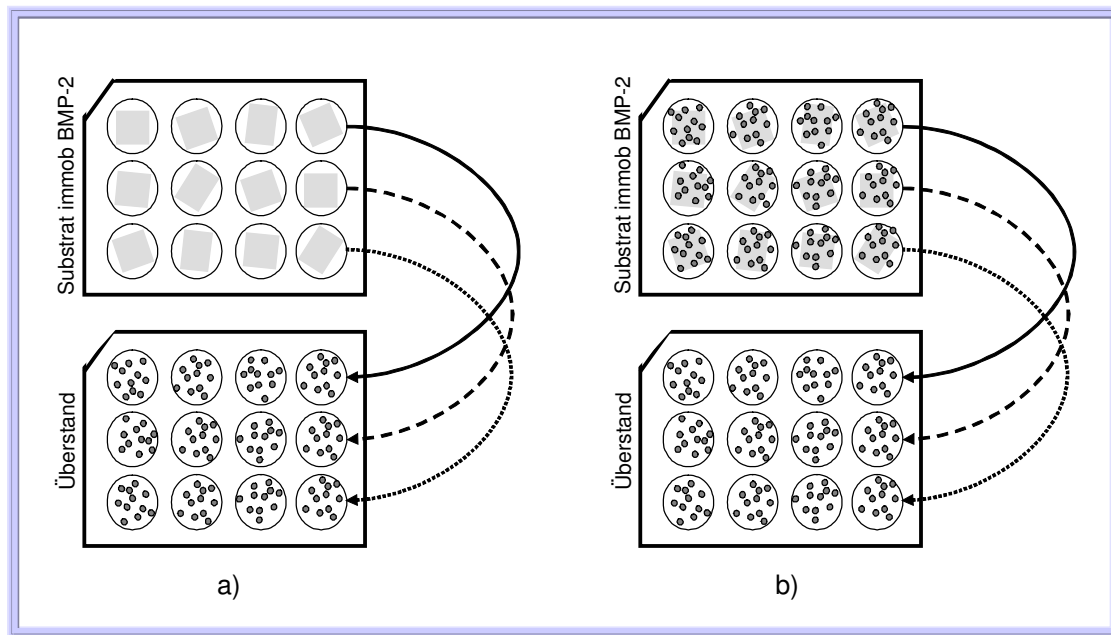


Abbildung 15: Schematischer Ablauf des Prozesses zur Überprüfung der zellbasierten Produktion konditionierten Mediums und der Kopplungsstabilität der immobilisierten Wachstumsfaktoren.

2.6 Konditionierung des Mediums durch Zellaktivität

2.6.1 Transwell-Assay

Um die Produktion von konditioniertem Medium zu überprüfen, die mit den immobilisierten Differenzierungsinduktoren in Kontakt kamen, wurden Transwell-Versuche durchgeführt.

Hierbei wurden die Wachstumsfaktoren beschichteten Oberflächen im unteren Kompartiment des Transwell-Aufbaus (Abbildung 16) platziert. Die zu untersuchenden Zellen wurden sowohl auf die modifizierten Substrate im unteren Teil des Transwell als auch im oberen Kompartiment auf eine Membran mit einer Porengröße von $0,4\ \mu\text{m}$ ausplattiert und über 21 Tage differenziert.

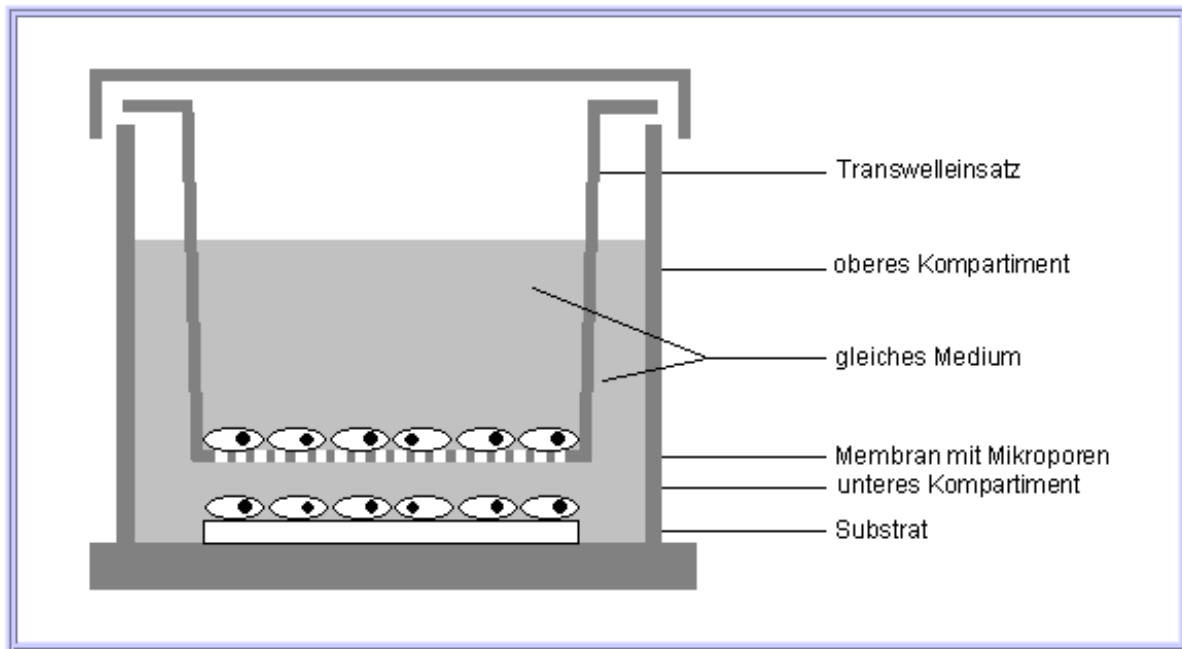


Abbildung 16: Schematischer Aufbau eines Transwell-Systems.

2.6.2 Überstandstransfer-Assay

Um die Konditionierung des Mediums durch Zellaktivität weiterhin zu untersuchen, eignet sich der Transfer des Überstandes eines Wells, in dem sich sowohl wachstumsfaktorbeschichtete Substrate, als auch Zellen befinden; in ein korrespondierendes Well ausschließlich mit Zellen versehen. Hierbei wurde das Überführen des Überstandes aus der ersten in die zweite Platte (Abbildung 15b) alle drei bis vier Tage über einen Zeitraum von 21 Tagen vorgenommen. Die erste Platte erhielt zu diesen Zeitpunkten jeweils frisches Differenzierungsmedium.

Im Anschluss an den Versuchszeitraum wurden die Zellen beider Kompartimente des Transwell-System und alle mit Zellen besiedelten Platten, die einem Mediumtransfer unterzogen wurden, mit 4% Formalin fixiert und anschließend histologischen und immunzytochemischen Analysen zugeführt.

Bei den Untersuchungen zur Stabilität der Wachstumsfaktorimmobilisierung und den Analysen zum konditionierten Medium wurde jeweils eine Positivkontrolle (Zellen mit Wachstumsfaktor löslich im Medium) und eine Negativkontrolle (Zellen sowohl ohne wachstumsfaktorbeschichtetes Substrat als auch ohne Wachstumsfaktor löslich im Medium) mitgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Makrophagen

3.1.1 Isolierung, Kultivierung und Differenzierung von Monozyten in Makrophagen mittels löslicher Faktoren

Aufgrund der schnellen Differenzierbarkeit von Monozyten zu Makrophagen wurde dieses System als Modell für die Differenzierung mittels gelöster und immobilisierter Wachstumsfaktoren ausgewählt. Diese mononukleären Zellen sind Bestandteil des peripheren Blutes und werden aus Leukozyten-Konzentraten von Proben gesunder Spender über eine Dichtegradientenzentrifugation gewonnen. Nach Aufreinigung dieser isolierten mononukleären Zellen durch Adhärenz an Standardkunststoffoberflächen wurden die Monozyten (Abbildung 17 A) in ein Differenzierungsmedium überführt, welches neben verschiedenen Bestandteilen des Differenzierungsmediums für Makrophagen das Zytokin M-CSF enthielt. Von den Monozyten ist bekannt, dass sie sich unter Zugabe von M-CSF (*macrophages colony-stimulating factor*) im Medium zu Makrophagen entwickeln [Hashimoto, 1997; Murakami et al., 1996]. Dieses Zytokin ist für die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen sowohl Überlebensfaktor, als auch Differenzierungsinduktor [Brugger et al., 1991; Rehli et al., 1995]. Unter dem Einfluss von M-CSF nehmen die Zellen während des Reifungsprozesses eine charakteristische spindelförmige Morphologie an [Way et al., 2009]. Neben der Differenzierung zu Makrophagen mittels M-CSF können die Monozyten durch Zugabe von humanem AB-Serum ebenfalls in Makrophagen differenziert werden. Hierbei ist das Ausbilden einer runden Morphologie zu beobachten. Um den Reifegrad der Makrophagen über morphologische Charakteristika hinaus bestimmen zu können, bietet sich die immunzytochemische Untersuchung mit dem Antikörper MAX.1 an. Die Expression dieses Oberflächenmarkers (Carboxypeptidase M) steigt während der *in vitro*- Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen stark an und ist ausschließlich auf reifen Makrophagen lokalisiert [Rehli et al., 2000]. Unabhängig von dem Differenzierungsinduktor M-CSF

oder dem humanen AB-Serum, konnte die Differenzierung der aus peripherem Blut isolierten Monozyten zu Makrophagen gezeigt werden.

3.1.2 Kultivierung und Differenzierung von Makrophagen auf

Oberflächen mittels löslichem Wachstumsfaktor

Die Differenzierung von Makrophagen mittels gelöstem M-CSF auf Standardkunststoffoberflächen bildet die Basis für die weitere Versuchsdurchführung. Hierzu wurde in einem anschließenden Schritt die Kultivierung und Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen unter Einfluss von löslich vorliegendem M-CSF auf aminosilanisierten Glasoberflächen getestet. Die isolierten Monozyten wurden nach Aufreinigung durch Anhaften an Standardkunststoffoberflächen auf aminosilanbeschichtete Glasoberflächen überführt und die Differenzierung mit M-CSF und humanem AB-Serum in parallelen Experimenten induziert. Die Induktion der Makrophagendifferenzierung sowohl durch M-CSF als auch durch humanes AB-Serum zeigte auf Aminosilan die charakteristische spindelartige Form (Abbildung 17 B, C) bzw. runde Morphologie der Zellen (Abbildung 17 D, E).

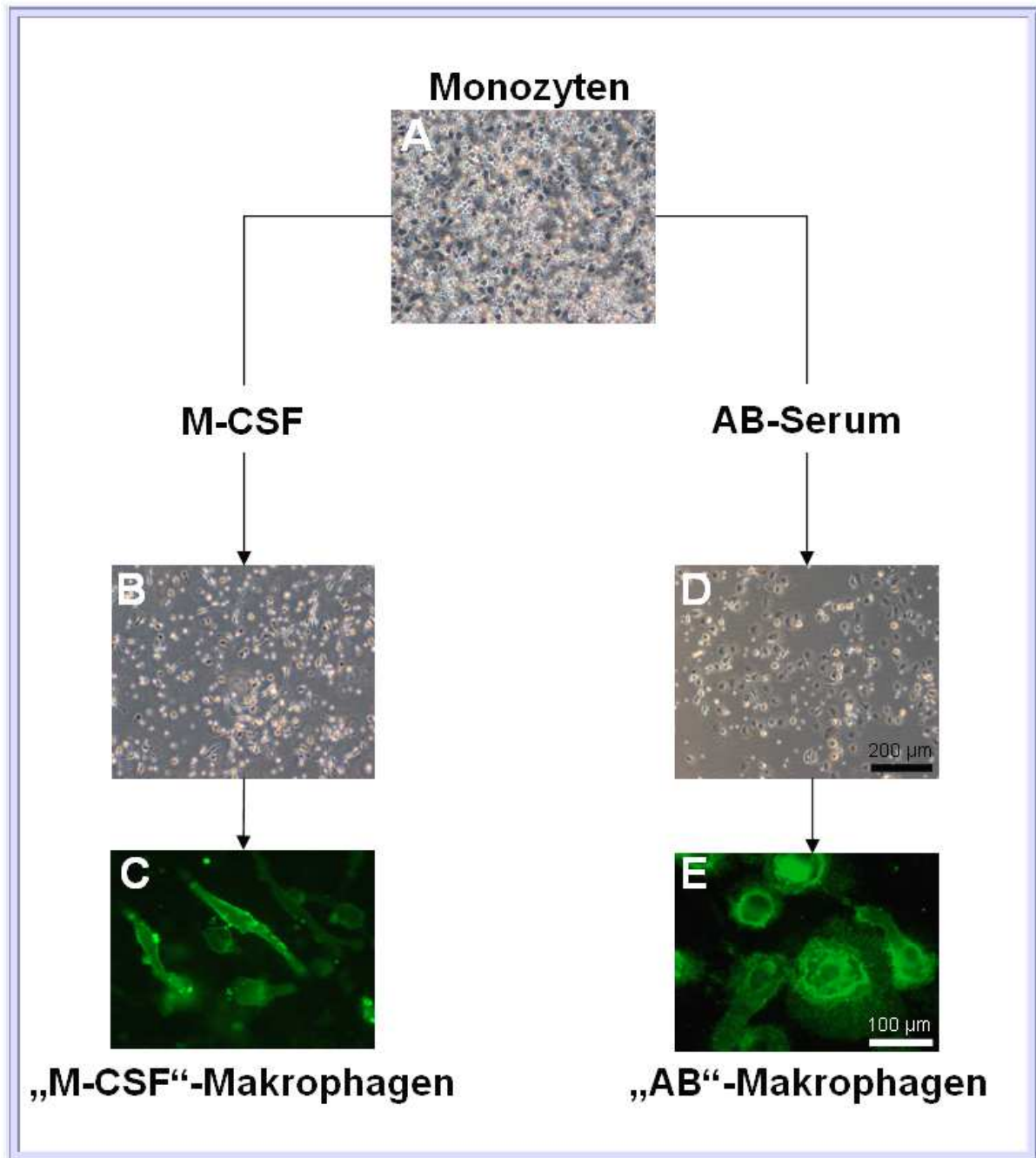


Abbildung 17: Differenzierung von Monozyten in Makrophagen mittels gelöstem M-CSF bzw. AB-Serum als Differenzierungsinduktoren im Zellkulturmedium auf aminosilanisierten Glasoberflächen. Die Darstellung zeigt mikroskopische Aufnahmen von Monozyten (A), die in spindelförmige „M-CSF“-Makrophagen (B, C) bzw. in „AB“-Makrophagen mit einer runden Morphologie (D, E) differenziert wurden. Die immunzytochemischen Untersuchungen der reifen, differenzierten Makrophagen (C, E) wurden mit dem Antikörper MAX.1 vorgenommen, welcher die Carboxypeptidase M-Expression (grün) auf reifen Makrophagen nachweist.

3.1.3 Differenzierung von Makrophagen auf Oberflächen mit immobilisiertem Wachstumsfaktor

Für die Differenzierung der Monozyten in Makrophagen mittels eines immobilisierten Wachstumsfaktors wurden die aminosilanisierten Glasoberflächen durch adsorptives Koppeln des für das Überleben und Differenzieren der Makrophagen gleichermaßen wichtigen Zytokines M-CSF modifiziert. Hierfür wurde der Faktor auf ein Drittel der gesamten Wachstumsfläche (Schema in der Mitte von Abbildung 18) aufgetragen und anschließend mit dem Platzieren eines Deckglases abgedeckt. So konnte sich das M-CSF auf dem für die Kopplung vorgesehenen Areal (ein Drittel des gesamten Substrates) ausbreiten. Nach der Inkubation und mehreren sich anschließenden Waschschritten konnten die Monozyten auf das Substrat überführt werden und sowohl die M-CSF-modifizierte Region als auch das unbehandelte Areal des Substrates besiedeln. Dabei konnte die Differenzierung der Monozyten zu spindelförmigen Makrophagen ausschließlich auf der mit M-CSF-beschichteten Substratseite (Abbildung 18 B, D) bereits am ersten Tag nach Zellaussaat auf der zu untersuchenden Oberfläche beobachtet werden. Die Monozyten, welche auf der M-CSF-unbehandelten Region nach dem Ausplattieren zum Liegen kamen, bildeten nicht die für unter M-CSF-Einfluss (Abbildung 18 A, C) differenzierenden Monozyten charakteristische spindelförmige Morphologie aus. Der immunzytochemische Nachweis der reifen „M-CSF“-Makrophagen wurde an Tag sieben nach Zellaussaat durchgeführt. Dabei konnten die Ergebnisse, welche aufgrund der morphologischen Veränderungen der Zellen erhoben wurden, bestätigt werden. Auch hier wurden ausschließlich auf dem M-CSF-modifizierten Areal MAX.1 exprimierende Zellen detektiert. Auf der Kontrollregion, auf der kein Faktor angekoppelt wurde, konnten keine positiven Zellen für die MAX.1-Färbung mittels der Fluoreszenzmikroskopie ermittelt werden.

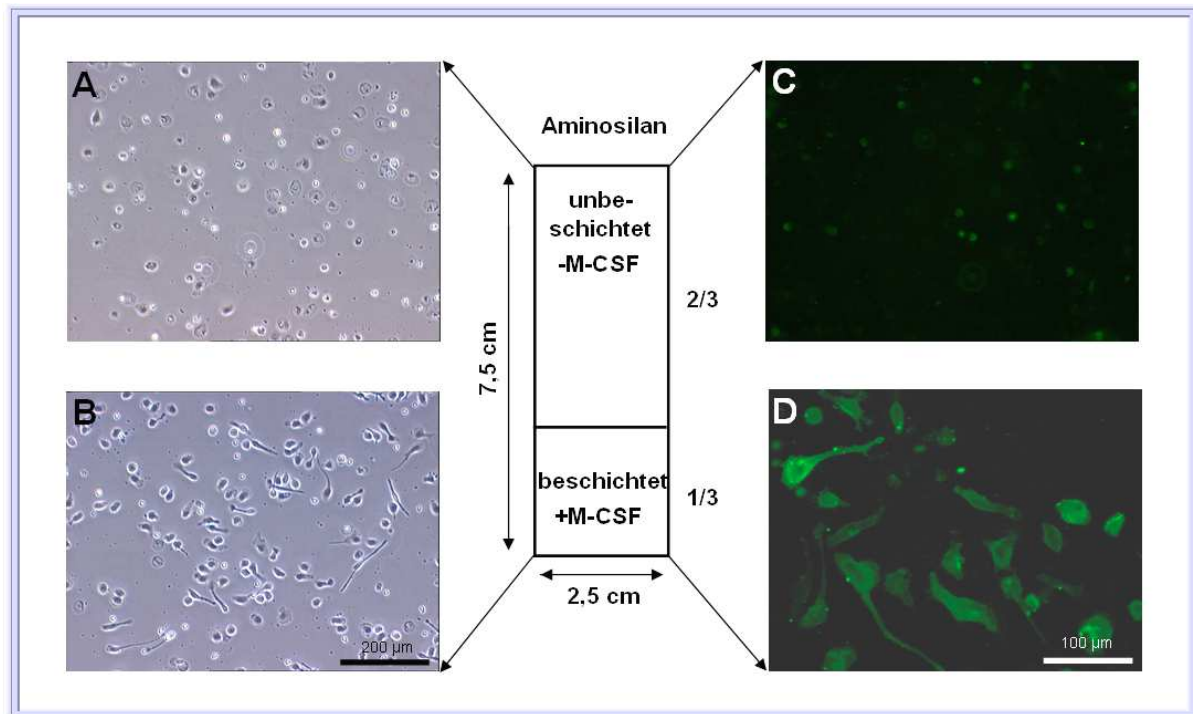


Abbildung 18: Monozyten können erfolgreich über immobilisiertes M-CSF zu Makrophagen differenziert werden. Die Übersicht zeigt den schematischen Aufbau eines substratgebundenen Differenzierungsexperimentes (Mitte) und mikroskopische Aufnahmen (Phasenkontrast: A, B, Fluoreszenzmikroskopie: C, D) des Differenzierungserfolges auf dem durch adsorptive Kopplung M-CSF-modifizierten Substratteils (1/3) im Vergleich zur Kontrollfläche (2/3). Reife, differenzierte Makrophagen konnten ausschließlich auf dem mit M-CSF modifizierten Areal mittels immunzytochemischer Analyse (MAX.1-Antikörper) und über die Morphologieänderung der Zellen während des Reifungsprozesses beobachtet werden.

3.2 Adulte Stammzellen aus exokrinem Drüsengewebe der Maus und des Menschen (Glanduläre Stammzellen - GSCs)

3.2.1 Charakterisieren der humanen und murinen GSCs

Um den Stammzellcharakter der humanen und murinen adulten Stammzellen zu zeigen, wurde die Expression von Nestin bei proliferierenden GSCs untersucht. Bei Nestin handelt es sich um ein intrazelluläres Markerprotein für undifferenzierte Stammzellen [Mercati et al., 2008; Hoffmann et al., 2006; Wiese et al., 2004]. Dieses Protein ist Bestandteil des Zytoskeletts u. a. auch von neuronalen Vorläuferzellen. Für

diese Untersuchung wurden die humanen (CEsub2b) und murinen (MApan9i) adulten Stammzellen bis zum Erreichen einer 80% Konfluenz in Kultivierungsmedium kultiviert und im Anschluss an den Fixierungsprozess immunzytochemisch mittels eines Antikörpers gegen Nestin analysiert. Sowohl bei den humanen als auch den murinen GSCs konnten Nestin-positive Zellen detektiert werden (Abbildung 19 A, B). Um die Spezifität dieser Färbung und damit auch der Nestinexpression zu zeigen, wurden proliferierende Kulturen der MApan9i einer Färbung gegen den Isotyp des Nestin-Antikörpers (Abbildung 19 AA, BB) und einer Färbung mit dem entsprechenden Sekundärantikörper (Abbildung 19, Aa, Bb) unterzogen. Mittels dieser Behandlungen wurden keine Zellen angefärbt.

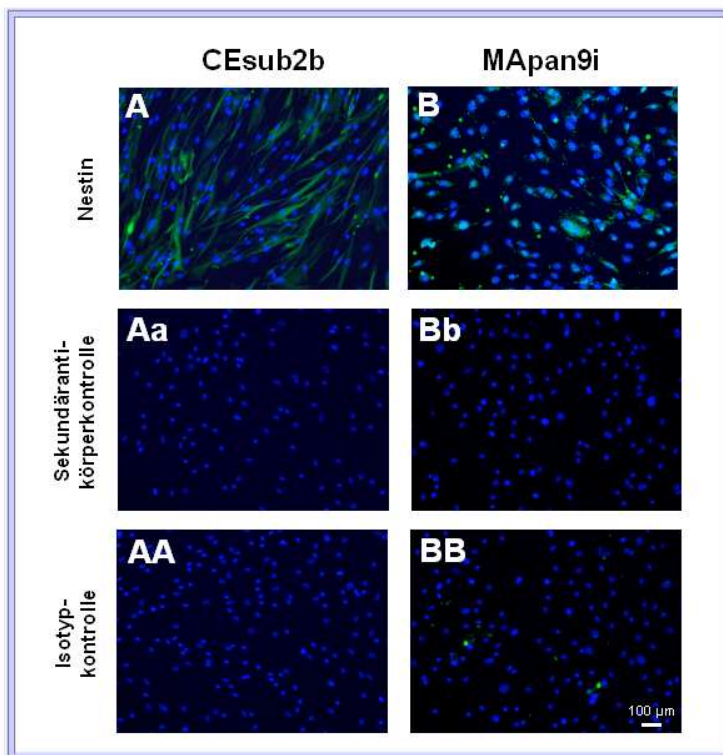


Abbildung 19: Humane und murine GSCs sind positiv für den Stammzellmarker Nestin. Die Darstellung zeigt die Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Analyse der humanen glandulären Stammzellen aus der Speicheldrüse (SGSCs) und den murinen pankreatischen Stammzellen (PSCs) bezüglich des Stammzellmarkers Nestin. Die GSCs wurden vier Tage nach Aussaat und Kultivierung im Kultivierungsmedium immunzytochemisch untersucht. Als Kontrollen wurden Färbungen mit dem Isotyp (AA, BB) und dem Sekundärantikörper (Aa, Bb) durchgeführt. Während nestinpositive Zellen in beiden Stammzelllinien detektiert werden konnten, wurden keine positive Zellen hinsichtlich der Sekundärantikörper- und Isotypfärbungen in den Kontrollansätzen beobachtet.

Um eine Berechnung der Populationsverdopplung (PD) durchführen zu können und so Unterschiede in der Zellproliferation der humanen und murinen GSCs zu ermitteln, wurden Zellen von CEs_{ub2b} und MA_{pan9i} zum gleichen Zeitpunkt ausplattiert und im Verlauf von Tag eins bis zehn täglich mittels des Zellzählgerätes CASY hinsichtlich der Zellzahl analysiert. In Abbildung 20 sind die Kurven der errechneten Populationsverdopplung aufgetragen. Der Berechnung liegen die Zellzählung mittels des CASY zugrunde. Bei den murinen Stammzellen war von Beginn des Experimentes an eine stärkere Proliferationsaktivität anhand der Messdaten zu beobachten. Beide Zelllinien wiesen jedoch einen gleichmäßigen Wachstumsverlauf auf. Bei der graphischen Auswertung der Populationsverdopplung der beiden adulten Stammzelllinien zeigte sich ein deutlicher Unterschied, wobei die humanen glandulären Stammzellen aus der Speicheldrüse (SGSCS) ein wesentlich langsames Wachstum aufwiesen als die murinen pankreatischen Stammzellen (PSCs). Diese unterschiedliche Populationsverdopplung war hinsichtlich der Planung der Zellaussaaten für die Differenzierungsversuche wichtig und wurden in die Planung miteinbezogen.

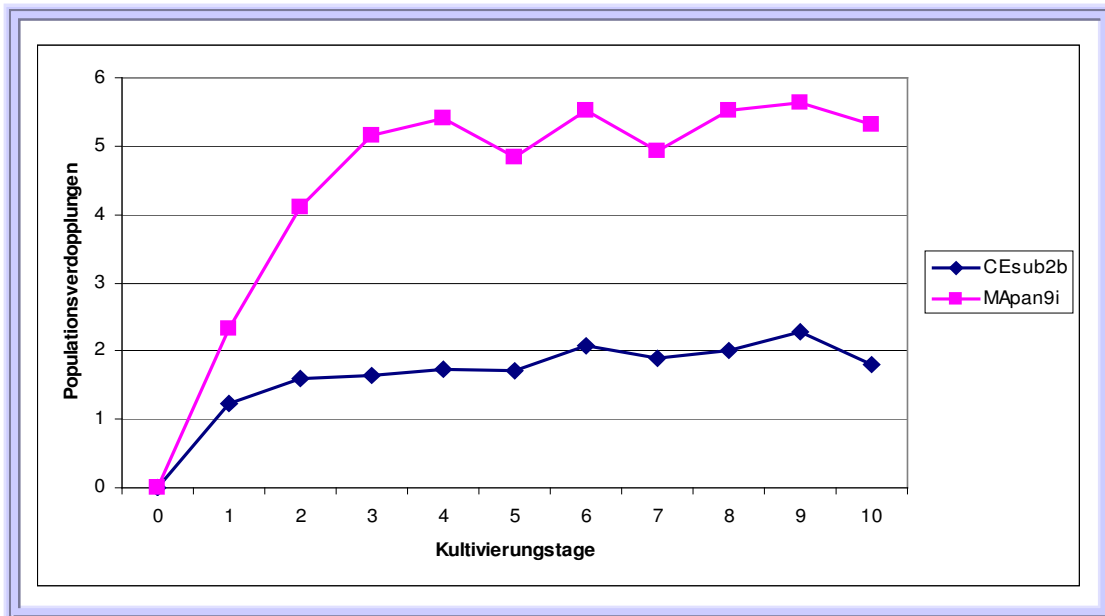


Abbildung 20: Die Graphik zeigt den Vergleich der Populationsverdopplungen der humanen (CEsub2b) und murinen (MApan9i) GSCs. Es wurden identische Zellzahlen (25.000 Zellen / 12 well) der beiden Zelllinien ausgesät und über einen Zeitraum von zehn Tagen täglich hinsichtlich der Zellzahl untersucht und die Dreifachbestimmung gemittelt. Mittels der Formel: $PD = \lg V_f / \lg 2$ wurde anschließend die Populationsverdopplung errechnet. Dabei konnte beobachtet werden, dass die murinen PSCs mit einer höheren Geschwindigkeit proliferieren als die humanen SGSCs.

3.2.2 Kultivierung und gezielte Differenzierung der GSCs mittels löslicher Wachstumsfaktoren

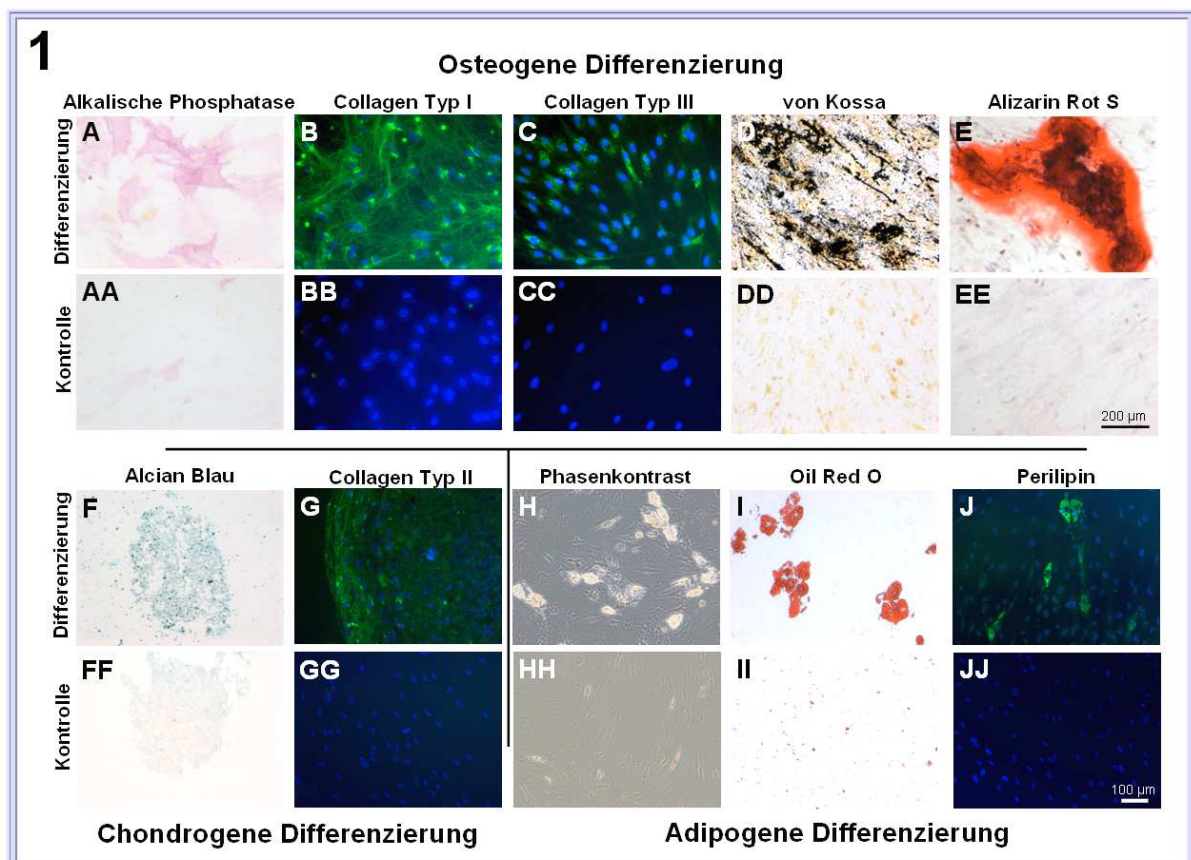
Das Potential der adulten Stammzellen aus menschlichem Pankreas konnte bisher nur hinsichtlich der spontanen Differenzierung in alle drei Keimblätter veranschaulicht werden [Kruse et. al, 2006, 2004]. Die gezielte Differenzierung der humanen SGSCs wurde sowohl innerhalb dieser Arbeit als auch von Gorjup et al. [2009] bereits durchgeführt. Hingegen konnte die gezielte Differenzierung der murinen PSCs erstmals im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden [Brose et. al, 2009]. Hierbei wurden zuerst Differenzierungsinduktoren eingesetzt, mittels derer die gezielte Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen (MSCs) in der Vergangenheit gezeigt werden konnte. Die Auswahl fiel dabei auf Faktoren, welche die Differenzierung in Richtung Knochen, Knorpel und Fett induzieren. Die Differenzierung der humanen und murinen GSCs wurde anschließend in Anlehnung

an Protokolle der MSC-Differenzierung in die osteogene, chondrogene und adipogene Richtung gezielt durchgeführt [Gonzalez et al., 2008].

Die gerichtete Differenzierung der beiden Stammzelllinien aus exokrinem Drüsengewebe in Richtung Knochen wurde mittels BMP-2 induziert. Dieser Differenzierungsinduktor gehört zu einer großen Unterfamilie der TGF β -Superfamilie. Diese Superfamilie umfasst eine große Gruppe sezernierter Proteine, die aufgrund ihrer strukturellen und biologischen Ähnlichkeiten in einzelne Unterfamilien aufgefächert werden. Das BMP-2 ist dabei in die Gruppe der BMPs (*bone morphogenic proteins*) integriert. Für die gezielte osteogene Differenzierung wurden die Zellen auf Standardkulturoberflächen bis zum Erreichen einer 80%igen Konfluenz kultiviert. Durch Austausch des Proliferationsmediums gegen das osteogene Differenzierungsmedium wurde das Heranreifen der Osteoblasten eingeleitet und über 21 Tage in definierten Zeitabständen erneuert. Nach Ablauf dieses Zeitraumes wurden die Zellen hinsichtlich ihres Differenzierungsstadiums auf die Aktivität der Alkalischen Phosphatase (ALP), die Collagen Typ I und III-Expression und die Kalzifizierung in der Extrazellulären Matrix (ECM) mittels der von Kossa- und Alizarin Rot S-Färbung untersucht. Die ALP gibt dabei Aufschluss über die Anzahl der Zellen, welche sich noch in einem frühen osteogenen Entwicklungsstadium befinden. Die Expression von Collagen Typ I und III hingegen ist charakteristisch für eine fortgeschrittenere Differenzierung der Zellen in Richtung Knochen. Die histologischen Färbungen mit Hilfe der von Kossa- und Alizarin Rot S-Färbung verdeutlichten die erfolgreiche Differenzierung von Vorläuferzellen zu ausgereiften Osteoblasten besonders stark. Die in der ECM abgelagerten anionischen Bestandteile von Kalziumverbindungen wie Karbonaten und Phosphaten wurden durch den Austausch von Kalzium gegen Silberionen braun-schwarz angefärbt. Der Erfolg der osteogenen Differenzierung konnte hier sowohl bei den humanen SGSCs (Abbildung 21.1 oben), als auch bei den murinen PSCs (Abbildung 21.2 oben) im Vergleich zu den korrespondierenden Kontrollen anhand der drei histologischen und zwei immunzytochemischen Färbemethoden gezeigt werden. Besonders deutlich wird der osteogene Reifezustand der beiden adulten Stammzelllinien an dem stark ausgeprägten Fibrillennetzwerk, welches jeweils mit einem Antikörper gegen Collagen Typ I und III (Abbildung 21.1 bzw. 21.2 B und C) visualisiert wurde. Die Färbung mittels des von Kossa-Reagenzes ist eine anerkannte histologische Analyseverfahren zum Nachweis reifer Osteoblasten. Diese Färbung zeigte einen

starken Unterschied der humanen (Abbildung 21.1 D) und murinen (Abbildung 21.2. D) Differenzierungsproben im Vergleich zu den BMP-2-unbehandelten Kontrollkulturen (Abbildung 21.1 DD und 21.2 DD). Unterstützend wurde die Mineralisierung, die mit der Knochendifferenzierung einhergeht, mit dem Färbereagenz Alizarin Rot S sichtbar gemacht (Abbildung 21.1 E bzw. 21.2 E). Alizarin Rot S bildet mit Kalzium farbige Chelatkomplexe, die sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch dokumentiert werden konnten.

Der Nachweis der osteogenen Differenzierung der BMP-2-behandelten Kulturen konnten neben der Kultivierung im Monolayer- auch im Pelletsystem mit Hilfe der histologischen Farbstoffe von Kossa und Alizarin Rot S gezeigt werden. Auch hier wurde die Mineralisierung in der ECM ausschließlich in den Differenzierungsproben nachgewiesen. Keine positiv gefärbten Zellen konnten hingegen in den unbehandelten Kontrollen detektiert werden (Anhang: Abbildung 38).



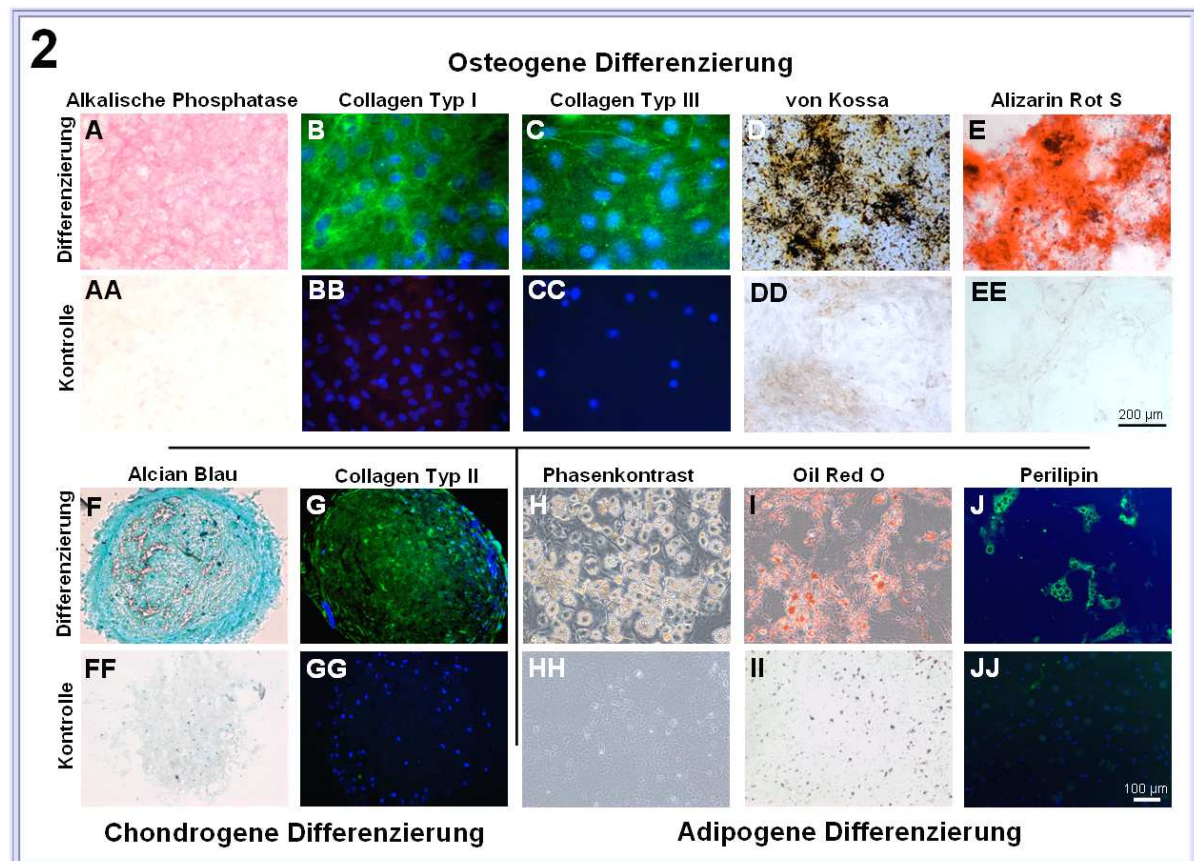


Abbildung 21: Humane und murine GSCs können gezielt mittels gelöster Faktoren in die osteogene, chondrogene und adipogene Richtung differenziert werden und weisen damit Multipotenz auf. Die Darstellung zeigt eine Zusammenstellung mikroskopischer Aufnahmen der Ergebnisse von Differenzierungsexperimenten mit humanen (1) und murinen (2) GSCs mittels verschiedener Induktoren in gelöster Form im Vergleich zu Kontrollexperimenten mit unbehandelten Zellen. Die Zellen wurden für 21 Tage mit BMP-2 (*bone morphogenic protein-2*) in die osteogene (A bis EE), mittels TGF β -3 (*transforming growth factor β -3*) in die chondrogene (F bis GG) und mit Hilfe von IGF-1 (*insuline-like growth factor-1*) in die adipogene (H bis JJ) Richtung differenziert. Die Differenzierungserfolge wurde mittels der folgenden Methoden nachgewiesen: Alkalische Phosphatase (A, AA), Collagen Typ I (B, BB), Collagen Typ III (C, CC), von Kossa (D, DD) und Alizarin Rot S (E, EE) für die osteogene Differenzierung; Alcian Blau (F, FF) und Collagen Typ II (G, GG) für die chondrogene Differenzierungsrichtung und Oil Red O (I, II) sowie Perilipin (J, JJ) zum Nachweis für die adipogene Differenzierung.

Für die Induktion der gezielten chondrogenen Differenzierung wurde der Wachstumsfaktor TGF β -3 ausgewählt. Dieser gehört ebenfalls zu der TGF β -Superfamilie und unterstützt als Mitglied der TGF β - (*transforming growth factors β*) Unterfamilie neben der Spezialisierung von Zellen in Chondrozyten auch Prozesse wie das Zellwachstum und Wachstumsinhibition, Apoptose, Organogenese, das

Festlegen der dorso-ventralen Körperachse im Embryo oder auch die Sekretion extrazellulärer Matrixproteine.

Die Differenzierung der humanen und murinen GSCs in Richtung Knorpel wurde in Form eines Zellpellets durchgeführt. Die Aggregation der Zellen ist die allgemein angewendete Form für die Differenzierung in Richtung Knorpel [Gonzalez et al., 2008]. Hierfür wurden 250.000 Zellen in ein Röhrchen gegeben und mittels Zentrifugation in die Pelletform überführt. Durch Austausch des Proliferationsmediums gegen das chondrogene Differenzierungsmedium wurde die Differenzierung initialisiert. In Vorbereitung auf die Analyse mittels histologischer und immunzytochemischer Färbemethoden wurden von den Zellaggregaten im Anschluss an die 21-tägige Inkubation sieben Mikrometer dünne Kryoschnitte angefertigt. Für die Überprüfung des chondrogenen Differenzierungserfolges wurden die Zellaggregate in einem ersten Schritt mit einer Alcian Blau-Färbung analysiert. Diese weist Proteoglykane und somit die extrazelluläre Matrix von Gewebe nach. Mittels dieser Färbung konnte ein deutlicher Unterschied sowohl bei den humanen (Abbildung 21.1 F) als auf murinen (Abbildung 21.2 F) GSCs in der Färbeintensität der Differenzierungsproben im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (Abbildung 21.1 bzw. Abbildung 21.2 FF) gezeigt werden. Hierbei ist jedoch eine effektivere Differenzierung der murinen PSCs in Chondrozyten zu beobachten, als in den Zellpellets der humanen Zellen. Diese zeigen im Vergleich zu den aus Mausgewebe isolierten adulten Stammzellen einen etwas schwächeren Proteoglykananteil, der durch das Anfärben mit Alcian Blau sichtbar gemacht wurde. Diese Ergebnisse wurden zusätzlich durch den Immunfluoreszenznachweis von Collagen Typ II unterstrichen. Auch hier konnte ausschließlich bei den Zellaggregaten, welche mit TGF β -3 kultiviert wurden, eine gute Expression des Collagen Typ II (Abbildung 21.1 bzw. 21.2 G) vergleichend zu den unbehandelten Kontrollpellets (Abbildung 21.1 bzw. 21.2 GG) beobachtet werden. Der Vergleich der humanen und murinen GSCs spiegelte auch mittels dieser Analysemethode die Ergebnisse der Alcian Blau-Färbung bezüglich der chondrogenen Differenzierungseffizienz wider. Hinsichtlich der Differenzierungsinduktion über die Festphase wurde die Kultivierung und Differenzierung der adulten Stammzellen von der Pelletform auf das Monolayersystem übertragen (Anhang: Abbildung 38). Hierzu wurde das Proliferationsmedium gegen das chondrogene Differenzierungsmedium bei Erreichen einer 80%iger Konfluenz der humanen und murinen GSC-Kulturen ausgetauscht und die

Knorpeldifferenzierung initiiert. Für die Differenzierung der humanen SGSCs und murinen PSCs in Chondrozyten konnten äquivalente Differenzierungsergebnisse mittels der Aican Blau ermittelt werden [Brose et al., 2009].

Die gerichtete adipogene Differenzierung der humanen und murinen GSCs wurde mit dem Wachstumsfaktor IGF-1 (*insuline-like growth factor*) induziert. IGF-1, auch Somatomedin C genannt, ist ein Wachstumsfaktor, der strukturell dem Insulin sehr ähnlich ist. Diese beiden adipogenen Wachstumsfaktoren weisen hohe Sequenzhomologien auf und sind Teil eines komplexen Systems, das Körperzellen nutzen, um mit ihrer Umgebung zu kommunizieren. In Vorbereitung auf die Differenzierung der CEs_{ub}2b und MA_{pan}9i in Adipozyten wurden die Zellen analog zur osteogenen und chondrogenen Differenzierung bis zu einer 80%igen Konfluenz des Zellrasens kultiviert. Um die Fettdifferenzierung zu starten, wurde das Proliferationsmedium durch das IGF-1-enthaltende Differenzierungsmedium ersetzt und die Zellen in Standardkulturgefäßen über 21 Tage differenziert. Die Bildung der Fettvesikel kann während der Differenzierung sehr gut im Phasenkontrastmikroskop (Abbildung 21.1 bzw. 21.2 H; Kontrolle Abbildung 21.1 bzw. 21.2 HH) beobachtet werden. Dies bietet den Vorteil, den Differenzierungserfolg ohne vorzeitige Beendigung des Experimentes zur Spezialisierung der Zellen zu Adipozyten verfolgen zu können. Nach Ablauf des Differenzierungszeitraumes wurden die Zellen fixiert und anschließend den Analysemethoden zugeführt. Dabei wurde sowohl eine histologische Färbung als auch ein immunzytochemischer Nachweis des Differenzierungserfolges durchgeführt. Hierbei wurden die IGF-1-behandelten Differenzierungsproben (Abbildung 21.1 bzw. 21.2 I) und unbehandelten Kontrollen (Abbildung 21.1 bzw. 21.2 II) einer Färbung mit Oil Red O unterzogen. Dieser rote Farbstoff ist aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften nur in Fett löslich und deshalb nach Abschluss der Färbung ausschließlich in Fettvesikeln lokalisiert. Mittels dieses Farbstoffes konnte im Vergleich zu den parallel kultivierten Kontrollen bei beiden adulten Stammzelllinien eine erfolgreiche Differenzierung der Zellen in Adipozyten unter Einfluss von gelöstem IGF-1 ermittelt werden. Neben der Beobachtung der Fettvesikelentwicklung unter Zuhilfenahme eines Phasenkontrastmikroskopes und der Behandlung mit dem lipophilen Oil Red O-Farbstoff wurde zusätzlich ein immunzytochemischer Nachweis durchgeführt. In diesem Schritt wurde die Expression von Perilipin, ein in der Membran von Fettvesikeln lokalisiertes Protein, betrachtet. Auch mittels dieser Analysemethode konnte die effiziente adipogene

Differenzierung der humanen (Abbildung 21.1 J) und murinen (Abbildung 21.2 J) GSCs im Vergleich zu den korrespondierenden Kontrollen (Abbildung 21.1 bzw. 21.2 JJ) gezeigt werden. Wie schon im Zuge der chondrogenen Differenzierung ergibt sich bei der Gegenüberstellung der Differenzierungsproben der CEs_{sub}2b und den MApan9i ein Unterschied in der Differenzierungseffizienz, die bei den drei Methoden gleichermaßen deutlich wird. Die murinen PSCs zeigen sowohl bei der Betrachtung der Fetttröpfchen im Phasenkontrast als auch bei dem Nachweis der Fettvesikel mit dem histologischen Farbstoff Oil Red O und einem Antikörper gegen Perilipin eine stärkere adipogene Differenzierung als sie bei den humanen SGSCs zum Zeitpunkt des Differenzierungsabbruchs nachgewiesen werden konnte.

Wenn man die Ergebnisse der ostetogenen, chondrogenen und adipogenen Differenzierung der adulten Stammzellen aus exokrinem Drüsengewebe zusammenfassend betrachtet, zeigten beide adulten Stammzelllinien das Potential zur Differenzierung in alle drei Richtungen. Bei den murinen GSCs konnte dabei eine fortgeschrittenere Differenzierung in knochen-, knorpel- und fettbildende Zellen beobachtet werden als bei den unter identischen Bedingungen kultivierten und differenzierten humanen GSCs nachgewiesen werden konnte.

3.3 Auswahl geeigneter Oberflächen und Strategien zur Immobilisierung von Wachstumsfaktoren für die gezielte Zelldifferenzierung

3.3.1 Oberflächen

Für die gezielte Differenzierung über die Festphase war es notwendig, geeignete Oberflächen und Strategien zur Immobilisierung der für die gezielte Differenzierung in Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten wirksamen Wachstumsfaktoren zu identifizieren. Hierfür wurden Glasoberflächen ausgewählt, welche in einem ersten Schritt mit Amino- bzw. Epoxysilan beschichtet wurden. Mittels des Kopplungsreagenzes 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid (EDC)-Methylimidazol war es möglich, die Wachstumsfaktoren über das Phosphatende kovalent an die Glasoberflächen zu koppeln. In Ergänzung zu der Kopplungsmethode mit EDC in Verbindung mit Methylimidazol wurden die amino- und epoxysilanisierten Oberflächen alternativ mittels EDC-N-hydroxysuccinimid (NHS) mit Wachstumsfaktoren modifiziert. Das EDC-NHS-System findet dabei oft Anwendung bei der Beschichtung von Microarrays und Biochips.

Eine weitere Möglichkeit Proteine an Oberflächen zu binden, stellt das Avidin-Biotin-System dar. Mittels diesem ist die höchste affine, nicht-kovalente Bindung mit einem besonders geringen Dissoziationskonstanten von $KD = 10^{-15}$ M möglich. Die Anwendung dieses Systems setzt zum einen die kovalente Kopplung von Avidin, Neutravidin oder Steptavidin an Glasoberflächen und zum anderen die Verfügbarkeit von biotinylierten Wachstumsfaktoren voraus. Im Rahmen der Immobilisierung von Wachstumsfaktoren dieser Arbeit kam das synthetisch hergestellte Neutravidin zur Anwendung.

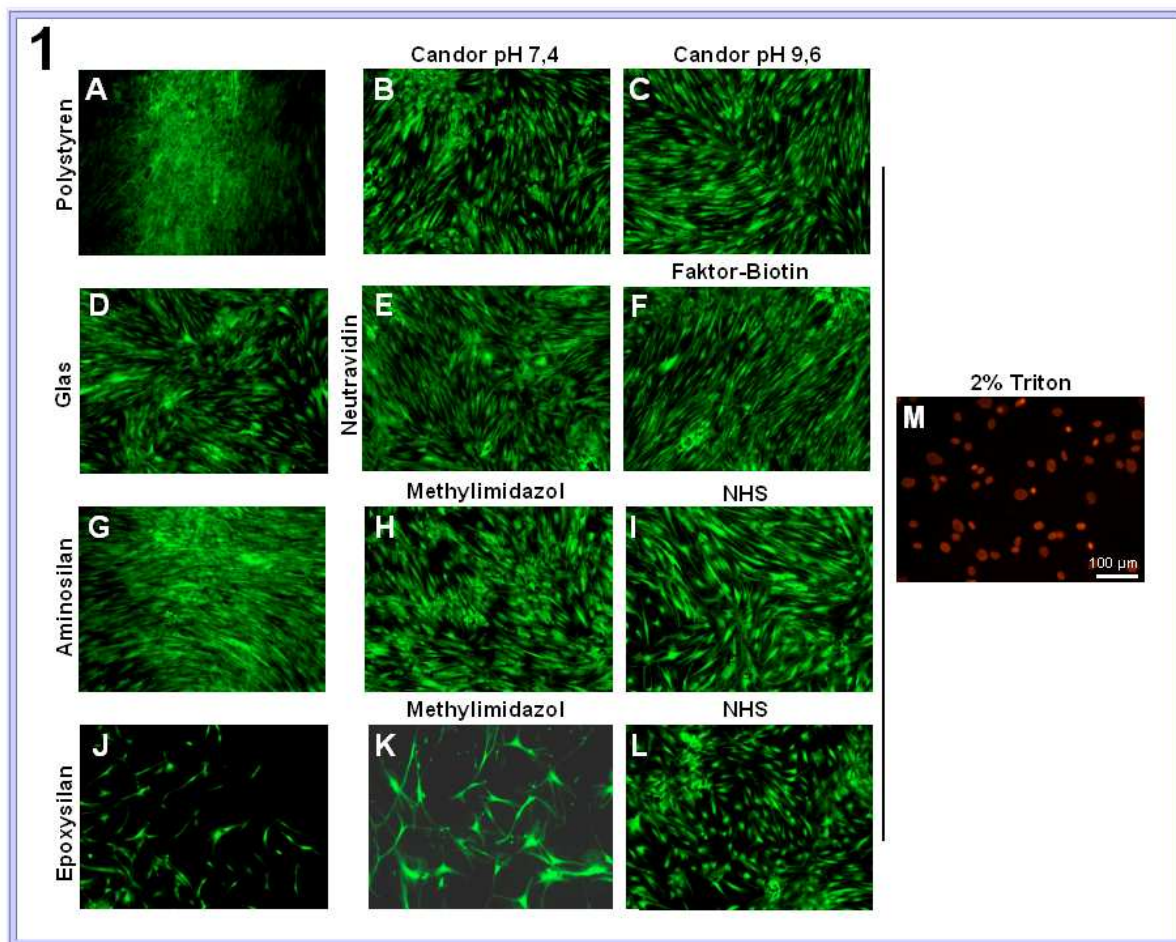
Um auch die Standardkulturoberfläche Polystyren mit in die festphasenvermittelten Differenzierungsversuche einbeziehen zu können, wurden von der Firma Candor zwei Kopplungspuffer mit unterschiedlichen pH-Werten zur adsorptiven Immobilisierung von Wachstumsfaktoren ausgewählt.

3.3.2 Zytotoxizität der Oberflächen

Als Möglichkeit zur Bestimmung der Zytotoxizität der humanen und murinen GSCs auf den verschiedenen Substraten wurden drei verschiedene Methoden durchgeführt.

Als erstes erfolgte die Untersuchung der Substrate hinsichtlich der Zytotoxizität mit Hilfe einer Lebend-Tod-Färbung, bei der Fluoresceindiacetat und Propidiumjodid zum Einsatz kamen. Die Zellen wurden hierbei hinsichtlich ihrer Membranintegrität analysiert. Da eine geschädigte Membran nicht zwangsläufig das Absterben einer Zelle bedeuten muss, ist der Begriff der Lebend-Tod-Färbung nicht klar definiert. Dennoch gilt diese Methode als ein schnelles und einfaches Mittel zur Überprüfung von Mikroorganismenpopulationen im medizinisch-technischen Bereich, der Lebensmittelüberwachung oder der Umweltmikrobiologie. Sie gibt so auch schnell Aufschluss über die Verträglichkeit der hier getesteten modifizierten und unmodifizierten Oberflächen. Diskutiert und allgemein anerkannt ist die Bezeichnung „vital mit der Fähigkeit zur Zellteilung“ für diese Analysemethode [Kell et al., 1998].

Mittels dieser Färbemethode konnte nachgewiesen werden, dass sowohl die CEs_{ub2b} (Abbildung 22.1), als auch die MA_{pan9i} (Abbildung 22.2) während der Kultivierungszeit von sieben Tagen auf den einzelnen Oberflächen eine gute Viabilität und hohe Stoffwechselaktivität bezüglich des Enzymumsatzes von Fluoresceindiacetat zu Fluorescein aufwiesen. Während der fluoreszenz-mikroskopischen Analyse konnten ausschließlich grüne, vitale Zellen auf den Substraten beobachtet werden. Im Vergleich zu den Kontrolloberflächen Polystyren (Abbildung 22 A) und Glas (Abbildung 22 D) zeigten fast alle getesteten Substrate mit (Abbildung 22 B, C, E, F, H, I, K und L) und ohne (Abbildung 22 G) Wachstumsfaktormodifizierung eine ähnliche Zellanzahl. Sowohl bei den humanen als auch bei den murinen GSCs wurden ausschließlich auf den unmodifizierten epoxysilanisierten Glasoberflächen (Abbildung 22 J) und zusätzlich bei den GSCs des Menschen auf der Epoxysilanoberfläche, welche mittels der EDC-MI-Kopplungsmethode (Abbildung 22.1 K) funktionalisiert wurde, geringere Zellzahlen beobachtet. Die mitgeführte Positivkontrolle, in der dem Zellkulturmedium 2% Triton (Abbildung 22 M) zugesetzt wurden, spiegelte die erfolgreiche Durchführung der Färbung wider.



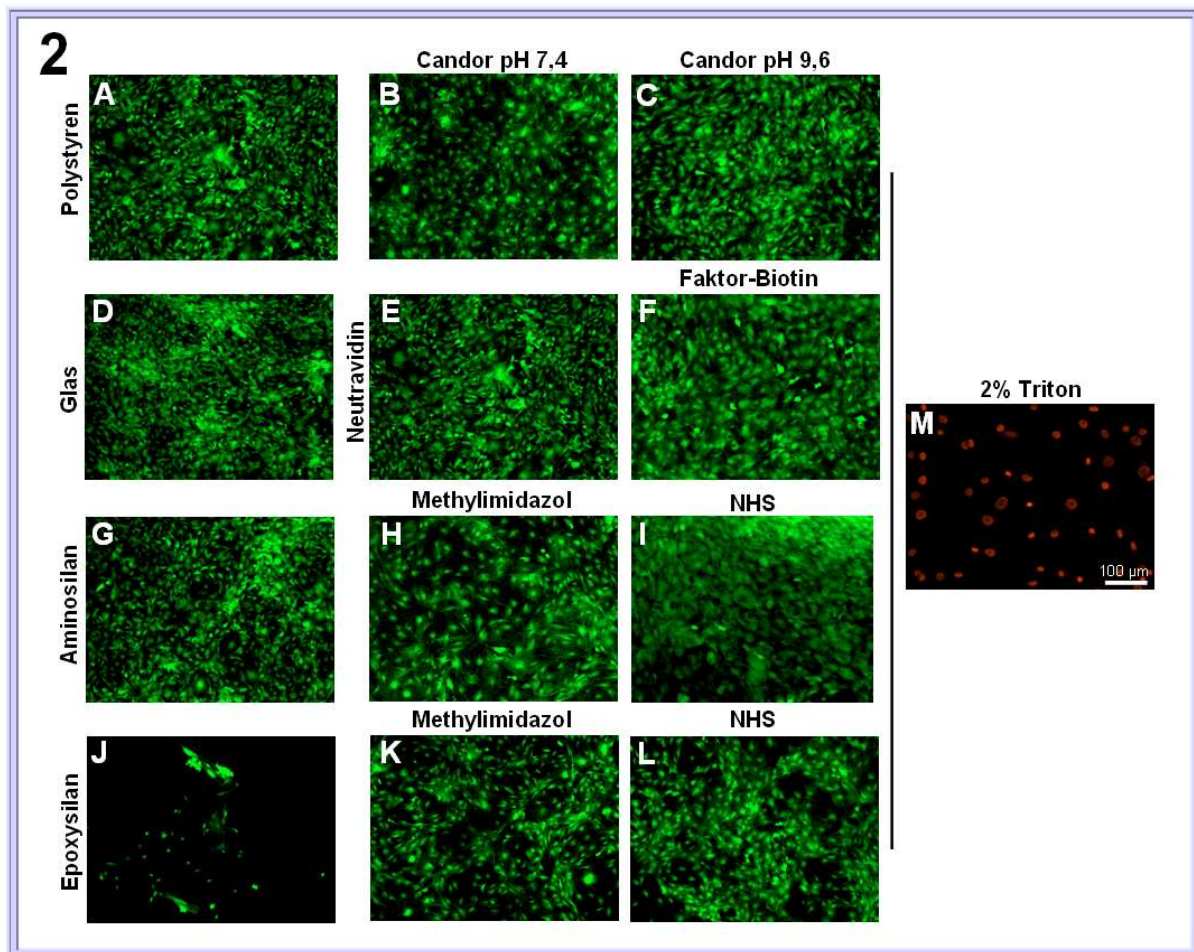


Abbildung 22: Die Lebend-Tod-Färbung der humanen (1) und murinen (2) GSCs zeigt eine gute Biokompatibilität der getesteten Substrate. Die Zellen weisen mittels der Lebend-Tod-Färbung (Fluoresceindiacetat (grün) –Propidiumjodid (rot)) eine sehr gute Verträglichkeit und Viabilität während der Kultivierung auf den untersuchten Oberflächen sowohl ohne Faktorkopplung (A, D, G) als auch mit immobilisiertem BMP-2 (B, C, E, F, H, I, K, L) im Vergleich zu Standardoberflächen wie Polystyren (A) und Glas (D) auf. Ausschließlich auf den epoxysilanisierten Glasoberflächen (J) sowohl bei den humanen als auch den murinen Kulturen und auf den mittels EDC-MI modifizierten Epoxyoberflächen bei den humanen GSCs wurden geringere Zellzahlen beobachtet. Als Negativkontrolle diente eine Probe, deren Medium 2% Triton zugesetzt wurde, auf dieser konnten keine vitalen Zellen beobachtet werden (M).

Eine weitere Methode, die für die Zytotoxizitätsuntersuchungen herangezogen wurde, ist die Analyse der Laktatdehydrogenaseaktivität. Die Laktatdehydrogenase (LDH) ist am Grundstoffwechsel der Zelle beteiligt. Sollte diese im Zellkulturüberstand nachweisbar sein, ist die Membranintegrität der betroffenen Zellen nicht mehr gegeben. Daher kann dieses Enzym als Marker für die Vitalität der humanen und murinen GSCs auf den getesteten Oberflächen herangezogen werden, und es

gibt Aufschluss über die Zytotoxizität der Substrate ohne Wachstumsfaktormodifikation.

Die Zellen wurden hierfür über einen Zeitraum von sieben Tagen auf den unmodifizierten Oberflächen kultiviert. Am Tag zwei und sieben wurden den Zellkulturüberständen Proben entnommen und diese hinsichtlich des LDH-Gehalts photometrisch untersucht. Die gemessene optische Dichte korreliert dabei direkt mit der Menge an LDH, die hier ein Maß für die Anzahl der geschädigten Zellen darstellt. Wie der Vergleich der Ergebnisse der Probenüberstände mit den Werten der Positivkontrolle (2% Triton) und Negativkontrolle (Medium + Zellen) zeigte, konnten nur geringe Mengen an LDH in den Zellkulturüberständen der auf Substraten proliferierenden Zellen nachgewiesen werden. Die ermittelten LDH-Werte der CEs_{ub2b} (Abbildung 23 links) lagen bei 10% bezogen auf die Positivkontrolle, wohingegen bei den MA_{pan9i} (Abbildung 23 rechts) etwas höhere Werte (25 bis 30%) bezüglich der LDH im Zellkulturüberstand bestimmt wurden. Somit lag bei den murinen GSCs eine leichte Reduzierung der Substratverträglichkeit vor.

Im Gegensatz zu den betrachteten Substraten bewirkte 2% Triton, das als Detergenz in wenigen Minuten die Membran permeabilisiert, in der Positivkontrolle eine drastische Erhöhung der LDH im Zellkulturüberstand. Dies lässt den Schluss zu, dass die CEs_{ub2b} und MA_{pan9i} die getesteten Substrate als Kultivierungsoberfläche gut tolerieren.

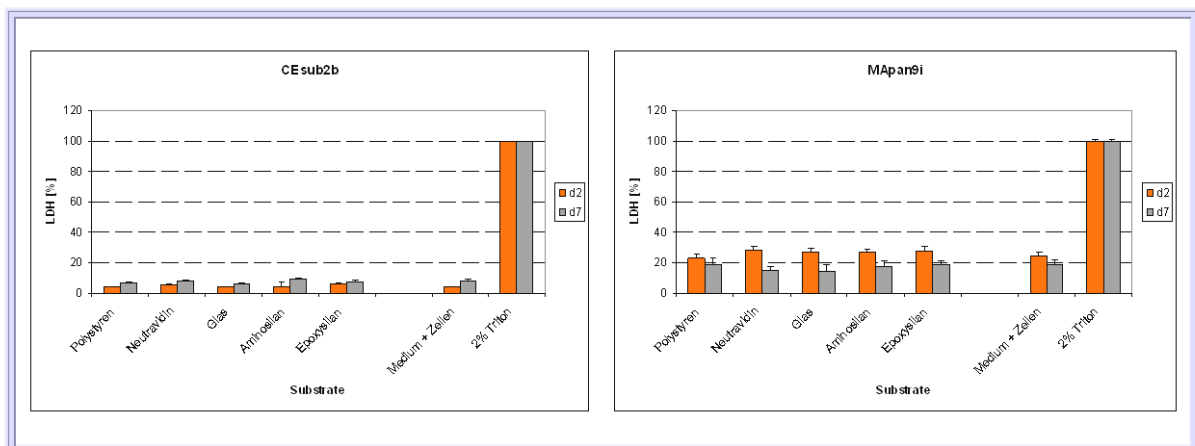


Abbildung 23: Die humanen und murinen GSCs weisen im Laktatdehydrogenase (LDH)-Aktivitätstest eine gute Verträglichkeit der Substrate auf. Im Verlauf von zwei bis sieben Tagen wurden sowohl bei den humanen (CE_{sub2b}) als auch bei den murinen (MA_{pan9i}) Stammzellen geringe LDH-Werte ermittelt. Diese lassen auf eine geringe Absterberate der Zellen auf den getesteten Oberflächen schließen. Zum Ermitteln der Daten wurden verschiedene Kontrollen (Medium

ohne Zellen auf Polystyren, von allen Messwerten abgezogen; Medium mit Zellen auf Polystyren und Zellen mit 2% Triton als Zusatz im Medium) herangezogen. Der prozentuale Anteil der getesteten Proben ist bezogen auf die Positiv (2% Triton)- und Negativ (Zellen + Medium) –Kontrollen als Mittelwert + SD ($n \geq 3$) dargestellt.

Um ein möglichst genaues Bild der Verträglichkeit der ausgewählten Oberflächen gegenüber den humanen SGSCs und murinen PSCs Stammzellen zu erhalten, wurde neben der Vitalfärbung mit Fluoresceindiacetat und Propidiumjodid und dem LDH-Assay zusätzlich die Zellproliferation mit Hilfe des Cell Proliferation Reagent WST-1 Testkits der Firma Roche analysiert. Hierfür wurden die Zellen, analog zu der Untersuchung der LDH, für sieben Tage auf den unmodifizierten Substraten kultiviert. Die Stoffwechselaktivität wurde auch hier an Tag zwei und sieben untersucht. Für die Betrachtung der verschiedenen Substrate, auf denen CEs_{ub}2b (Abbildung 24 links) und MApan9i (Abbildung 24 rechts) kultiviert wurden, ergab sich ein ähnlicher graphischer Verlauf. Außer dem Substrat Epoxysilan zeigten die GSCs auf allen unmodifizierten Oberflächen im Vergleich zu der Positivkontrolle (2% Triton) und der Negativkontrolle (Medium + Zellen) eine hohe metabolische Stoffwechselaktivität. Ein erniedrigter Effekt bezüglich des Stoffwechselmetabolismus war bei den humanen (40%) wie murinen (30%) adulten Stammzellen gleichermaßen zu beobachten.

Auch diese Methode zeigt die relativ gute Verträglichkeit der unmodifizierten Substrate gegenüber der Kultivierung der adulten Stammzellen.

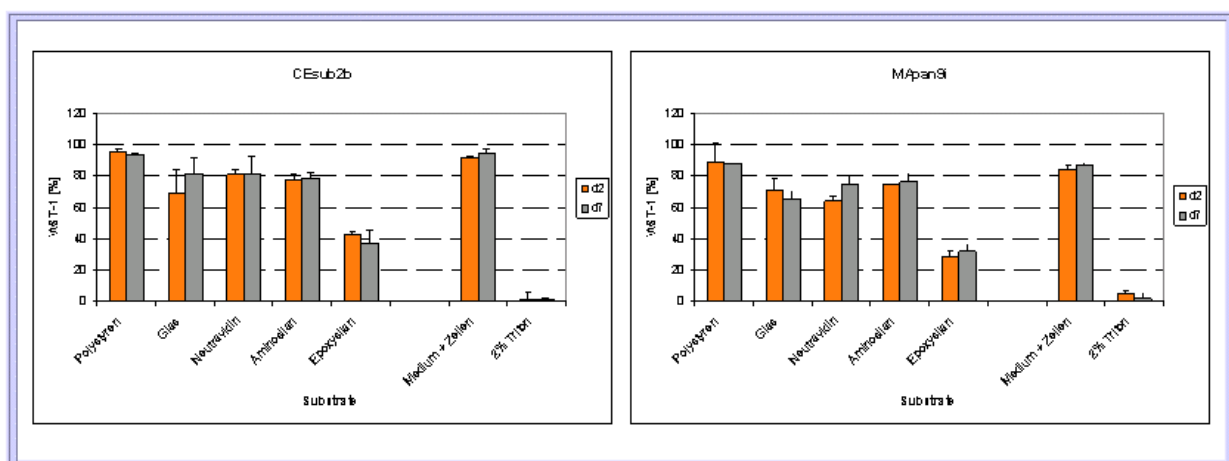


Abbildung 24: Die Stoffwechselaktivität der humanen und murinen GSCs zeigt auf den getesteten Oberflächen eine gute Biokompatibilität. Die Graphik stellt die Messung der stoffwechselaktiven Zellen der humanen (CE_{sub}2b) und murinen (MApan9i) GSCs auf Oberflächen

ohne Wachstumsfaktorkopplung dar. Beide Zelllinien wiesen auf den untersuchten Oberflächen eine gute Verträglichkeit im Vergleich zu den Kontrollansätzen auf. Eine Reduktion der Stoffwechselaktivität war auf der epoxy-silanisierten Oberfläche zu beobachten. Zum Ermitteln der Daten wurden verschiedene Kontrollen (Medium ohne Zellen auf Polystyren, von allen Messwerten abgezogen; Medium mit Zellen auf Polystyren und Zellen mit 2% Triton als Zusatz im Medium) herangezogen. Der prozentuale Anteil der getesteten Proben ist bezogen auf die Positiv (Zellen + Medium)- und Negativ (2% Triton) –Kontrollen als Mittelwert + SD ($n \geq 3$) dargestellt.

Für die Untersuchung der Zytotoxizität der getesteten, unmodifizierten Substrate im Vergleich zu Standardkulturoberflächen (Glas und Polystyren) wurden Tests hinsichtlich der Viabilität, der LDH- und der Stoffwechselaktivität durchgeführt. Diese drei Methoden basieren auf unterschiedlichen zellulären Prozessen. Die Ergebnisse dieser drei Analysemethoden zusammenfassend betrachtet, ergibt ein positives Bild bezüglich der Vitalität der humanen und murinen GSCs auf den verschiedenen unmodifizierten Oberflächen. Die Substrate zeigen einen leichten zytotoxischen Effekt und somit eine gute Verträglichkeit.

3.3.3 Zytotoxizität der Substrate mit immobilisierten Wachstumsfaktoren

Um ein detaillierteres Bild von den Bedingungen zu bekommen, welchen die adulten Stammzellen im Zuge der oberflächeninduzierten Differenzierung ausgesetzt sind, wurde auch das Zusammenspiel von Oberflächen und Wachstumsfaktoren in Verbindung mit Kopplungsstrategien auf einen zytotoxischen Effekt hin bezüglich der LDH-Aktivität untersucht. Hierbei zeigte sich in der graphischen Darstellung (Abbildung 25), dass bei beiden adulten Stammzelllinien der adipogene Differenzierungsinduktor IGF-1 (Abbildung 25.2) eine bessere Verträglichkeit auf allen Oberflächen mit den entsprechenden Kopplungsmethoden aufweist als die identische Immobilisierung von BMP-2 (Abbildung 25.1) auf den getesteten Oberflächen. Die Reaktion der murinen PSCs auf den Oberflächen in Verbindung mit IGF-1 fällt mit 10 bis 25% etwas niedriger aus als die ermittelten Werte (10 bis 15%) für die humanen SGSCs. Bei der Betrachtung der Verträglichkeit der Kombination von Oberflächen und gekoppelten BMP-2 anhand der LDH-Aktivitätsuntersuchung zeigte sich ein relativ einheitliches Bild. Bei beiden GSCs war eine Reaktion von 10 bis 30% bezüglich der Zytotoxizität zu beobachten.

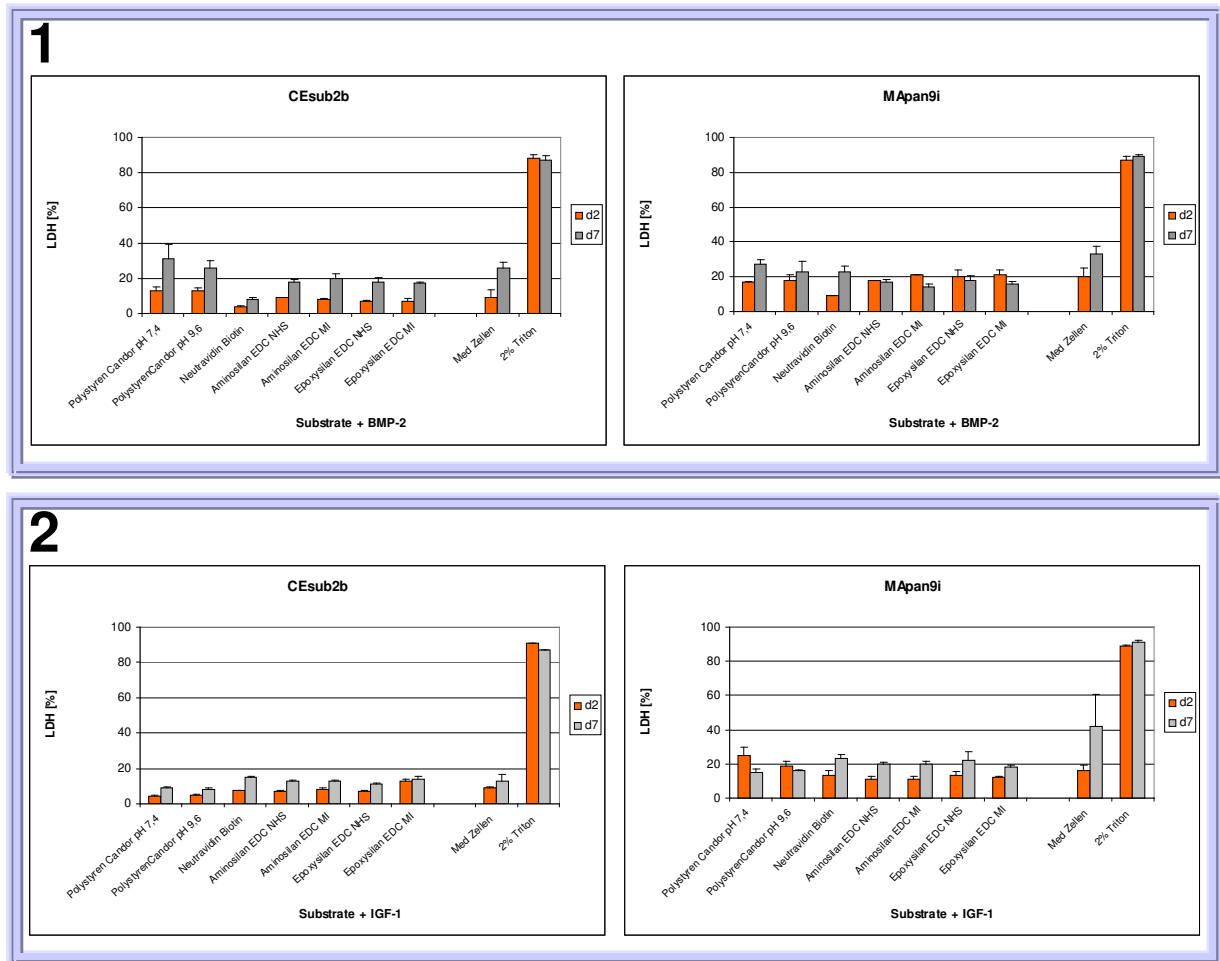


Abbildung 25: Graphische Darstellung der quantifizierten Analyse der Laktatdehydrogenaseaktivität der humanen SGSCs und murinen PSCs auf Oberflächen mit BMP-2- (1) und IGF-1- (2) Modifizierung. Innerhalb von sieben Tagen wurden Messwerte zur LDH-Aktivität aus dem Zellkulturüberstand der GSCs beider Species sowohl von BMP-2- als auch IGF-1-beschichteten Oberflächen gewonnen. Zum Ermitteln der Daten wurden verschiedene Kontrollen (Medium ohne Zellen auf Polystyren, von allen Messwerten abgezogen; Medium mit Zellen auf Polystyren und Zellen mit 2% Triton als Zusatz im Medium) herangezogen. Der prozentuale Anteil der getesteten Proben ist bezogen auf die Positiv (2% Triton)- und Negativ (Zellen + Medium) –Kontrollen als Mittelwert + SD ($n \geq 3$) dargestellt.

Die zusammenfassende Betrachtung der Ergebnisse für die Untersuchung der LDH-Aktivität hinsichtlich der Verträglichkeit der Oberflächen in Verbindung mit gekoppeltem IGF-1 und BMP-2 zeigte ein inhomogenes Bild. Die ermittelten Werte lieferten für die humanen SGSCs leicht abweichende Ergebnisse als für die murinen PSCs. Im Vergleich zu den mitgeführten Negativkontrollen (Medium + Zellen) relativieren sich diese Werte jedoch wieder. Da die Werte der Negativkontrollen von MÅpan9i sowohl bei den Untersuchungen bezüglich der Verträglichkeit der

Oberflächen in Kombination mit IGF-1 als auch BMP-2 die ermittelten Werte für die getesteten Oberflächen übersteigen, liegen weniger Membranschäden bei den kultivierten Zellen auf den wachstumsfaktormodifizierten Oberflächen vor. Im Gegensatz zu den betrachteten Substraten bewirkte die Positivkontrolle mit 2% Triton, das als Detergenz die Membran in wenigen Minuten die Membran permeabilisiert, eine drastische Erhöhung der LDH im Zellkulturüberstand.

3.4 Stabilität der immobilisierten Wachstumsfaktoren

Für die festphaseninduzierte Differenzierung der humanen und murinen adulten Stammzellen ist eine stabile Kopplung der Wachstumsfaktoren auf den Oberflächen wichtig [Ito, 2008]. Zur Überprüfung der verbleibenden Faktoren auf den Oberflächen nach Kopplung und Inkubation wurden Antikörperfärbungen gegen den immobilisierten Wachstumsfaktor durchgeführt und diese anschließend im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Hierbei wurden verschiedene Intensitäten der unterschiedlich gekoppelten Faktoren ermittelt. Die stärksten Signale wurden bei der Kopplung von BMP-2 mittels den Candor-Puffer pH 7,4 (Abbildung 26 A) und auch pH 9,6 (Abbildung 26 B) auf Polystyrenoberflächen detektiert. Eine mittlere Signalstärke konnte bezüglich der Kopplung des osteogenen Wachstumsfaktors auf Neutravidin (Abbildung 26 C) ermittelt werden. Hierbei wurde ein mit Biotin modifiziertes BMP-2 für das Aufspotten auf die Oberfläche genutzt. Analoge Ergebnisse wurden für BMP-2 auf amino- (Abbildung 26 D) und epoxysilanisierten (Abbildung 26 F) Glasoberflächen erreicht mittels Kopplung durch EDC-Methylimidazol. Deutlich schwächere Fluoreszenzsignale ergab die Überprüfung der Faktorstabilität mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung bei der Immobilisierung des Induktors für die Osteoblastendifferenzierung mit EDC-NHS (Abbildung 26 E, G).

Um zu überprüfen, ob die Signale der Fluoreszenzmikroskopie auf die Spezifität des zur Analyse ausgewählten Antikörpers zurückzuführen ist, wurden zu allen Kopplungsmethoden, die den entsprechenden Oberflächeneigenschaften zu geordnet sind, Kontrollfärbungen bezüglich des Isotyps (Abbildung 26 AA bis GG) durchgeführt.

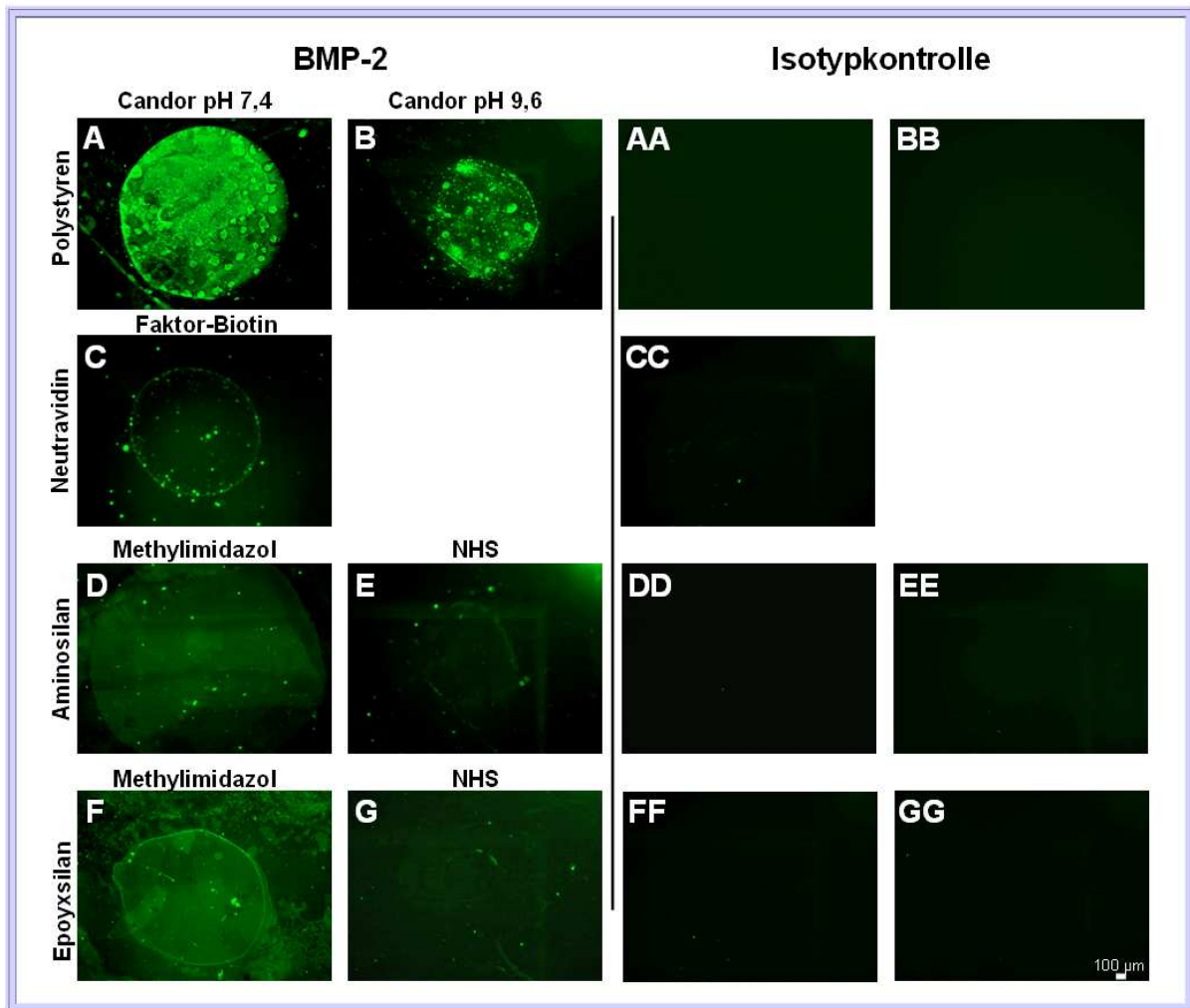


Abbildung 26: Die Stabilität des gespotteten Wachstumsfaktors (BMP-2) auf den unterschiedlichen Oberflächen wurde mittels einer Immunfluoreszenzfärbung nach 14-tägiger Inkubation ermittelt. Die fluoreszenzmikroskopischen Bilder zeigen die Präsenz der Faktoren, die durch verschiedene Kopplungsmethoden auf die entsprechenden Oberflächen immobilisiert wurden (A bis G). Zur Überprüfung der Antikörperspezifität wurde eine Färbung gegen den Isotyp als Kontrolle durchgeführt, welche keine Färbung aufwies (AA bis GG).

Zur weiteren Charakterisierung der Immobilisierungsstabilität wurde mit allen Oberflächen, auf denen zuvor der osteogene Differenzierungsfaktor gekoppelt wurde, ein ELISA-Assay (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) (Abbildung 27) durchgeführt. Befinden sich im Überstand der zu untersuchenden Substratprobe Moleküle des gespotteten Faktors, werden diese durch einen spezifischen Antikörper gebunden und über eine enzymvermittelte Farbreaktion sichtbar gemacht. Dieser Farbumschlag wird dann von einem Spektralphotometer gemessen und ist ein direktes Maß für die Anzahl der Faktormoleküle im Überstand. Um eine Aussage über die Faktorkonzentration der im Substratüberstand befindlichen Moleküle treffen

zu können, wurde ein Proteinstandard in Form einer Eichreihe im Experiment mitgeführt. Nach dem Aufspotten von BMP-2 auf die verschiedenen Oberflächen wurden die Substrate über Nacht bei 4°C inkubiert und am darauf folgenden Tag dreimal kräftig mit PBS gewaschen. In diesen Waschpuffern konnte bei Analyse mittels ELISA eine Konzentration von 1,7 bis 4,25 ng/ml BMP-2 für die verschiedenen Oberflächen ermittelt werden. Zu Beginn des Differenzierungsexperimentes, und somit dem Plattieren der adulten Stammzellen, wurde dagegen nur eine BMP-2-Konzentration von maximal 0,6 ng/ml im Überstand ermittelt. Diese wurde auch für die Differenzierungstage zwei und drei beobachtet. Für den weiteren Verlauf der osteogenen Differenzierung der humanen und murinen GSCs von Tag vier bis 21 wurde keine detektierbare Konzentration des Induktors für die Osteoblastenbildung im Substratüberstand detektiert.

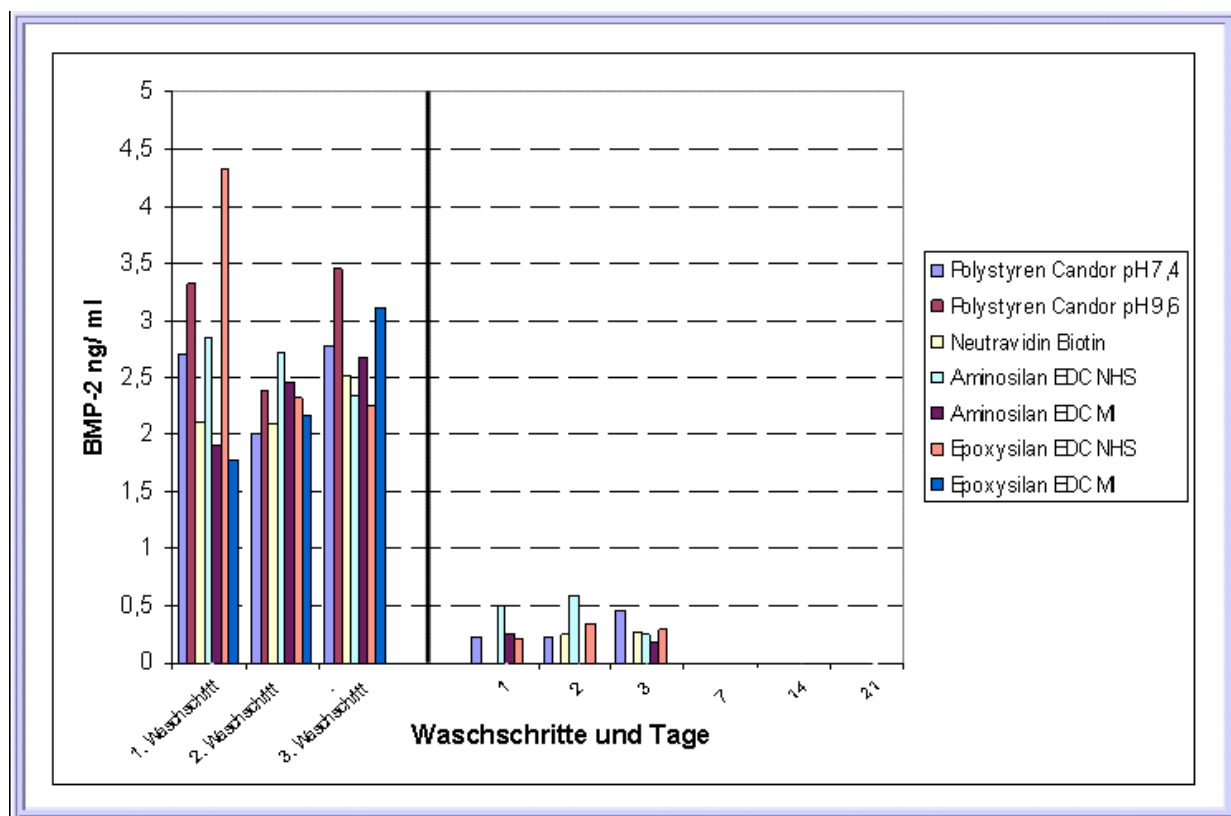


Abbildung 27: Der immobilisierte Wachstumsfaktor weist eine gute Stabilität an den verschiedenen Oberflächen auf. Mit Hilfe des Quantikin-ELISA-Assays konnten nach den drei Waschsritten nur geringe Konzentrationen von BMP-2 im Überstand der ersten drei Inkubationstage der Substrate ermittelt werden. Während der weiteren Inkubation bis zum Tag 21 konnte der Wachstumsfaktor der osteogenen Differenzierung nicht im Substratüberstand detektiert werden.

3.5 Differenzierung der GSCs mittels immobilisierter

Wachstumsfaktoren auf unterschiedlich modifizierten Oberflächen

Die oberflächeninduzierte Differenzierung der aus exokrinem Drüsengewebe isolierten adulten Stammzellen durch immobilisierte Wachstumsfaktoren setzt die Induktion der Differenzierung mit Wachstumsfaktoren, die im Medium gelöst vorliegen, voraus. Zum anderen ist die gezielte Differenzierung dieser Stammzellen eine weitere Basis für den Erfolg der Zelldifferenzierung über die Festphase.

3.5.1 Adipogene Differenzierung

Im ersten Ansatz wurde die gezielte festphaseninduzierte Differenzierung der murinen GSCs in die adipogenen Differenzierungsrichtung untersucht. Hierzu wurde der die Adipozytendifferenzierung fördernde Wachstumsfaktor IGF-1 kovalent an amino- und epoxysilanisierte Glasoberflächen immobilisiert. Die IGF-1-Moleküle für die spezifische Kopplung an Neutravidin wurden in einem vorangegangenen Schritt mit Biotin modifiziert. Das Auftragen des adipogenen Faktors auf Neutravidin-, Aminosilan- und Epoxysilanoberflächen wurde in einer Konzentration von 100 ng/ml durchgeführt. Nach Spotten des Wachstumsfaktors, Inkubation über Nacht bei 4 °C und nachfolgenden Waschvorgängen wurden die IGF-1-modifizierten Oberflächen in Zellkulturgefäße überführt, in diese wurden anschließend die Zellen ausplattiert. Im Gegensatz zu der Aussaat für die Differenzierung mit löslich vorliegendem Faktor wurde die Zellzahl für festphaseninduzierte Differenzierung erhöht. Die Differenzierung wurde durch Ausplattieren der Zellen in Differenzierungsmedium ohne Faktor und somit direkt nach Anhaften der Zellen auf den faktorbeschichteten Oberflächen gestartet. Bei diesem Experimentalaufbau, der für die Untersuchung der Fettdifferenzierung gewählt wurde, bildet das oberflächenumgebende Areal in der Kulturschale die Kontrollfläche (Schema in Abbildung 28 links). Somit befanden sich Differenzierungs- und Kontrollregion in unmittelbarer Nähe zueinander im gleichen Kulturgefäß und die Zellen sowohl im IGF-1-beschichteten Bereich als auch im Kontrollareal waren über das gleiche Medium miteinander verbunden. Im Verlauf der Inkubation der murinen GSCs auf den IGF-1-modifizierten Oberflächen konnte

mikroskopisch im Phasenkontrast die Entwicklung der für die adipogenen Differenzierung charakteristischen Fetttropfchen verfolgt werden. Im Anschluss an die 18-tägigen Inkubation wurde der adipogene Differenzierungserfolg der murinen Zellen mit Hilfe des lipophilen Farbstoffs Oil Red O analysiert. In Vorbereitung auf die Durchführung dieser histologischen Untersuchungsmethode wurden die Zellen zuvor einer Fixierung mit Formaldehyd unterzogen. Wie die Abbildung 28 zeigt, konnte der gekoppelte adipogene Faktor sowohl auf Neutraavidin (Abbildung 28 A) als auch auf den Aminosilan- (Abbildung 28 B) und Epoxysilan- (Abbildung 28 C) Oberflächen erfolgreich die Zellspezialisierung in Adipozyten auslösen. Im Vergleich dazu wurden auf den Kontrollflächen (Abbildung 28 AA bis CC) keine gefärbten Zellen detektiert.

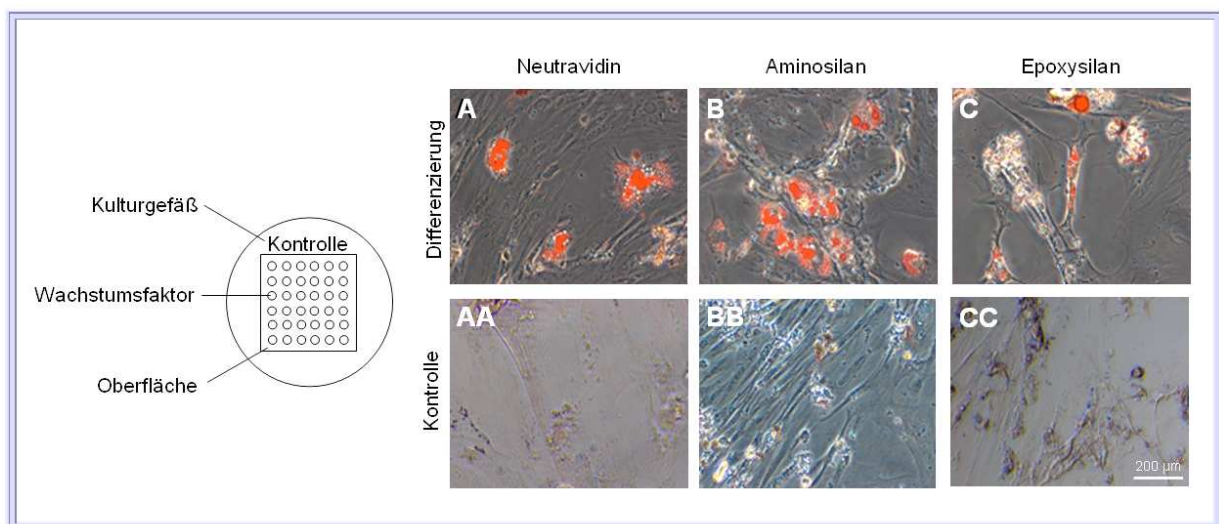


Abbildung 28: Die oberflächeninduzierte adipogene Differenzierung von murinen GSCs (MApan9i) ist durch immobilisiertes IGF-1 an verschiedenen Oberflächen möglich. Der Nachweis der adipogenen Differenzierung und damit einhergehenden Bildung von Fettvesikeln konnte mittels der Färbung mit Oil Red O nach 18 Tagen Kultivierung der Zellen ausschließlich auf den IGF-1-modifizierten Oberflächen Neutraavidin (A), Aminosilan (B) und Epoxysilan (C) gezeigt werden. Auf den korrespondierenden Kontrollen (AA bis CC) wurde keine Fettdifferenzierung detektiert.

3.5.2 Osteogene Differenzierung

Alle nachfolgenden Experimente hinsichtlich der oberflächeninduzierten Differenzierung werden in den Abbildungen durch die Faktorimmobilisierung mittels des Coatingpuffers pH 7,4 der Firma Candor stellvertretend für alle Oberflächen und deren Kopplungsmethoden dargestellt. Die verbleibenden festphaseninduzierten osteogenen Differenzierungen sind im Anhang dargestellt (Anhang: Abbildung 39).

Die Differenzierung der humanen und murinen GSCs über die Oberfläche wurde neben der adipogenen auch in die osteogene Differenzierungsrichtung induziert. Als Induktor wurde hierfür BMP-2 mittels unterschiedlicher Kopplungsmethoden auf den verschiedenen Oberflächen immobilisiert. Die kovalente Kopplung erfolgte auf amino- und epoxysilanisierten Glasoberflächen, wohingegen die zuvor biotinylierten Wachstumsfaktormoleküle auf Neuravidinglasoberflächen aufgetragen wurden. Die Immobilisierung des osteogenen Wachstumsfaktors auf Polystyren wurde mit dem Coatingpuffer pH 7,4 und pH 9,6 der Firma Candor durchgeführt. Das Beschichten des Wachstumsfaktors wurde dabei in Form einer Konzentrationsreihe vorgenommen, bei der BMP-2 in 10, 100 und 1000 ng/ml vorlag. Als Kontrollfläche wurde auf den Oberflächen ein Viertel des Kultivierungsareals frei von dem Faktor belassen (Schema Abbildung 29 links). Nach Auftragen des Wachstumsfaktors, Inkubation über Nacht bei 4°C und anschließenden Waschvorgängen wurden die BMP-2-modifizierten Oberflächen in Zellkulturgefäße überführt, in welche die Zellen im nachfolgenden Schritt ausgesät wurden. Für die Differenzierung mit löslich vorliegendem Faktor wurde der Austausch von Proliferations- gegen Differenzierungsmedium bei Erreichen einer präkonfluenten Zelldichte gestartet. Die Zellzahl für die festphaseninduzierte Differenzierung hingegen wurde im Vergleich zu dieser leicht erhöht, da das Ausplattieren der zu differenzierenden Zellen bereits in Differenzierungsmedium vorgenommen wurde und somit die Differenzierung direkt nach Adhärenz der Zellen auf den faktorbeschichteten Oberflächen startete.

Für die Analyse der oberflächeninduzierten Differenzierung der humanen und murinen GSCs in Osteoblasten wurden die Kulturen nach Ablauf der Inkubationszeit von 21 Tagen mit Formalin fixiert. Der Nachweis der Differenzierung wurde dabei sowohl durch histologische als auch immunzytochemische Analysemethoden, analog zu der Untersuchung der Differenzierung mit gelöstem Faktor (Abbildung 21.1 und

21.2), erbracht. Die Experimente zur Knochendifferenzierung vermittelt durch immobilisierte Wachstumsfaktoren wurden hierfür auf Amino- und Epoxysilan, Neutravidin und Polystyren durchgeführt. Da für alle Oberflächen in Kombination mit den entsprechenden Kopplungsmethoden ähnliche Daten ermittelt wurden, werden die auf Polystyren mittels Candor-Coating-Puffer immobilisierten BMP-2 erreichten Ergebnisse exemplarisch für alle oberflächeninduzierten Osteoblastendifferenzierungen in Abbildung 29 dargestellt. Die Untersuchung der ALP zeigt bei den humanen (Abbildung 29.1 A) und murinen (Abbildung 29.2 A) GSCs eine relativ ähnliche Aktivität für die drei verschiedenen Faktorkonzentrationen. Eine verstärkte Collagen Typ I-Expression entlang der ansteigenden Faktorkonzentration konnte mit der immunzytochemischen Fluoreszenzanalyse ermittelt werden. Dabei war eine Verdichtung des Netzwerks aus Collagen Typ I-Fibrillen von 10 ng/ml in Richtung 1000 ng/ml bei den CEs_{ub}2b (Abbildung 29.1 B) und den MA_{pan}9i (Abbildung 29.2 B) gleichermaßen zu beobachten. Weiterhin wurde durch die Anwendung der histologischen Nachweismethode mit dem von Kossa-Reagenz die Mineralisierung der ECM der differenzierten Zellen gezeigt. Mit steigender Konzentration des gespotteten Wachstumsfaktors BMP-2 verdichteten sich die braun-schwarz angefärbten kalziumhaltigen Strukturen (Abbildung 29.1 und 29.2 C), welche charakteristisch für die Mineralisierung von osteogen differenzierten Zellen sind.

Die Ergebnisse aller drei angeführten Färbemethoden spiegeln deutlich das „Gradienten“-ähnliche Auftragen des osteogenen Wachstumsfaktors wider. Mit aufsteigender BMP-2-Konzentration von 10 zu 1000 ng/ml ist der Vollzug einer verstärkten osteogenen Differenzierung detektierbar. Einige wenige positiv gefärbte Zellen wurden mit Hilfe der drei Analysemethoden bei den humanen SGSCs und murinen PSCs auch auf den Kontrollarealen sichtbar.

In den durchgeführten Experimenten zur oberflächeninduzierten Differenzierung konnte gezeigt werden, dass mit immobilisierten Wachstumsfaktoren die Differenzierung von humanen und murinen Stammzellen induziert wird. Zudem wurde der Effekt einer konzentrationsabhängigen Differenzierungsinduktion durch den osteogenen Wachstumsfaktor überprüft.

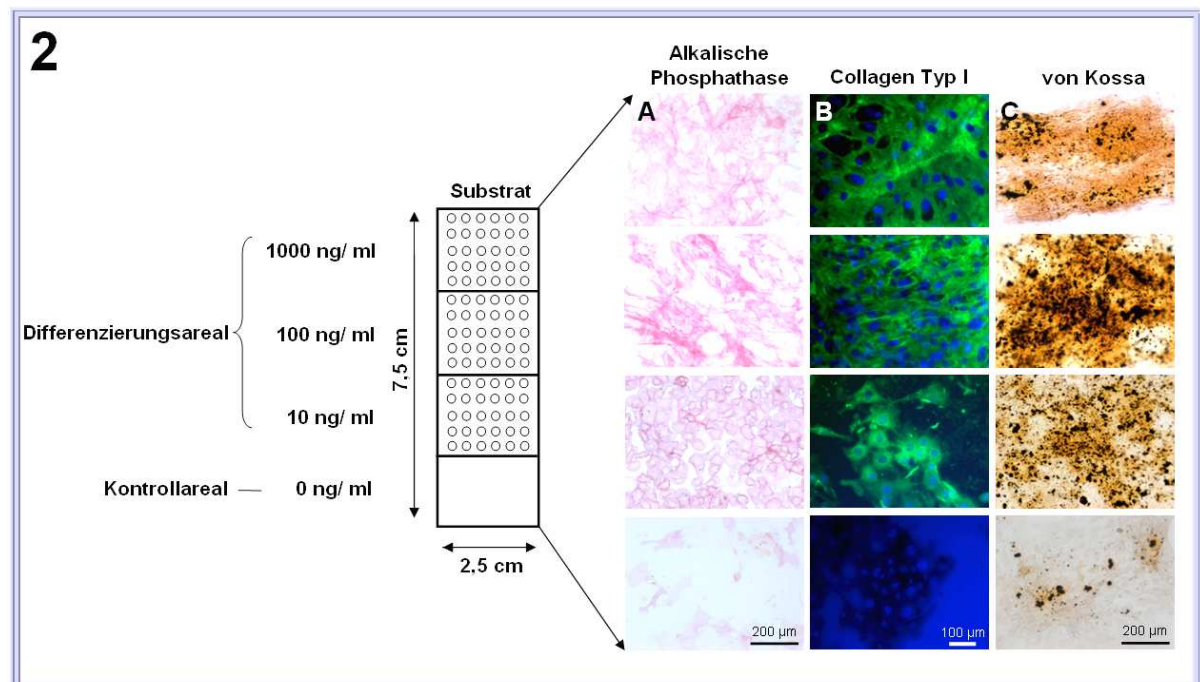
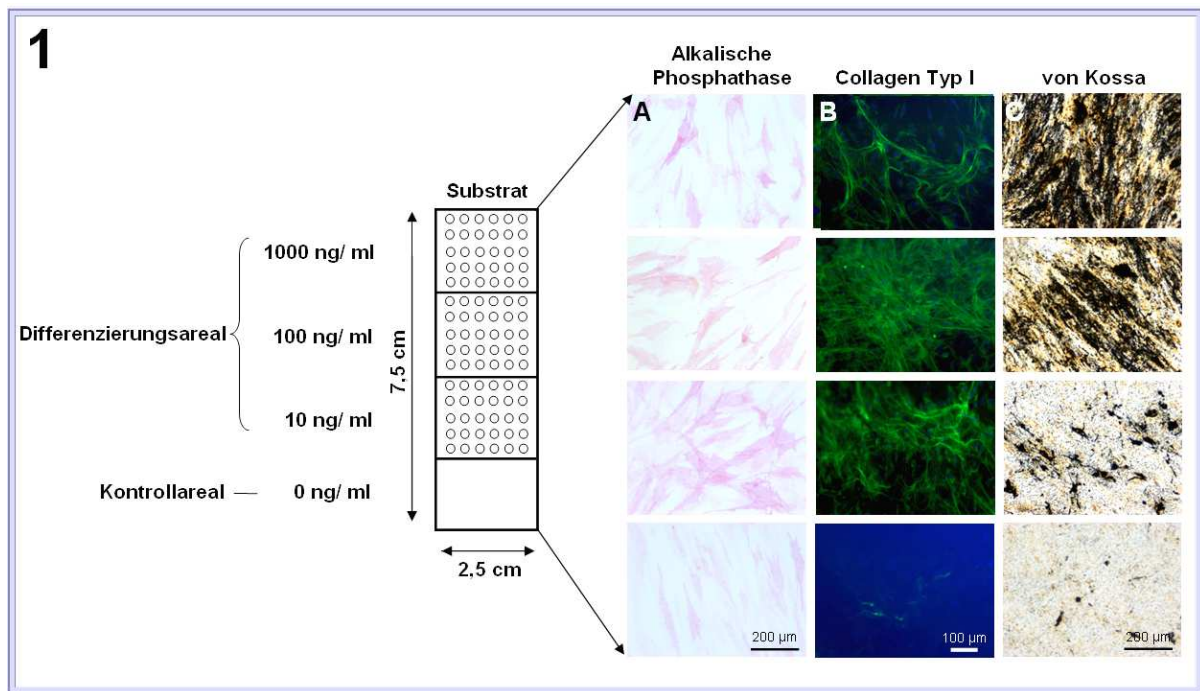


Abbildung 29: Die oberflächeninduzierte osteogene Differenzierung zeigt konzentrationsabhängige Differenzierungserfolge mittels immobilisiertem BMP-2. Die Darstellung zeigt eine Zusammenstellung mikroskopischer Aufnahmen der Differenzierungsergebnisse humaner (1) und muriner (2) GSCs induziert durch gekoppeltes BMP-2 in verschiedenen Konzentrationen (10, 100 und 1000 ng/ml) mittels Candor pH 7,4 an Polystyrenoberflächen. Der Nachweis der differenzierten Osteoblasten wurde durch die Alkalische Phosphatase (A), die Immunfluoreszenzfärbung gegen Collagen Typ I (B) und die von Kossa-Färbung (C) erbracht.

3.5.2.1 Überprüfung der Alkalischen Phosphatase-Aktivität und des Phosphatgehalts während der osteogenen Differenzierung induziert durch lösliche und immobilisierte Wachstumsfaktoren

Zur detaillierteren Untersuchung der osteogenen Differenzierung wurden neben den histologischen und immunzytochemischen Färbetechniken die Entwicklung der ALP-Aktivität und der Phosphatkonzentration in den Zellkulturüberständen im Verlauf der 21-tägigen Differenzierung analysiert. Hierbei wurden die Messwerte der oberflächeninduzierten Differenzierung vergleichend zu der Induktion mit gelöstem Faktor betrachtet. Für die Differenzierung in die osteogene Richtung mittels gelöstem Faktor wurden die humanen und murinen GSCs in ein Standardkulturgefäß eingesät und nach Erreichen einer 80%igen Konfluenz durch Austausch des Proliferationsmediums gegen das Knochendifferenzierungsmedium die Differenzierung induziert. Die Zellen für die festphaseninduzierte Differenzierung auf beschichteten Oberflächen wurden in einer äquivalenten Dichte ausplattiert analog zu den Zellen, die für die Differenzierung mit gelöstem Wachstumsfaktor bestimmt waren. Die Kontrollkulturen wurden in einer separaten Zellkulturschale mit BMP-2-freiem Medium parallel kultiviert. An vier Zeitpunkten der Inkubation wurden Proben aus den Zellkulturüberständen der Differenzierung sowohl mit gelöstem Faktor als auch immobilisiertem Faktor und den Kontrollen entnommen. Diese Überstände wurden nach Abschluss der Inkubationszeit mit spezifischen Assays hinsichtlich der ALP- und Phosphatkonzentration spektralphotometrisch untersucht. Dabei war zu beobachten, dass mittels der oberflächeninduzierten osteogenen Differenzierung die Messwerte für die ALP-Aktivität bei beiden adulten Stammzelllinien deutlich höher ausfielen als für die Differenzierung mit gelöst vorliegendem Wachstumsfaktor. Die Betrachtung der Messdaten für die BMP-2-unbehandelten Kontrollkulturen ergaben keine Detektion der ALP-Aktivität. Der Vergleich der Entwicklung der ALP-Aktivität zwischen den humanen (Abbildung 30.1 links) und murinen (Abbildung 30.1 rechts) GSCs zeigte höhere Messwerte in den Zellkulturüberständen der murinen PSCs.

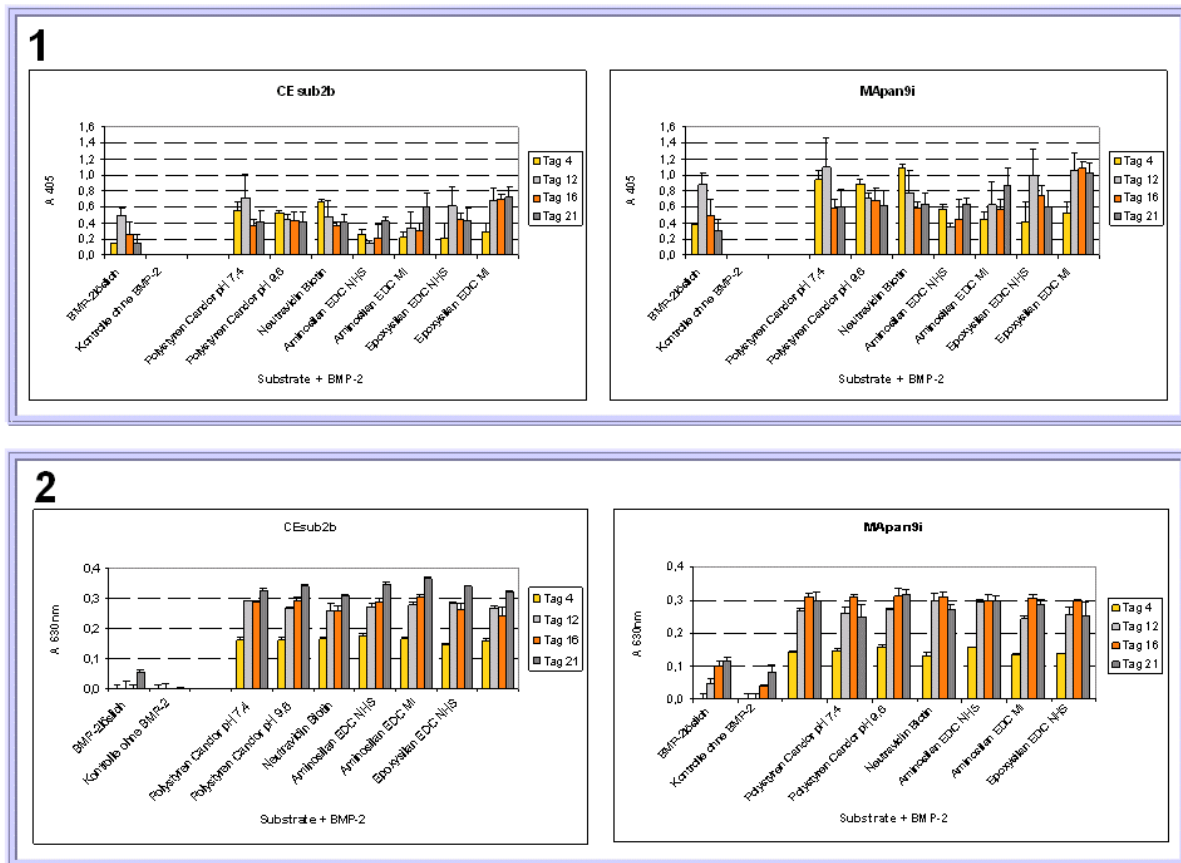


Abbildung 30: Während der osteogenen Differenzierung der humanen und murinen GSCs ist ein Anstieg der Alkalischen Phosphatase-Aktivität (1) und der Phosphatkonzentration (2) vor allem auf Substraten mit gekoppeltem Faktor zu beobachten. Die graphische Darstellung zeigt die Erhöhung der Alkalischen Phosphatase (ALP)-Aktivität und der Phosphatkonzentration in den Kulturüberständen der besiedelten Substrate. Hierbei ist sowohl eine ansteigende ALP-Aktivität und Phosphatkonzentration zu den verschiedenen Zeitpunkten als auch Unterschiede bezüglich der osteogenen Differenzierung mit gelöstem BMP-2 und der oberflächeninduzierten Differenzierung zu beobachten. Als Kontrolle wurden BMP-2 -unbehandelten Zellen mitgeführt. Die Messwerte sind als Mittelwert + SD ($n \geq 3$) dargestellt.

Hinsichtlich der Untersuchung der Phosphatkonzentration während der osteogenen Differenzierung wurden für die Differenzierung mit immobilisiertem Wachstumsfaktor wiederum deutlich höhere Messdaten ermittelt als bei der Knochendifferenzierung mittels gelöstem Faktor. Werden die Messwerte der humanen (Abbildung 30.2 links) und murinen (Abbildung 30.2 rechts) GSCs vergleichend betrachtet, so ergeben sich bezüglich der Phosphatentwicklung während der Differenzierung der Zellen zu Osteoblasten ähnliche Ergebnisse. Lediglich die faktorunbehandelten Proben der Mpan9i ergeben leicht angehobene Phosphatwerte.

Die Ergebnisse der osteogenen Zelldifferenzierung mittels gelöstem und immobilisiertem BMP-2 zeigen einen deutlichen Unterschied anhand der Entwicklung der ALP-Aktivität und der Phosphatkonzentration. Sowohl die Analyse der ALP als auch die Konzentration des Phosphates zeigen eine stärkere osteogene Differenzierung der adulten Stammzellen auf den BMP-2-modifizierten Oberflächen als bei der Differenzierung mittels gelöstem Faktor.

3.5.2.2 Kontrolle der Differenzierungsinduktion durch abgelöste Wachstumsfaktoren

Zur Sicherstellung der ausschließlich oberflächeninduzierten Differenzierung durch den immobilisierten Wachstumsfaktor wurden zusätzliche Kontrollversuche durchgeführt. Dafür wurden wachstumsfaktor-funktionalisierte Oberflächen in einer ersten Wellplatte inkubiert und humane und murine adulte Stammzellen in einer zweiten Zellkulturplatte auf unbehandelten Standardkulturoberflächen ausplattiert. Nach viertägiger Inkubation der modifizierten Oberflächen wurde der Substratüberstand aus der ersten Platte in die korrespondierenden Wells der zweiten Kulturplatte, in der sich die Zellen befanden, überführt (Schema in Abbildung 31 unten). In einem Abstand von vier Tagen wurde der Wechsel des Überstandes vorgenommen, wobei die beschichteten Oberflächen erneut mit Medium überschichtet wurden.

Analog zu den Differenzierungsexperimenten mit gelöstem und immobilisiertem Wachstumsfaktor wurden diese Kontrollversuche über 21 Tage inkubiert und in Abbildung 31 anhand der Immobilisierung des Wachstumsfaktors mittels des Coatingpuffer Candor pH 7,4 exemplarisch für alle durchgeführten Kontrollversuche dargestellt. Als versuchsinterne Kontrollen wurden zum einen wachstumsfaktor-unbehandelte Zellen und zum anderen Kulturen mit Differenzierungsmedium, welches gelöstes BMP-2 enthielt, mitgeführt. Die Ergebnisse dieser Kontrollversuche zur substratübergreifenden Induktion durch Wachstumsfaktorgabe wurden im Anschluss an die 21-tägige Inkubation mit einer ALP-Färbung und einer immunfluoreszenzmikroskopischen Analyse von Collagen Typ I ermittelt. Hierbei wurde für jene Zellen, die im Substratüberstand kultiviert wurden, und den beiden internen Negativkontrollen bei beiden adulten Stammzelllinien eine ungefähr gleiche ALP-Aktivität detektiert. Die immunzytochemische Untersuchung zeigte hingegen

ausschließlich bei den humanen und murinen GSCs unter Einfluss von gelöstem Wachstumsfaktor eine positive Collagen Typ I-Expression.

Somit sind die sich eventuell lösenden Wachstumsfaktormoleküle in ihrer Konzentration nicht ausreichend, um eine Differenzierung zu induzieren und die Zellspezialisierung in Osteoblasten ist auf die immobilisierten Wachstumsfaktoren zurückzuführen.

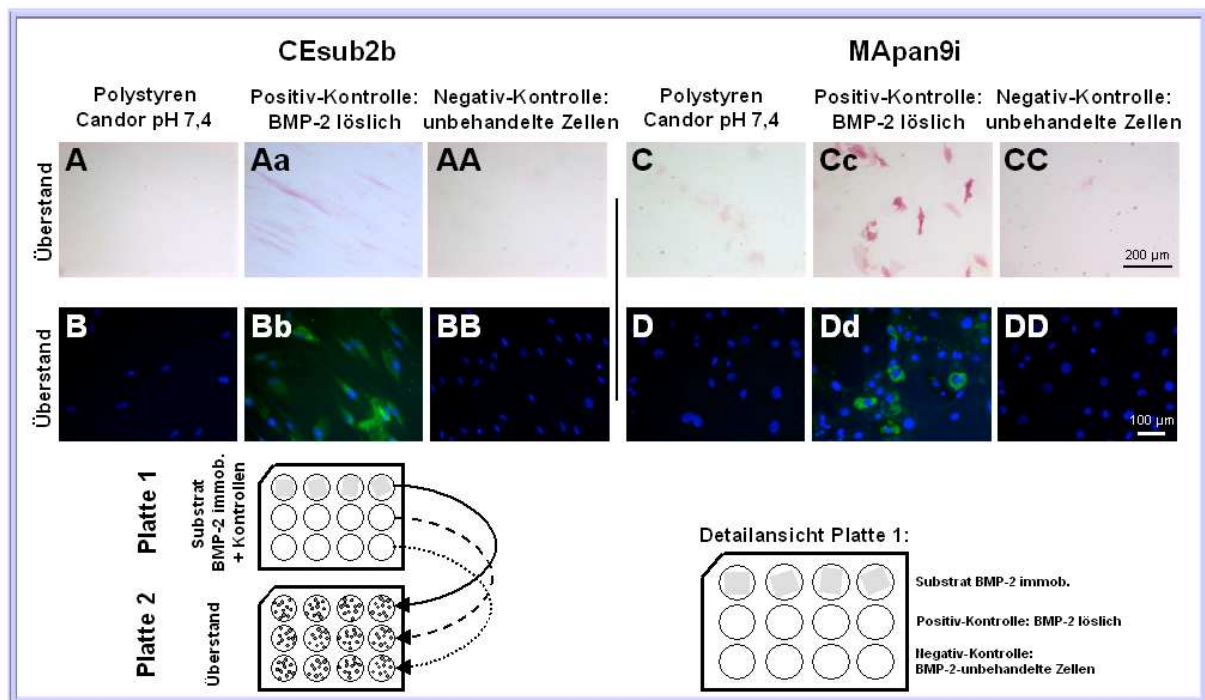


Abbildung 31: Die Induzierung der osteogenen Differenzierung ist durch die Substratüberstände nicht möglich. Die Übersicht zeigt den schematischen Aufbau (unten) eines Kontrollexperimentes zum Überprüfen der Immobilisierungseffektivität des Differenzierungsinduktors. Die Überstände der BMP-2-modifizierten Substrate (BMP-2 mittels Candor pH7,4 auf Polystyren, exemplarisch für alle getesteten Oberflächen) wurden alle vier Tage zu Zellen auf Standardkulturoberflächen überführt. Der Differenzierungsnachweis wurde durch Anfärben der ALP und des Collagen Typ I geführt. Als Kontrollen dienten sowohl in Gegenwart von gelösten BMP-2 kultivierte Zellen als auch wachstumsfaktorunbehandelte Zellen.

Die Untersuchungen der verbleibenden Oberflächen hinsichtlich der Kontrolle der Differenzierungsinduktion durch eventuell abgelöste Faktoren sind im Anhang in der Abbildung 40 dargestellt.

3.5.2.3 Konditionierung des Medium durch Zellaktivität

Differenzierende Zellen brauchen neben den Differenzierungsinduktoren auch den Kontakt zu Nachbarzellen. Ist die Differenzierung in eine bestimmte Richtung gestartet, sezernieren die sich entwickelnden Zellen selbst auch Proteine und Zytokine und geben diese in ihre Umgebung ab. Durch diese Konditionierung des Mediums werden die Zellen in der Nachbarschaft zusätzlich zu den Differenzierungsinduktoren angetriggert und die Entwicklung der Zellen in einen bestimmten Zelltyp wird verstärkt.

Während der osteogenen oberflächenvermittelten Differenzierung konnten sowohl bei den humanen als auch bei den murinen GSCs auf den Kontrollarealen eine geringe Differenzierung mittels der Analyse bezüglich ALP-Aktivität, Collagen Typ I-Expression und Kalzifizierung durch eine von Kossa-Färbung beobachtet werden (Abbildung 29). In zwei Versuchsaufbauten wurde aus diesem Grund die Differenzierungseffizienz durch Konditionierung des Medium durch die Zellen selbst untersucht. Für den ersten Aufbau wurde ein Transwellsystem genutzt. Dieses gliedert sich in ein unteres und ein oberes Kompartiment (Schema in Abbildung 32 unten) auf. Mit Wachstumsfaktoren modifizierte Oberflächen wurden im unteren Kompartiment des Systems platziert. Nach abgeschlossener Vorbereitung der Oberflächen für die Zellkultur wurden humane und murine GSCs jeweils in getrennten Ansätzen sowohl im unteren Transwellteil auf den mit Faktoren funktionalisierten Oberflächen als auch auf der porösen Membran des oberen Kompartiments des Transwells ausplattiert. Die Poren der Membran garantieren die Verbindung der Zellen beider Kompartimenten über das gemeinsame Medium. Als Kontrollen wurden ebenfalls in einem Transwellaufbau zum einen Kulturen, die unter Einfluss von löslichem BMP-2 differenzieren sollen, und zum anderen BMP-2-unbehandelte Kulturen parallel kultiviert. Sollten die Zellen, die während der Differenzierung im unteren Kompartiment mit dem osteogenen Wachstumsfaktor in Berührung kommen, selbst Proteine und Zytokine sezernieren, gelangen diese durch das verbindende Medium auch zu den Zellen im oberen Transwellteil. Nach dem Differenzierungszeitraum von 21 Tagen, der in dieser Arbeit durchgängig für die osteogene Differenzierung gewählt wurde, wurden die Zellen beider Transwellkompartimente der Analyse hinsichtlich ALP-Aktivität und der Expression von Collagen Typ I zugeführt. Mittels dieser Methode konnte die oberflächeninduzierte Differenzierung der humanen und murinen GSCs im unteren und oberen

Kompartiment anhand der Aktivität der ALP (Abbildung 32: human: A, B; murin: E, F) und der Collagen Typ I-Expression (Abbildung 32: human: C, D; murin: G, H) gezeigt werden. Die Zellen auf den BMP-2-modifizierten Oberflächen im unteren Teil des Transwell weisen dabei nur einen geringfügigen Differenzierungsvorsprung auf. In den Transwells der entsprechenden Kontrollen mit löslichem Wachstumsfaktor konnten in beiden Kompartimenten ALP- (Abbildung 32: human: Aa, Bb; murin: Ee, Ff) und Collagen Typ-I-positive (Abbildung 32: human: Cc, Dd; murin: Gg, Hh) Zellen detektiert werden. Hingegen in der BMP-2-unbehandelten Kontrolle wurde keine Reaktion bezüglich Färbung gegen ALP (Abbildung 32: human: AA, BB; murin: EE, FF) und Collagen Typ I-Fibrillen (Abbildung 32: human: CC, DD; murin: GG, HH) ermittelt.

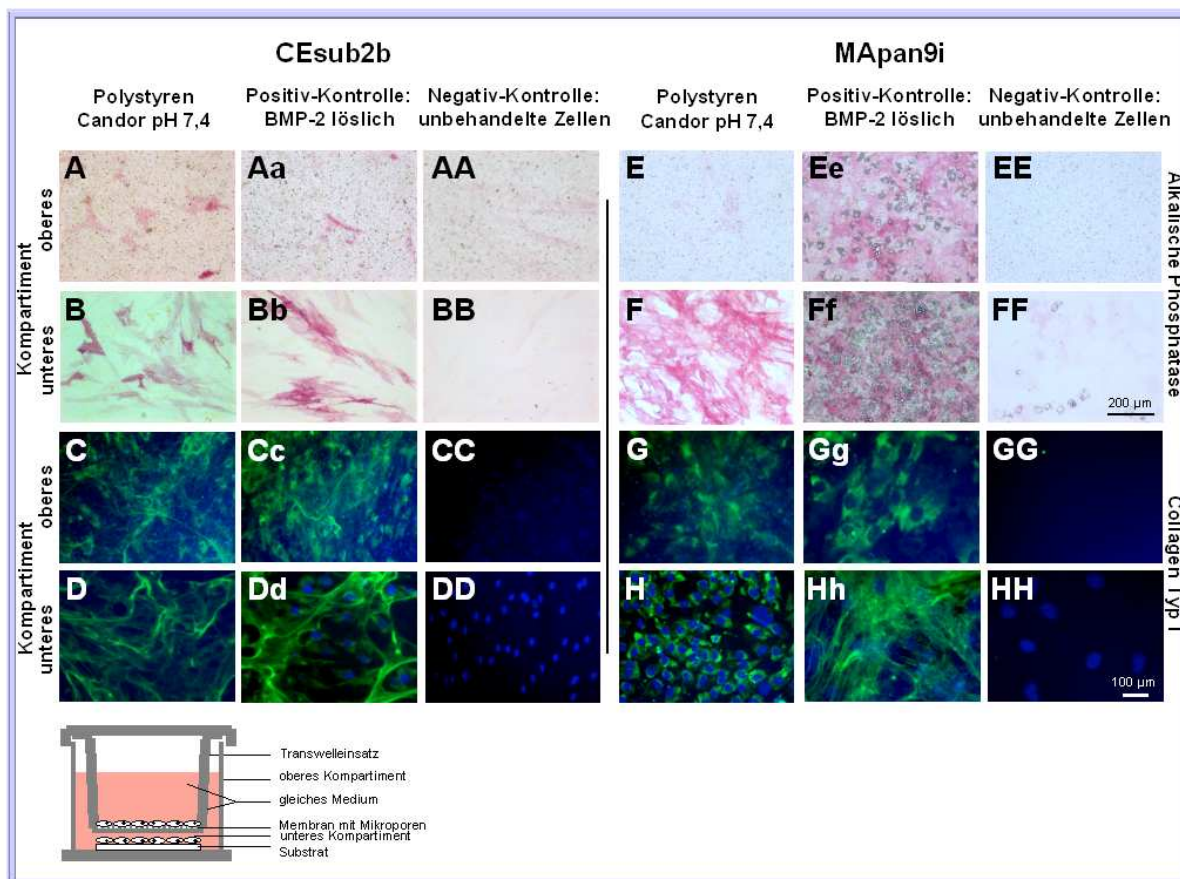


Abbildung 32: Positive Ergebnisse der osteogenen Differenzierung können auch durch konditioniertes Medium erreicht werden. Die Übersicht zeigt den schematischen Aufbau eines Transwellensystem (unten), in dem sich im unteren Kompartiment Zellen auf faktormodifizierten Substraten (BMP-2 mittels Candor pH 7,4 auf Polystyren, exemplarisch für alle getesteten Oberflächen) und Zellen im oberen Kompartiment auf einer porösen Membran lagen. Die Zellen beider Transwelleinheiten standen über das Medium miteinander in Verbindung. Das Überprüfen der Differenzierung erfolgte durch das Anfärben der ALP und des Collagen Typ I. Sowohl die Kultivierung der Zellen mit gelöstem BMP-2, als auch wachstumsfaktorunbehandelte Zellen dienten als Kontrollen.

Eine weitere Möglichkeit die Konditionierung des Mediums durch die Aktivität der Zellen nachzuweisen, ist das Überführen der Zellkulturüberstände von einer Kulturplatte mit Zellen auf faktormodifizierten Oberflächen zu einer korrespondierenden Platte, in der die Zellen auf Standardoberflächen kultiviert vorliegen. Ein analoger Aufbau wurde unter 3.5.2.2 bereits beschrieben. Die Differenzierung in der ersten Kulturplatte wurde durch Aussäen der Zellen direkt im osteogenen Differenzierungsmedium induziert. Da in einem Intervall von vier Tagen jeweils ein Mediumwechsel vorgenommen wurde, startete der Kontrollversuch der Zellen in der zweiten Platte vier Tage nach der ersten Wellplatte mit dem ersten Medienüberführen. Dabei wurde das Medium aus der ersten Platte, in der sich die humanen und murinen GSCs auf faktorbeschichteten Oberflächen befanden, in die korrespondierenden Wells der zweiten Kulturplatte überführt (Schema in Abbildung 33 unten). Die Zellen der ersten Platte wurden wiederum mit frischem Differenzierungsmedium ohne Faktor versorgt. Als versuchsinterne Kontrollen wurden ebenfalls in diesem Aufbau zum einen Kulturen, die unter Einfluss von löslichem BMP-2 differenzieren sollen, und zum anderen BMP-2-unbehandelte Kulturen parallel kultiviert. Im Anschluss an die Fixierung der Zellen nach 21-tägiger Inkubation wurde der Einfluss von konditioniertem Medium auf die Differenzierung zusätzlich zur Analyse der ALP-Aktivität und Collagen Typ I-Expression auch hinsichtlich der Mineralisierung der ECM mittels der von Kossa-Färbung untersucht. Die Aktivität der ALP der osteogen differenzierten Zellen war auf den faktormodifizierten Oberflächen (Abbildung 33: human: A, B; murin: G, H) im Vergleich zu den Kontrollkulturen mit gelöstem Faktor (Abbildung 33: human: Aa, Bb; murin: Gg, Hh) auf beiden Platten ungefähr gleich stark. Eine stärkere Expression des Collagen Typ I sowohl der humanen als auch der murinen GSCs wurde hingegen auf den Oberflächen mit immobilisiertem Faktor (Abbildung 33: human: D; murin: J) ermittelt als bei den Zellen, die unter Einfluss des Zellkulturüberstandes der Zellen der ersten Platte standen (Abbildung 33: human: C; murin: I). Die Überprüfung der osteogenen Differenzierung durch die Anwendung der von Kossa-Färbung zeigte die Mineralisierung der ECM durch Einlagerung von Phosphat und Kalzium. Hierbei wurden in der zweiten Platte deutlich stärker braun-schwarz angefärbte Strukturen detektiert (Abbildung 33: human: F, murin: L). In der ECM der Zellen auf faktorfunktionalisierten Oberflächen wurde weniger bzw. kein eingelagertes Phosphat

und Kalzium visualisiert (Abbildung 33: human: E, murin: K). Die osteogen differenzierenden Zellen produzieren selbst Phosphat und Kalzium, die sie anschließend in die ECM einlagern. Da der Zellkulturüberstand jedoch in viertägigen Intervallen durch frisches Differenzierungsmedium ersetzt wurde, standen diese anorganischen Bestandteile nicht zur Einlagerung zur Verfügung. Da der Überstand, und somit auch das in ihm enthaltene Phosphat und Kalzium, zu den Zellen auf der zweiten Zellkulturplatte überführt wurde, konnte diese die anorganischen Bestandteile in ihre ECM einbauen.

Die wachstumsfaktorunbehandelten Kontrollzellen lieferten sowohl auf der ersten als auch auf der zweiten Zellkulturplatte keine positiven Färbeergebnisse bezüglich der Coallgen Typ I –Expression und der Analyse mit von Kossa. Lediglich eine schwache ALP-Aktivität konnte für beide adulten Stammzelllinien in der einen sowie in der anderen Platte festgestellt werden.

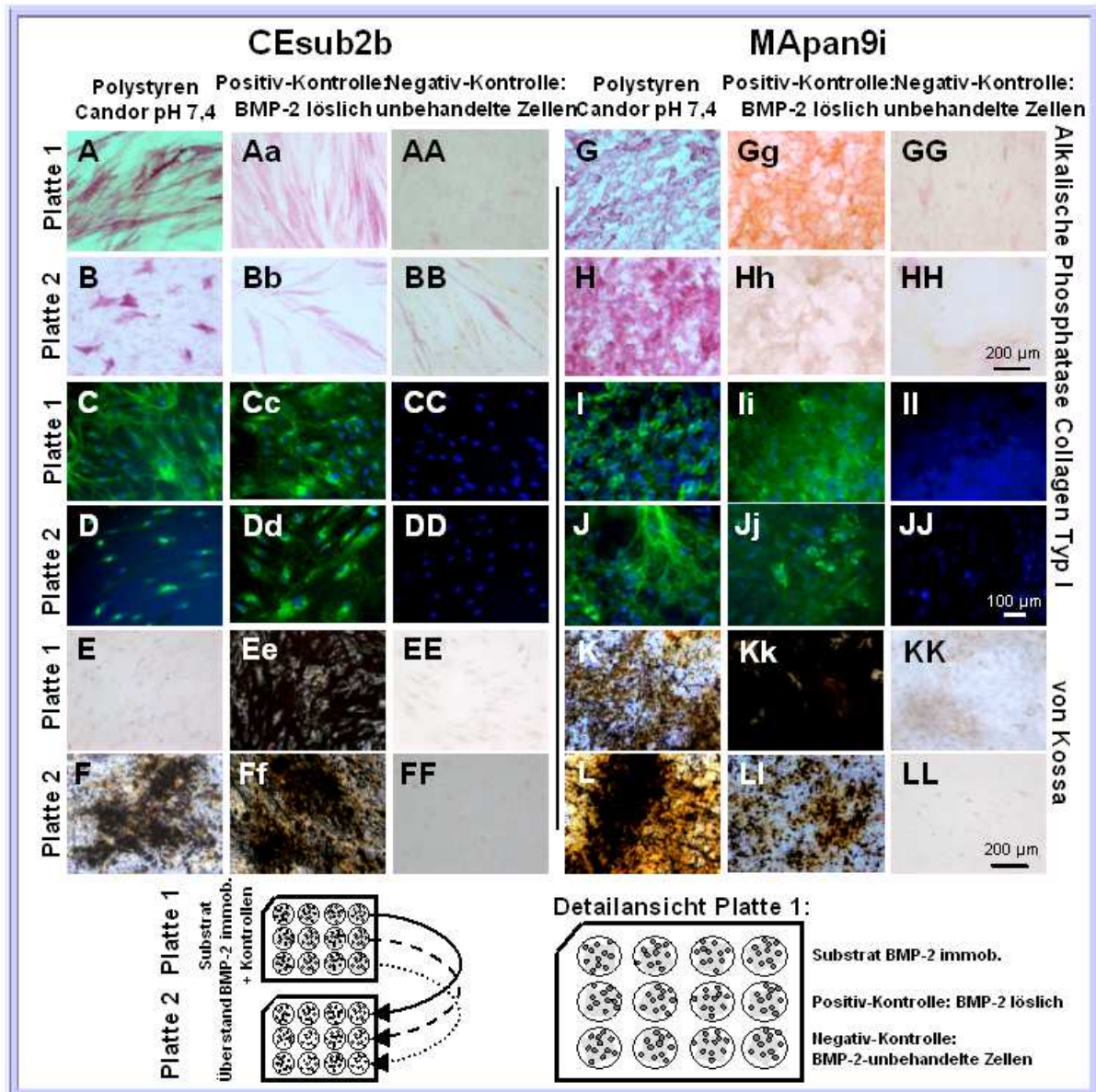


Abbildung 33: Durch Zellaktivität konditioniertes Medium beeinflusst die osteogene Differenzierung positiv. Die Zusammenstellung zeigt den schematischen Ablauf des durchgeführten Experimentes (unten) zur Analyse des Einflusses von konditioniertem Medium auf den osteogenen Differenzierungserfolg. Die Kulturüberstände der Zellen auf BMP-2-modifizierten Substraten (mittels Candor pH 7,4 auf Polystyren, exemplarisch für alle getesteten Oberflächen) wurden alle vier Tage zu Zellen auf Standardkulturoberflächen überführt. Der Nachweis der Differenzierung wurde mittels Färbung der ALP und des Collagen Typ I analysiert. Als Kontrolle wurden sowohl in Gegenwart von gelösten BMP-2 kultivierte Zellen als auch wachstumsfaktorunbehandelte Zellen herangezogen.

Zur Überprüfung der Faktorstabilität wurde ein analoger experimenteller Aufbau vorgenommen und bereits unter 3.5.2.2 erläutert. Hierbei wurden in der ersten Platte biofunktionalisierte Oberflächen ohne Zellbewuchs positioniert. Im Zuge der Medien-

wechsel wurden die Substratüberstände in die korrespondierende zweite Platte überführt. Im Anschluss an den Differenzierungszeitraum von 21 Tagen wurden die Zellen der zweiten Platte mittels des ALP-Nachweisreagenzes und der immunzytochemischen Färbung gegen Collagen Typ I hinsichtlich der osteogenen Differenzierung untersucht. Es konnten dabei keine osteogen differenzierten Zellen in den Wells detektiert werden, in welche die Substratüberstände der ersten Platte transferiert wurden. Ausschließlich in der Positivkontrolle konnten Zellen bezüglich der beiden Nachweismethoden beobachtet werden. Die wachstumsfaktor-unbehandelten Zellen, welche als Negativkontrolle dienten, zeigten ebenfalls keine positive Anfärbung der Zellen hinsichtlich der histologischen und immunzytochemischen Analysen.

Weitere Untersuchungen zur Überprüfung der Medienkonditionierung durch die differenzierende Zellen auf den ebenfalls analysierten Oberflächen sind im Anhang abgebildet (Anhang: Abbildung 40, Abbildung 42 und Abbildung 43).

3.6 Kultivierung und Differenzierung humaner Vorläuferzellen sowie humaner und muriner adulter Stammzellen in einem miniaturisierten Kultursystem

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es die oberflächenunterstützte Differenzierung von Zellen von der Standardgröße im Zellkulturlabor auf den großtechnischen Maßstab und somit auf ein Miniatursystem zu übertragen. Dazu wurden die humanen und murinen adulten Stammzellen auf Zellcarriern kultiviert. Diese Carrier sind aus 1 mm x 2 mm großen, 170 µm dünnen Glasplättchen aufgebaut (Abbildung 34.2 rechts), sie sind sowohl technologisch über entsprechende Magnet- und Gleitschichten als auch durch verschiedene immobilisierte Wachstumsfaktoren biologisch funktionalisiert.

Die Umsetzung der Zelldifferenzierung erfolgte mit drei Differenzierungssystemen: Differenzierung von humanen Monozyten in Makrophagen (Abbildung 34.1), Differenzierung der humanen SGSCs in Adipozyten (Abbildung 34.2) als auch die osteogene Differenzierung von humanen sowie murinen GSCs (Abbildung 35).

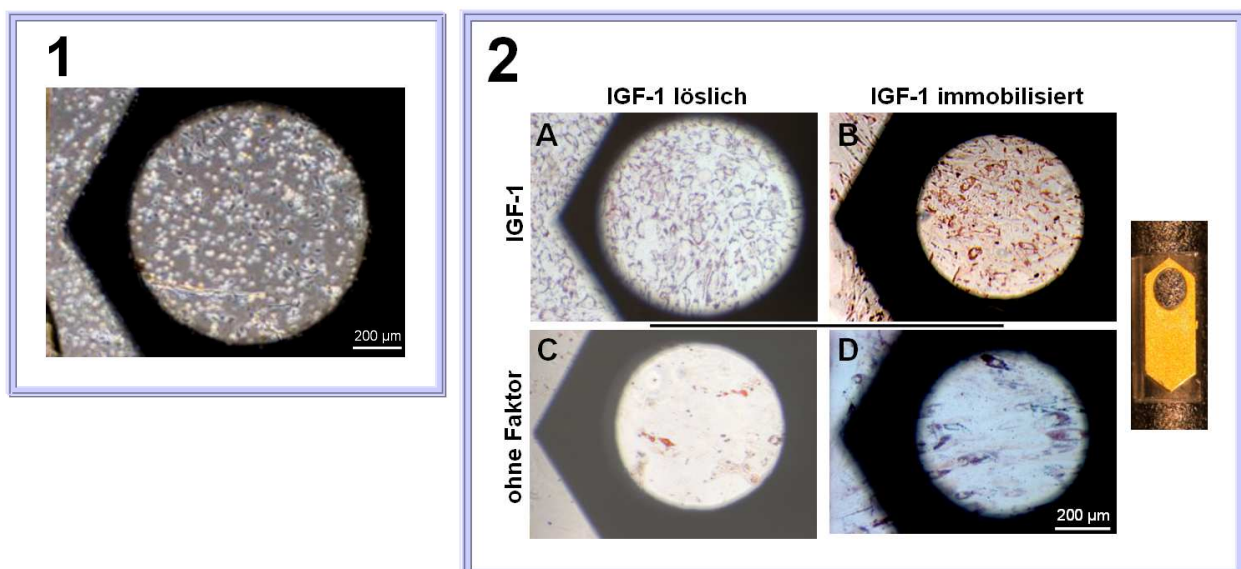


Abbildung 34: Die Differenzierung von Makrophagen mit gekoppeltem M-CSF (1) und die IGF-1-induzierte adipogene Differenzierung der humanen GSCs (2) konnte erfolgreich von der Standardzellkulturgröße auf ein miniaturisiertes Carriersystem übertragen werden.

Für die oberflächeninduzierte Differenzierung der primären humanen Monozyten wurde auf der zuvor aminosilanisierten Glasoberfläche des Zellcarriers M-CSF adsorptiv gekoppelt. Bereits am ersten Tag nach Zellaussaat konnten anhand der für „M-CSF-Makrophagen“ typischen spindelförmigen Morphologie erfolgreich differenzierte Makrophagen beobachtet werden (Abbildung 34.1).

Für die adipogene Differenzierung der humanen SGSCs auf dem Carriersystem mittels gelöstem Wachstumsfaktor wurde IGF-1 dem Differenzierungsmedium zugesetzt. Im Vergleich zu der IGF-1-unbehandelten Kontrolle (Abbildung 34.2 C) konnte eine deutlich stärkere Adipozytendifferenzierung der CEs_{sub}2b (Abbildung 34.2 A) im Verlauf von 18 Tagen durch das Anfärben der Fettvesikel durch Oil Red O ermittelt werden. In der Kontrollkultur der humanen SGSCs konnten nur wenige Zellen beobachtet werden, in denen sich das Oil Red O gelöst hat (Abbildung 34.2 C). In Vorbereitung auf die festphasenunterstützte Adipozytenentwicklung wurde die Glasoberfläche der Zellcarrier mit Aminosilan beschichtet, um anschließend den adipogenen Differenzierungsfaktor IGF-1 kovalent über die EDC-Methylimidazol-Kopplungsmethode zu immobilisieren. Auf die so funktionalisierten Carrier wurden im nächsten Schritt Zellen ausplattiert. In den nachfolgenden Differenzierungsexperimenten konnte für die humanen adulten Stammzellen gezeigt werden, dass auf funktionalisierten Carriern eine Differenzierung von humanen adulten Stammzellen in Adipozyten induziert werden kann (Abbildung 34.2 B). Für die korrespondierende Kontrolle wurde wiederum nur einzelne positiv angefärbte Zellen detektiert (Abbildung 34.2 D). Der Nachweis der Fetttröpfchen, die mit einer erfolgreichen Adipozytendifferenzierung einhergehen, wurden analog zur Differenzierung mit löslich vorliegendem IGF-1 mit dem lipophilen Farbstoff Oil Red O erbracht.

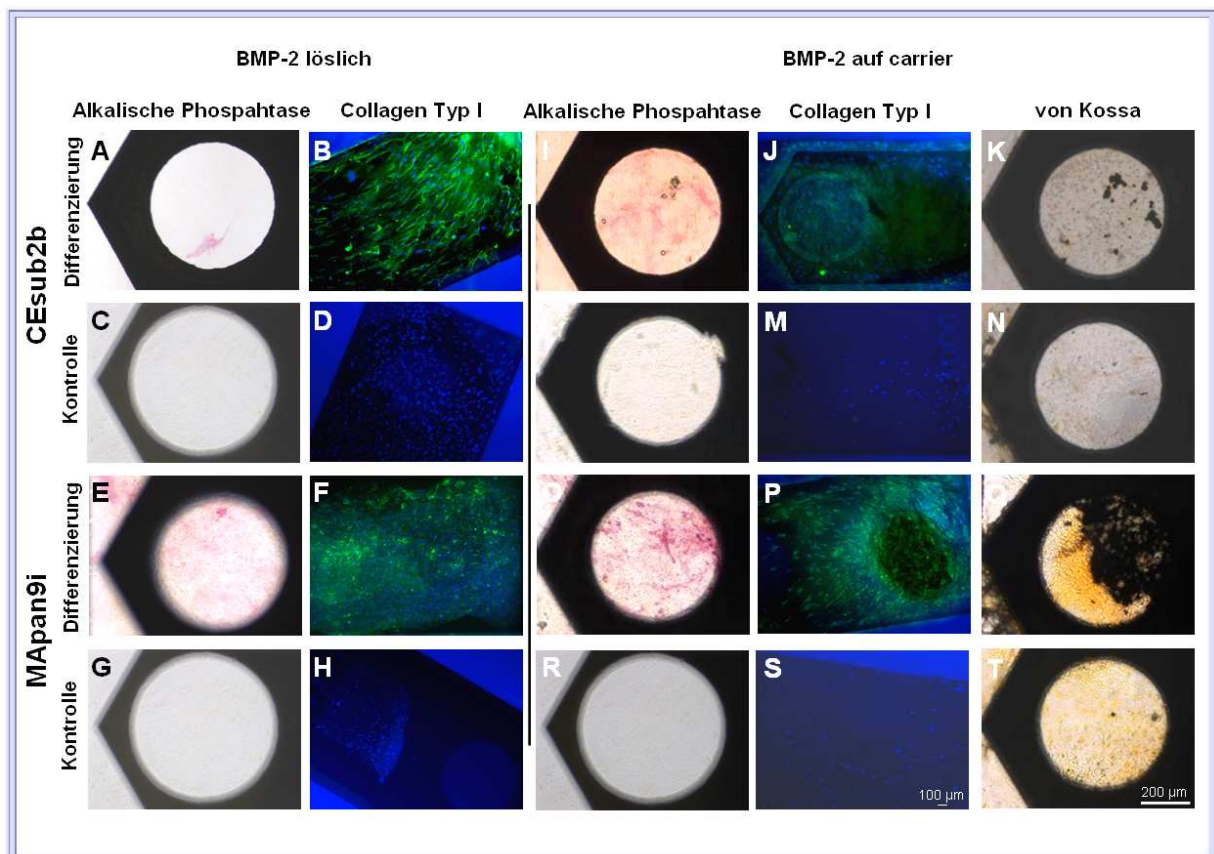


Abbildung 35: Die osteogene Differenzierung kann erfolgreich im Carriersystem mittels gelöster und immobilisierter Faktoren induziert werden.

Die oberflächenvermittelte Differenzierung der adulten Stammzellen auf dem Carriersystem wurde neben der adipogenen Differenzierung ebenfalls für die osteogene Zelldifferenzierung getestet. Auch für diese Entwicklungsrichtung wurde die Differenzierung zum einen mit dem gelöst vorliegendem Wachstumsfaktor und zum anderen für die Differenzierungsinduktion durch den gekoppelten osteogenen Faktor vorangetrieben. Die kovalente Faktorimmobilisierung an die amonisilanisierte Glasoberfläche der Zellcarrier erfolgte dabei über die EDC-Kopplungsmethode. Mittels histologischer und immunzytochemischer Analysemethoden wurde nach 21-tägiger Inkubationszeit der Differenzierungserfolg beider GSC-Kulturen durch gelöste und immobilisierte osteogene Wachstumsfaktoren untersucht. Die Testung der ALP-Aktivität der humanen und murinen GSCs zeigte sowohl bei der Differenzierung mittels gelöstem (Abbildung 35: human: A, murin: E) als auch gekoppeltem BMP-2 (Abbildung 35: human: I, murin: O) eine positive osteogene Differenzierung im Vergleich zu den BMP-2-unbehandelten Kontrollen (Abbildung 35: human: C, L;

murin: G, R). Mit der Immunfluoreszenzmikroskopie konnten Collagen Typ I-Fibrillen ausschließlich in den mit gelöstem BMP-2-behandelten Kulturen (Abbildung 35: human: B, murin: F) als auch bei Zellen auf den faktorbehandelten Oberflächen (Abbildung 35: human: J, murin: P) detektiert werden. Die von BMP-2-unbeeinflussten Kontrollen zeigten keine Expression des Collagen Typ I (Abbildung 35: human: D, M; murin: H, S). Zusätzlich zur Untersuchung der Zelldifferenzierung zu Osteoblasten wurden die auf BMP-2-funktionalisierten Oberflächen differenzierten Zellen neben der ALP- Aktivität und der Collagen Typ I-Expression mit der von Kossa-Färbung auf Mineralisierung untersucht. Hierbei zeigte sich anhand der braun-schwarz gefärbten Strukturen deutlich die Einlagerung von Phosphat und Kalzium, welche einen starken Hinweis auf eine erfolgreiche Knochendifferenzierung darstellt. Der Mineralisierungsnachweis der humanen (Abbildung 35 K) und murinen (Abbildung 35 Q) GSCs wurde an dieser Stelle für die festphaseninduzierte Differenzierung durchgeführt und zeigte einen deutlichen Unterschied zu den parallel kultivierten Kontrollen (Abbildung 35: human: N, murin: T).

Die Ergebnisse der Experimente zur Übertragung der Differenzierung von primären humanen Vorläuferzellen und sowohl humanen als auch murinen GSCs mittels gelöstem und immobilisiertem Wachstumsfaktor von der Standardkulturgröße auf ein miniaturisiertes Kultursystem konnten erfolgreich abgeschlossen werden.

3.7 Kultivierung und Differenzierung der Makrophagen und GSCs auf nanostrukturierten Oberflächen

Zusätzlich zur Untersuchung der Beeinflussung der Zellkultivierung und Zelldifferenzierung wurden Experimente mit humanen GSCs auf strukturierten Oberflächen durchgeführt.

In Abbildung 36 A bis E wurden CEs_{ub}2b auf Strukturen kultiviert. Deutlich konnte die Ausrichtung der einzelnen Zellen parallel entlang der Strukturen beobachtet werden. Zudem lieferten rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (mit Unterstützung von Frau Dr. rer. Nat. Alisa Katsen-Globa durchgeführt, Abbildung 36 A und B) Hinweise darauf, dass sich die Zellen nicht allein an der Strukturrichtung orientieren, sondern eine Interaktion mit den Strukturen eingehen, in dem sie in die Strukturen hineinzugreifen scheinen.

Neben der Zellkultivierung konnte in weiteren Experimenten auch die erfolgreiche Differenzierung der humanen Stammzellen in Fett- (Abbildung 36 C) und Knochenzellen (Abbildung 36 D, E) auf strukturierten Oberflächen gezeigt werden. Hierfür wurde der Wachstumsfaktor der adipogenen und osteogenen Differenzierungsrichtung dem Medium zugesetzt und die Zellen zusätzlich zu der Differenzierung auf strukturierten Oberflächen auch auf unstrukturierten Kontrollarealen differenziert (Abbildung 36: adipogen: CC, osteogen: DD, EE). Es konnte bei der Differenzierung in Adipozyten und Osteoblasten kein Unterschied bezüglich strukturierter und unstrukturierter Oberflächen beobachtet werden. Sowohl auf den parallel angeordneten Strukturen als auch auf den unstrukturierten Kultivierungsarealen wurde die Differenzierung gleichermaßen detektiert. Lediglich eine Orientierung anhand der Strukturen konnte auch für die differenzierten Zellen beobachtet werden.

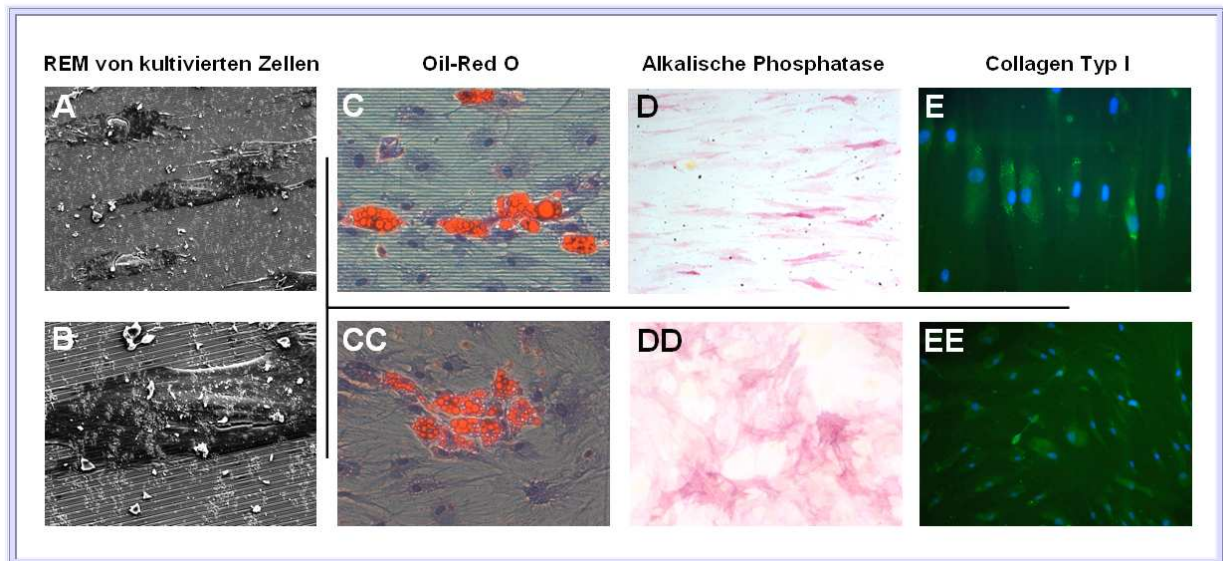


Abbildung 36: Die adulten Stammzellen interagieren während der Kultivierung mit den nanostrukturierten Oberflächen (200 nm). Während der Zellkultivierung (A, B) sowohl im Rahmen der adipogenen (C) als auch der osteogenen (D, E) Differenzierung mit gelösten Faktoren ist das Ausrichten der humanen GSCs entlang der linienförmigen Strukturen zu beobachten. Die korrespondierenden Kontrollen (CC, DD, EE) veranschaulichen das Ausbreiten der Zellen auf unstrukturierten Arealen.

4 Diskussion

Medizinische Zellersatzstrategien haben die Regenerative Medizin in der letzten Zeit weit voran gebracht. Dennoch stellt die erfolgreiche Anwendung dieser Techniken für viele komplexe Gewebe auch weiterhin eine wissenschaftliche Herausforderung dar. Dies gilt nicht nur für die neurodegenerativen Erkrankungen des Nervensystems, sondern auch für den Ersatz von Geweben bei Verletzung und Verlust von Knochen, Knorpel sowie Organen wie Haut, Herz oder Leber. So konnten erste klinische Resultate bei der Behebung von Knorpelschäden an der Kniescheibe erreicht werden [Andereya et al., 2007]. Der im gleichen Zusammenhang stehenden Bandscheibenregeneration werden gute Aussichten zugesprochen, jedoch liegen hier momentan nur präklinische Studien und diese auch nur im Tiermodell vor [Paesold et al., 2007; Revell et al., 2007; Leung et al., 2006]. Weiterhin wird an der Kombination von Hautzellen mit verschiedenen Biomaterialien zum Unterhautersatz gearbeitet. Die daraus entstehenden Transplantate werden so bereits bei großflächigen Verbrennungen zum Wundverschluss genutzt [Kim et al., 2007; Nie et al., 2007]. Die Anwendung und die Resultate von Tissue Engineering-Ansätzen mit klinischem Potential im Bereich des Herzens werden kritisch diskutiert. So ist die Zelltransplantation zur Regeneration ischämischen Myokards limitiert durch mangelnde Langlebigkeit der Transplantate sowie niedrige Zellretention, der anhaltende Verbleib der transplantierten Zellen am Ort der Läsion [Chagues et al., 2007]. Der Einsatz von Herzklappen mit autologen Zellen zur Behebung angeborener Herzfehler wird für den Pulmonalklappenersatz hingegen bereits erfolgreich eingesetzt [Cebotari et al., 2006].

Die Arbeiten auf dem Gebiet der Stammzellbiologie eröffnen Möglichkeiten des langfristigen Angehens einer erfolgreichen Behandlung vieler dieser Erkrankungen. Aus aktueller Sicht ist das Tissue Engineering und die anschließende Transplantation eine der erfolgversprechensten Perspektiven für die Reparatur zellulärer Defekte in Geweben und Organen. Die enorme Komplexität des molekularen Aufbaus von Geweben ist für jeden denkbaren zelltherapeutischen Ansatz eine große Herausforderung und Ansporn. Durch die Vielzahl der Zelltypen, deren vielfältigen Interaktionen und die Fülle an Signalen aus dem umgebenden zellulären Milieu lassen sich Gewebeverbände oder bereits ausdifferenzierte Zellen oft nicht direkt in

die geschädigte Architektur transplantieren. Aus diesem Grund müssen Stammzellen und andere Vorläuferzellen durch gezielte Andifferenzierung auf die Integration im Gewebe bei Regenerationsbedarf vorbereitet werden. Um dem enormen Bedarf an regenerativem Material gerecht werden zu können, muss eine hohe Anzahl an kultivierten und differenzierten Zellen bereitgestellt werden. Individuelle Variationen in der Zellkulturtechnik können jedoch Einfluss auf Proliferation, Potenz und Differenzierung von Stammzellen haben. So kann allein schon das Volumen des Kulturmediums oder die Vorgehensweise beim Applizieren des Medium beim Medienwechsel Auswirkungen auf den Differenzierungserfolg haben. Insbesondere in komplexen, mehrstufigen Differenzierungsprotokollen werden solche Variationen deutlich. Eine zuverlässige Standardisierung in der Kultivierung und Differenzierung von Stammzellen kann durch eine Automatisierung der Prozesse und auch durch eine Immobilisierung der differenzierungsinduzierenden Faktoren erreicht werden. Die Immobilisierung von Wachstumsfaktoren und anderen Signalgebern bietet den Vorteil der parallelen Differenzierung von Zellen unter identischen Voraussetzungen und Kulturbedingungen, die in ähnlicher Medienzusammensetzung kultiviert werden. Zudem kann durch die Kopplung von Signalfaktoren die natürliche, zelluläre Mikroumgebung von Stammzellen nachgebildet werden. Insbesondere das Auftragen der zu immobilisierenden Wachstumsfaktoren in Gradientenform bietet die Möglichkeit die physiologische Umgebung von Stammzellen nachzubilden. Viele Entwicklungsprozesse während der Embryogenese werden über Konzentrationsgradienten und die aufeinander folgende Expression verschiedener Gengruppen gesteuert. Zahlreiche Untersuchungen konnten zeigen, dass die kontrollierte Entwicklung von Stammzellen wesentlich von ihrer Mikroumgebung beeinflusst wird [Berger et al., 2008; da Silva Meirelles et al., 2008; Quesenberry und Aliotta, 2008]. So befinden sich Stammzellen in einem spezifisch definierten Milieu aus verschiedenen Zelltypen und Proteinen bzw. Signalfaktoren. Diese Mikroumgebung wird auch als Nische bezeichnet. Das Milieu innerhalb dieser Nische sorgt durch das Verhindern der Differenzierung für den Erhalt des Stammzellreservoirs, so dass die charakteristischen Eigenschaften der Stammzellen bestehen bleiben. Jene Zellen, deren Aufgabe u. a. das Auskleiden der jeweiligen Nische ist, regen im Gegenzug aber auch nach entsprechenden exogenen Reizen die Differenzierung der Stammzellen an [Scadden, 2006]. Das artifizielle Nachbilden von Stammzellnischen über die Immobilisierung von Faktoren beispielsweise in Form von Gradienten und

Konzentrationsgefällen bietet weiterhin die Möglichkeit das Verhalten von Stammzellen in ihrer natürlichen Umgebung zu studieren und somit die Chance weiterführende Erkenntnisse über die Grundlagen des Stammzellverhaltens bei der Kultivierung und Differenzierung zu gewinnen.

4.1 Substrate und Kopplung der Wachstumsfaktoren

Für die Immobilisierung von Wachstumsfaktoren ist die Verfügbarkeit sowohl geeigneter Oberflächen als auch entsprechender Kopplungsstrategien eine wichtige Voraussetzung [Ito, 2008]. Die hier verwendeten planaren Glasoberflächen trugen Amino- und Epoxysilan sowie Neutraavidin als Modifizierung an ihrer Oberfläche. Mittels der EDC-(1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid) -Methylimidazol- bzw. EDC-NHS (N-hydroxysuccinimid)-Kopplungsmethode wurden die silanisierten Oberflächen einer weiteren Modifikation mit Wachstumsfaktoren unterzogen. Bei den neutraavidinbeschichteten Glasoberflächen wurde dieser Schritt mit biotinylierten Wachstumsfaktoren realisiert. Als zweites Oberflächenmaterial wurde Polystyren, welches in der Zellkultivierung als Standardoberfläche genutzt wird, mit Hilfe der Kopplungspuffer (pH 7,4, pH 9,6) der Firma Candor mit Wachstumsfaktoren funktionalisiert.

Sowohl an den faktorunmodifizierten als auch faktormodifizierten Oberflächen wurden im Anschluss Zytotoxizitätstests vorgenommen. Als erstes wurde hierfür eine Lebend-Tod-Färbung mit Fluoresceindiacetat und Propidiumjodid durchgeführt. Diese gibt zügig Aufschluss über die Verträglichkeit der getesteten Oberflächen und der Kopplungsmethoden in Verbindung mit den Wachstumsfaktoren. Bezüglich dieser Untersuchungsmethode der Zytotoxizität konnten für die humanen und murinen glandulären Stammzellen (GSCs) gute Ergebnisse erzielt werden. Fast alle Oberflächen sowohl ohne als auch mit Faktormodifizierung zeigten ausschließlich grüne, vitale Zellen. Lediglich die epoxysilanierten Glasoberflächen wichen vom Durchschnitt ab und wiesen nach den definierten Inkubationszeiträumen reduzierte Zellzahlen auf. Die Detektion keiner einzigen roten und somit toten Zelle kann auf die durchgeführten Waschschriffe zurückgeführt werden. Für die tritonbehandelten Kontrollen konnten ausschließlich tote Zellen detektiert werden, womit die erfolgreiche Testdurchführung gezeigt werden konnte. Da diese Färbung fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet wird, sind Waschvorgänge im Anschluss an den Färbeschritt notwendig. Der Verzicht auf die Waschschriffe würde den Hintergrund bei der Fluoreszenzmikroskopie drastisch verschlechtern. Da eine geschädigte Membran nicht unbedingt zum Absterben einer Zelle führen muss, kann

mit Hilfe der Lebend-Tod-Färbung jedoch nur eine eingeschränkte Aussage über die Zytotoxizität der getesteten Oberflächen getroffen werden. Um fundiertere Schlussfolgerungen bezüglich der Verträglichkeit wachstumsfaktormodifizierter und wachstumsfaktorunmodifizierter Oberflächen ziehen zu können, wurden zusätzlich zu der Lebend-Tod-Färbung an Tag zwei und sieben des Kultivierungszeitraumes Tests durchgeführt, welche Aufschluss über die Lactatdehydrogenase (LDH)- und Stoffwechselaktivität geben. Die LDH ist am Grundstoffwechsel der Zelle beteiligt und kann somit als direkter Marker für die Zellvitalität herangezogen werden. Nachgewiesen wird sie dabei im Zellkulturüberstand, wenn die Membranintegrität der untersuchten Zellen in Verbindung mit den getesteten Substanzen nicht mehr ausreichend gegeben ist. Die Ergebnisse aus den Probenüberständen der humanen und murinen GSCs auf Oberflächen ohne Biofunktionalisierung zeigten im Vergleich zu den parallel durchgeführten Positiv- und Negativkontrollen nur sehr geringe Mengen an LDH. Die ermittelten LDH-Werte der humanen glandulären Stammzellen der Speicheldrüse (SGSCs) (Abbildung 23 links) lagen bei 10% bezogen auf die Positivkontrolle, wohingegen bei den murinen pankreatischen Stammzellen (PSCs) (Abbildung 23 rechts) etwas höhere Werte (25-30%) bezüglich der LDH im Zellkulturüberstand ermittelt wurden. Somit lag bei den murinen GSCs eine leichte Reduzierung der Substratverträglichkeit vor. Die ähnlich durchgeführten Untersuchungen auf wachstumsfaktorfunktionalisierten Oberflächen ergaben für die humanen GSCs mit 10 bis 15% etwas bessere Werte bezüglich der LDH-Aktivität als die für die murinen GSCs ermittelten Werte mit 10 bis 25%. Die analogen Analysen für die Immobilisierung von BMP-2 (bone morphogenic protein-2) mittels der korrespondierenden Kopplungsmethoden auf den verschiedenen Oberflächen zeigten mit 10 bis 30% für beide Stammzelllinien sehr ähnliche Ergebnisse (Abbildung 25). Weiterführende Analysen zur Verträglichkeit der nicht biofunktionalisierten Oberflächen wurden mit dem Cell Proliferation Reagent WST-1 Testkits der Firma Roche vorgenommen. Die Auswertung dieser Untersuchung lieferte für die unterschiedlichen Oberflächen ähnliche Ergebnisse. So wurde bei der Kultivierung der humanen (40%) und murinen (30%) GSCs ausschließlich auf epoxysilanbeschichteten Glasoberflächen ein erniedrigter Effekt bezüglich der metabolischen Stoffwechselaktivität festgestellt (Abbildung 24). Diese Ergebnisse werden durch die Daten der Zytotoxizitätsuntersuchungen mittels der der Lebend-Tod-Färbung bestätigt.

Die ermittelten Ergebnisse der drei Zytotoxizitätstests, jeweils im Vergleich zu den korrespondierenden Positiv- und Negativkontrollen betrachtet, machen deutlich, dass die verschiedenen Oberflächen mit und ohne Wachstumsfaktormodifizierung als Untergrund für die Zellkultivierung geeignet sind. Zwar wurde ein geringer Effekt bezüglich der LDH- und Stoffwechselaktivität an Tag zwei und sieben festgestellt, dieser scheint jedoch keine negativen Auswirkungen auf die Kultivierung und Differenzierung der humanen und murinen adulten Stammzellen aus exokrinem Drüsengewebe nach sich zu ziehen. Ein zytotoxischer Effekt einer Substanz würde schon nach wenigen Stunden bemerkt werden. Zudem konnte auf allen untersuchten Oberflächen im späteren Verlauf gleichermaßen eine gerichtete Differenzierung mittels immobilisierter Wachstumsfaktoren mit Erfolg erzielt werden.

Weiterhin ist für die Differenzierung der adulten Stammzellen mittels gekoppelter Induktoren die lang anhaltende und stabile Immobilisierung der Wachstumsfaktoren von besonderer Bedeutung [Ito, 2008]. Für die Untersuchung der Immobilisierungstabilität wurde der osteogene Differenzierungsfaktor BMP-2 mittels der verschiedenen Kopplungsmethoden auf die korrespondierenden Oberflächen appliziert und 14 Tage inkubiert. Der Erfolg der stabilen Wachstumsfaktorkopplung kann zum einen durch eine Antikörperfärbung [Metzger et al., 2007; Ito et al., 2005] gegen den immobilisierten Wachstumsfaktor und zum anderen mittels eines Zytokin-ELISAs [Izumi et al., 2001; Bayes-Genis et al., 2000; Grimberg und Cohen, 2000; Ju et al., 2000] nachgewiesen werden. Für die immunfluoreszenzmikroskopische Analyse der wachstumsfaktorbehandelten Oberflächen wurden verschiedene Signalintensitäten ermittelt. Die stärksten Fluoreszenzsignale konnten bei der Kopplung von BMP-2 mit Hilfe der Kopplungspuffer der Firma Candor mit pH 7,4 und pH 9,6 erzielt werden. Eine mittlere Signalintensität wurde sowohl für die Immobilisierung von biotinyliertem BMP-2 auf Neutravidinoberflächen als auch für die Kopplung des Faktors ohne Modifizierung auf Aminosilan- und Epoxysilanoberflächen mittels EDC-Methylimidazol erreicht. Die immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Kopplung des osteogenen Differenzierungsfaktors auf den silanisierten Glasoberflächen durch EDC-NHS zeigte schwächere Signale als für die anderen Kopplungsmethoden (Abbildung 26).

Weiteren Aufschluss über die Immobilisierungsstabilität brachte die Untersuchung mit Hilfe eines Zytokin-ELISAs. Dieser weist spezifisch den Wachstumsfaktor nach, sollte der sich im Anschluss an die Kopplung wieder von der Oberfläche gelöst haben.

Sowohl in den Waschpuffern der drei durchgeführten Waschvorgänge (1,7 bis 4,25 ng/ml BMP-2), die sich dem Aufspotten und Inkubieren des Faktors anschlossen, noch in Substratüberständen von Tag eins bis drei (maximal 0,6 ng/ml BMP-2) wurden nur geringe Konzentrationen des osteogenen Differenzierungsfaktors detektiert. In den Überständen der Tage sieben bis 21 konnten keine detektierbare Konzentration ermittelt werden (Abbildung 27).

Die Ergebnisse zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Wachstumsfaktorstabilität weisen darauf hin, dass die verschiedenen Kopplungsstrategien, EDC-Methylimidazol bzw. EDC-NHS sowie Avidin-Biotin und die Immobilisierung mittels der Kopplungspuffer der Firma Candor, im Zusammenhang mit den unterschiedlichen Oberflächen in ihrer Kopplungseffizienz variieren. Da alle Oberflächen der gleichen Färbe- und Waschprozedur unterzogen wurden, und in nachfolgenden Differenzierungsexperimenten die gekoppelten Wachstumsfaktoren die Differenzierung auslösen konnten, scheint eine ausreichende Konzentration an Differenzierungsinduktor auf allen untersuchten Oberflächen stabil angekoppelt zu sein. Hierbei konnte durch die wachstumsfaktormodifizierten Oberflächen sowohl die erfolgreiche Differenzierung in Adipozyten nach 18 Tagen als auch in Osteoblasten nach 21 Tagen mittels verschiedener Nachweismethoden gezeigt werden. Die Daten, welche aus der ELISA-Analyse gewonnen werden konnten, machen deutlich, dass sich während der Waschschriffe und auch bei der anschließenden 21-tägigen Inkubation der Oberflächen mit immobilisiertem Wachstumsfaktor nur ein geringer Anteil dieses Faktors wieder von der Oberfläche löst. Die in den Waschpuffern nachweisbaren Faktorkonzentrationen von 1,7 bis 2,4 ng/ml BMP-2 deuten daraufhin, dass die Oberfläche des Applikationspunktes (Spots) mit Wachstumsfaktormolekülen gesättigt war und somit der Überschuss im Zuge der Waschprozedur abgespült wurde. Die darüber hinaus in den ersten drei Tagen der Inkubation detektierten Konzentrationen lagen mit maximal 0,6 ng/ml BMP-2 deutlich darunter. Daran anschließende Analysen, bei denen die humanen und murinen GSCs über einen Zeitraum von 21 Tagen geringe Konzentrationen von maximal 3 ng/ml BMP-2 zur Verfügung gestellt wurden, konnten keine Differenzierung induzieren (Anhang: Abbildung 41 oben). Zudem ist zu berücksichtigen, dass ein sich eventuell gelöster Faktor durch den regelmäßigen Mediumwechsel aus der Zellkultur entfernt und somit nicht zur Differenzierung der Zellen zur Verfügung stehen würde. Dieser Aspekt wurde durch ein Experiment mittels einmaliger Zugabe von 100 ng/ml

BMP-2 im Medium über einen Zeitraum von vier Tagen durchgeführt. Hierbei wurde beim ersten Mediumwechsel nach vier Tagen das Differenzierungsmedium mit gelöstem osteogenem Differenzierungsfaktor gegen das Differenzierungsmedium ohne Faktor ausgetauscht. Das Experiment wurde über weitere 17 Tage weitergeführt und somit an Tag 21 nach Fixierung den Analysen mittels histologischen und immunzytochemischen Nachweismethoden zugeführt. Hierbei konnte nur eine schwache ALP-Aktivität und keine Collagen Typ I-Expression detektiert werden (Anhang: Abbildung 41 unten). Somit ist das Bereitstellen der Differenzierungsinduktoren über einen kurzen Zeitraum für eine effektive Differenzierung unzureichend.

Somit sind die wesentlichen Voraussetzungen, die an Biomaterialien und Immobilisierung von Signalfaktoren für die Differenzierung von Stammzellen gestellt werden, erfüllt. Die in dieser Arbeit eingesetzten planaren Oberflächen und Kopplungsmethoden scheinen für die Kultivierung und Differenzierung von Stammzellen und anderen Vorläuferzellen geeignet. Die Stabilität und Aktivität der gekoppelten Faktoren werden der Langzeitdifferenzierung und Langzeitkultivierung der humanen und murinen GSCs über einen Zeitraum von mehreren Wochen gerecht. Darüber hinaus unterstützen sie die mehrstufigen Differenzierungsprozesse in der Stammzelltechnologie.

4.2 Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen mittels gelöstem und immobilisiertem Wachstumsfaktor

Monozyten sind Bestandteil des peripheren Blutes und werden durch eine Dichtegradientenzentrifugation aus Leukozyten-Konzentrationen gesunder Blutspender gewonnen. Nach Aufreinigung können diese mononukleären Zellen durch Kultivierung in einem Differenzierungsmedium in Makrophagen oder Dendritische Zellen (DCs) differenziert werden. Wesentlicher Bestandteil des Makrophagendifferenzierungsmediums ist der Faktor M-CSF (*macrophages colony-stimulating factor*). Durch die Zugabe dieses Zytokins entwickeln sich Monozyten in Makrophagen [Hashimoto, 1997; Murakami et al., 1996]. Neben der Funktion als Differenzierungsfaktor stellt M-CSF gleichzeitig auch das Überleben der Makrophagen als Überlebensfaktor sicher [Brugger et al., 1991; Rehli et al., 1995]. Im Gegensatz zur Makrophagendifferenzierung mit M-CSF, bei der die Makrophagen eine spindelförmige Gestalt annehmen, entwickeln sich die Monozyten unter Einfluss von humanem AB-Serum zu Makrophagen mit einer runden Morphologie [Way et al., 2009]. Zur Überprüfung des Reifegrades der Makrophagen bietet sich die immunzytochemische Untersuchung mittels des Antikörpers MAX.1 an. Die Expression des Oberflächenmarkers Carboxypeptidase M, welche durch MAX.1 dargestellt wird, steigt während der *in vitro*-Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen stark an und ist ausschließlich auf reifen Makrophagen lokalisiert [Rehli et al., 2000]. Die Expression der Carboxypeptidase M ist dabei unabhängig von dem Differenzierungsinduktor M-CSF oder dem humanen AB-Serum.

Die Differenzierung von Makrophagen mit gelöstem M-CSF als Differenzierungsinitiator wurde bereits vielfach in der Literatur beschrieben [Martinez et al., 2006; Finnin et al., 1999; Cecchini et al., 1994] (Abbildung 17). Die Induktion der Makrophagenentwicklung durch immobilisierte Wachstumsfaktoren hingegen ist noch nicht Gegenstand von Untersuchungen gewesen. Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die festphaseninduzierte Differenzierung von Monozyten in Makrophagen entwickelt (Abbildung 18) und in einer gemeinsamen Publikation mit C. Leclerc veröffentlicht [Leclerc et al., 2007]. Durch die schnelle Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen bot sich dieses Zellsystem für die Entwicklung

festphaseninduzierter Differenzierungssysteme besonders an. Hierfür wurden die Monozyten nach Isolation und Aufreinigung auf zuvor M-CSF-modifizierte Aminosilanoberflächen ausplattiert. Die Kopplung des Differenzierungsinduktors wurde dabei mittels der adsorptiven Kopplung an die aminosilanisierten Glasoberflächen vorgenommen. Analog zur Differenzierung mittels löslich vorliegendem Faktor wurde die Differenzierung der Makrophagen durch den immunzytochemischen Nachweis mit MAX.1 durchgeführt.

4.3 Differenzierungspotential der humanen und murinen glandulären Stammzellen (GSCs)

4.3.1 Gezielte Differenzierung der humanen und murinen GSCs mittels gelöster Wachstumsfaktoren

Um adulte Stammzellen zu identifizieren, werden deren Eigenschaften untersucht. Bei adulten Stammzellen handelt es sich um undifferenzierte Stammzellen, die in sehr geringer Anzahl in einem differenzierten Zellverband vorkommen. Sie besitzen die Fähigkeit der Selbstreplikation und können sich in Vorläuferzellen teilen. Durch Signale aus dem umgebenden zellulären Milieu, wie Zellkontakte und Wachstumsfaktoren, entstehen aus diesen Vorläuferzellen differenzierte, organspezifische Zellen [Scadden, 2006].

Üblicherweise wird für die Charakterisierung neu gewonnener Stammzellen ein ganzes Set von spezifischen Markern herangezogen. Da der Fokus dieser Arbeit auf der Differenzierung von adulten Stammzellen und anderen Vorläuferzellen mittels gelöster und immobilisierter Wachstumsfaktoren lag, wurde für die Untersuchung der humanen glandulären Stammzellen aus der Speicheldrüse (SGSCs) und der murinen glandulären Stammzellen aus dem Pankreas (PSCs) hinsichtlich ihres Stammzellcharakters lediglich ein Markerprotein exemplarisch ausgewählt. Als Marker zur Untersuchung des Stammzellcharakters wurde hierbei ein Antikörper gegen Nestin genutzt. Dieser wurde früher vielfach für die Untersuchung stammzellabgeleiteter

neuraler Vorläuferzellen verwendet, da dieser multipotente neurale Vorläuferzellen erkennt. Darüber hinaus kann dieser Antikörper aber auch für die allgemeine Charakterisierung von Stammzellen genutzt werden [Mercati et al., 2008; Hoffmann et al., 2006; Wiese et al., 2004]. Die humanen und murinen adulten Stammzellen zeigten nach viertägiger Kultivierung im Kultivierungsmedium eine starke Nestinexpression. Während nestinpositive Zellen in beiden Stammzelllinien detektiert werden konnten, wurden keine positiven Zellen hinsichtlich der Zweitantikörper- und Isotypfärbungen in den Kontrollansätzen beobachtet. Somit wurden die humanen und murinen glandulären Zellen aufgrund der deutlichen Nestinexpression und dem exokrinen Drüsengewebe als Isolationsquelle als adulte Stammzellen in dieser Arbeit verifiziert.

Glanduläre adulte Stammzellen wurden neben Epidermis und Knochenmark, Darmepithel, Leber, Lunge auch in Organen wie Schild- und Speicheldrüsen [Kruse et al., 2004] sowie in Testis [Conrad et al., 2008; Kerr et al., 2008; Payne und Braun, 2008; Yoshida, 2008; Guan et al., 2007, 2006] und Pankreas [Gallo et al., 2007; Seeberger et al., 2006; Choi et al., 2004; Kruse et al., 2004; Seaberg et al., 2004] nachgewiesen und isoliert. Diese können in Anlehnung an Differenzierungsprotokolle der mesenchymalen Stammzellen vielfältig differenziert werden [Brose et al., 2009; Gorjup et al., 2009]. Die Bezeichnung der mesenchymalen Stammzelle wurde u. a. von Caplan geprägt [Caplan, 1961]. Er benannte damit eine einzelne Bindegewebsvorläuferzelle, die Bestandteil des embryonalen und adulten Knochenmarkstromas ist und in unterschiedlich spezialisierte Tochterzellen wie Osteoblasten, Chondrozyten, Adipozyten, Myozyten und Fibroblasten differenzieren kann [Caplan, 1991, 1994]. Zahlreiche weitere Arbeiten machen die verschiedenen Differenzierungsmöglichkeiten humaner und tierischer Stammzellen mesenchymalen Ursprungs deutlich. So wurde neben der Spezialisierung in Knochen- und Knorpelgewebe [Kadyala et al., 1997; Cassiede et al., 1996] die Differenzierung in Adipozyten gezeigt [Jaiswal et al., 2000; Kopen et al., 1999; Pittenger et al., 1999]. Durch spezielle *in vitro*-Differenzierungsprotokolle ist es zudem möglich, mesenchymale Stammzellen in viszerale Mesothel [Reyes et al., 2001] sowie in stromaähnliche Vorläuferzellen des Thymus [Liechty et al., 2000] und des Knochenmarks [Pittenger et al., 2000; Dennis und Caplan, 1996] zu überführen. Darüber hinaus können sie auch in Vorläuferzellen differenziert werden, die Merkmale und Eigenschaften von Skelettmuskel-, Herzmuskel- und längsgestreifter

Muskelzellen tragen [Xu et al., 2004; Toma et al., 2002; Ferrari et al., 1998; Wakitani et al., 1995]. Bisher konnte für die adulten Stammzellen aus exokrinem Drüsengewebe die spontane Differenzierung in verschiedenen Gewebetypen gezeigt werden. Sie wurden in Organoid bodies, die über „hanging drop“-Kulturen [Keller et al., 1995] erzielt wurden, bereits in neurale, gliale Zellen und Muskelzellen [Kruse et al., 2006; Kajahn et al., 2008] sowie in Oozyten differenziert [Danner et al., 2007]. Darüber hinaus legt die Arbeitsgruppe Zellbiologie am Fraunhofer IBMT in St. Ingbert ein besonderes Augenmerk auf die gezielte Differenzierung von adulten Stammzellen aus exokrinem Drüsengewebe in mesenchymale Gewebetypen wie Knochen, Knorpel und Fett. So konnten humane SGSCs und Zellen aus dem Nagermodell erfolgreich in diese drei Richtungen differenziert werden [Brose et al., 2009; Gorjup et al., 2009]. Weiterhin konnten die adulten Stammzellen aus exokrinem Drüsengewebe durch geeignete Stimuli in neurale, pankreatische [Seaberg et al., 2004; Choi et al., 2004] Zellen sowie in Cardiomyozyten [Guldner et al., 2006], Hepatozyten, in Zellen des Magen-Darm-Traktes [Suzuki et al., 2004] und in Zellen, die Keimzellmerkmale tragen [Danner et al., 2007] differenziert werden.

Anhand der zusammenfassenden Betrachtung der Literaturdaten, scheinen die glandulären Stammzellen, die erst in jüngster Zeit in den verschiedenen Drüsengeweben lokalisiert und isoliert wurden, ein vergleichbares Differenzierungspotential wie die mesenchymalen Stammzellen (MSCs) zu besitzen. Diese sind schon seit vier Jahrzehnten Gegenstand intensiver Forschung.

Die humanen und murinen adulten Stammzellen in dieser Arbeit stammen aus dem Gewebe der Glandula submandibularis und des Pankreas. Sie wurden unter Verwendung verschiedener adiopgener, chondrogener und osteogener Marker hinsichtlich ihres mesodermalen Differenzierungspotentials charakterisiert. Die Differenzierung wurde dabei durch Wachstumsfaktoren induziert, die gelöst im Kultivierungsmedium vorlagen. Die Analysen erfolgten sowohl immunzytochemisch als auch histochemisch unter Berücksichtigung entsprechender Kontrollkulturen.

Für die verwendeten Markerproteine der osteogene Differenzierung Collagen Typ I und III sowie für die histologischen Nachweismethoden mittels Alkalischer Phosphatase (ALP), von Kossa- und Alizarin Rot S-Färbung wurden durchweg positive Ergebnisse bezüglich der Differenzierung der humanen und murinen GSCs in Osteoblasten ermittelt. Die glandulären Stammzellen zeigten eine deutliche Differenzierungseffizienz initiiert durch den gelösten Wachstumsfaktor BMP-2

vergleichend zu den unbehandelten Kontrollkulturen. Bisher wurde nur von Gorjup et al., [2009] die gezielte osteogene Differenzierung von den hier verwendeten humanen Stammzellen aus Drüsengewebe (Glandula submandibularis) gezeigt. Die gerichtete Differenzierung in Osteoblasten anhand von Zellen des Mauspankreas konnte erstmals in der vorliegenden Arbeit durchgeführt werden. Da Entwicklungsprozesse während der Embryogenese und im adulten Organismus im Zuge von Reparaturmechanismen stets im dreidimensionalen Raum stattfinden, wurde die erfolgreiche Knochendifferenzierung sowohl im Monolayer (Abbildung 21) als auch in der Pelletkultur (3D) (Anhang: Abbildung 38), wie auch schon von Gerber und Gwynn am Rattenmodell vorgeschlagen, gezeigt [Gerber und Gwynn, 2002]. Üblicherweise werden die Differenzierungsversuche in der Zellkulturschale und somit Monolayerkultursystem (2D) durchgeführt.

Für die chondrogene Differenzierung von Zellen wurde im Gegensatz dazu häufig die Aggregation der Zellen zu Pellets propagiert [Gonzalez, 2008; Pittenger et al., 1999]. Diese Differenzierungsrichtung ist u. a. durch die Expression von Collagen Typ II charakterisiert. Zudem gibt die Alcian Blau-Färbung Aufschluss über das Vorhandensein von Proteoglykanen, welche einen großen Anteil der Knorpelsubstanz ausmachen. Mittels des Differenzierungsinduktors TGF β -3 (*transforming growth factor β -3*) konnten die humanen und murinen GSCs sowohl in 2D- (Anhang: Abbildung 38) und 3D-Kultur (Abbildung 21) erfolgreich differenziert werden. Jedoch ist die Expression des Collagen Typ II im Knorpelgewebe der humanen und auch murinen GSCs nicht so stark wie vergleichsweise die Collagenexpression des Typ I und III bei der osteogenen Differenzierung der untersuchten Stammzelllinien. Die Übertragung der chondrogenen Differenzierung vom 3D- (Abbildung 21) auf das 2D-Kultursystem (Anhang: Abbildung 38) konnte innerhalb dieser Arbeit ebenfalls gezeigt werden [Brose et al., 2009] und wurde in der Literatur auch bereits beschrieben [Guo et al., 2007].

Die Differenzierung in Fettgewebe wurde als Modellsystem zur Entwicklung der Differenzierung von Stammzellen über immobilisierte Wachstumsfaktoren ausgewählt und ebenso in Anlehnung an *in vitro*-Protokolle der Kultivierung und Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen durchgeführt, wie die vorangegangenen osteogene und chondrogene Zelldifferenzierung. Auch hier konnten die humanen und murinen Stammzellen aus dem adulten Organismus erfolgreich in Adipozyten differenziert werden. Überprüft wurde der Differenzierungs-

erfolg neben morphologischen Kriterien mittels einer immunzytochemischen und histochemischen Analyse. Eine Expression des in der Fettvesikelmembran lokalisierten Proteins Perilipin konnte dabei ausschließlich in den IGF-1 behandelten Differenzierungskulturen mittels der Fluoreszenzmikroskopie beobachtet werden. Zusätzlich wurde der lipophile Farbstoff zur Einschätzung des Differenzierungserfolges herangezogen.

Die Propagierung der adipogenen Differenzierung zur Entwicklung der Differenzierung von Stammzellen über immobilisierte Wachstumsfaktoren birgt einen entscheidenden Vorteil gegenüber den beiden anderen beschriebenen und durchgeführten Entwicklungsrichtungen. Die Spezialisierung der Zellen zu Adipozyten ist ein Prozess, der unter anderem durch die Entwicklung von Fettvesikeln geprägt ist. Dieser kann parallel zur Kultivierung und Differenzierung mikroskopisch verfolgt werden, ohne dass die vorzeitige Beendigung des Experimentes erforderlich ist. Andere Differenzierungen können nur anhand verschiedener Färbetechniken hinsichtlich des Differenzierungserfolges analysiert werden und bedürfen zur Nachweisdurchführung den Abbruch des Experimentes. Ist der Erfolg nicht bzw. unzureichend vorhanden, bedarf die Untersuchung der Problemstellung einen erneuten Experimentalansatz unter veränderten Bedingungen, wie zum Beispiel die Auswahl eines längeren Differenzierungszeitraumes.

Neben dem beschriebenen Vorteil für die Entwicklung der Zelldifferenzierung mittels gekoppelter Biomoleküle scheint die adipogene Differenzierung für Therapieansätze und die Regenerative Medizin nicht von vordergründigem Interesse zu sein. Sie hat aber durchaus ihre Berechtigung in der Plastischen und Rekonstruktiven Chirurgie. So wird die Fettgewebstransplantation bei kleineren Defekten, die durch die Einschränkung von Funktion und Ästhetik gekennzeichnet sind oder zur Faltenauffüllung im kosmetischen Bereich eingesetzt [Ellenbogen, 2000; Billings und May, 1989; Smahel, 1986; Samhel, 1984]. Zudem ist das adipogene Gewebe auch als Quelle für die Isolation von adulten Stammzellen bekannt [Korn et al., 2009].

4.3.2 Immobilisierte Wachstumsfaktoren induzieren die gezielte

Differenzierung von humanen und murinen GSCs

Stammzellendifferenzierung ist ein hochkomplexer Prozess, der durch eine Vielzahl von Signalfaktoren und Biomolekülen aus deren zellulärer Mikroumgebung reguliert wird. Bei diesen Faktoren handelt es sich sowohl um Signale von der Oberfläche als auch aus dem umgebenden löslichen Milieu. Neben den in Lösung vorliegenden Signalfaktoren (auto-, para- und endokrinen Signalen) ist auch die Interaktion mit Oberflächenmolekülen wie Rezeptoren in der zellulären Nachbarschaft (juxtakrine Signale) und der Kontakt mit Bestandteilen der ECM für die Differenzierungsprozesse essentiell (Abbildung 37). Dem Zusammenspiel dieser verschiedenen Signale unterschiedlicher Herkunft und deren zeitlich definierte Abfolge wird dabei nicht nur bei so defizienten Prozessen wie der Zelldifferenzierung eine besondere Bedeutung beigemessen, sondern spielt auch beim Adhäsions- und Proliferationsverhalten von Zellen eine wichtige Rolle [Denef, 2008; Scadden, 2006].

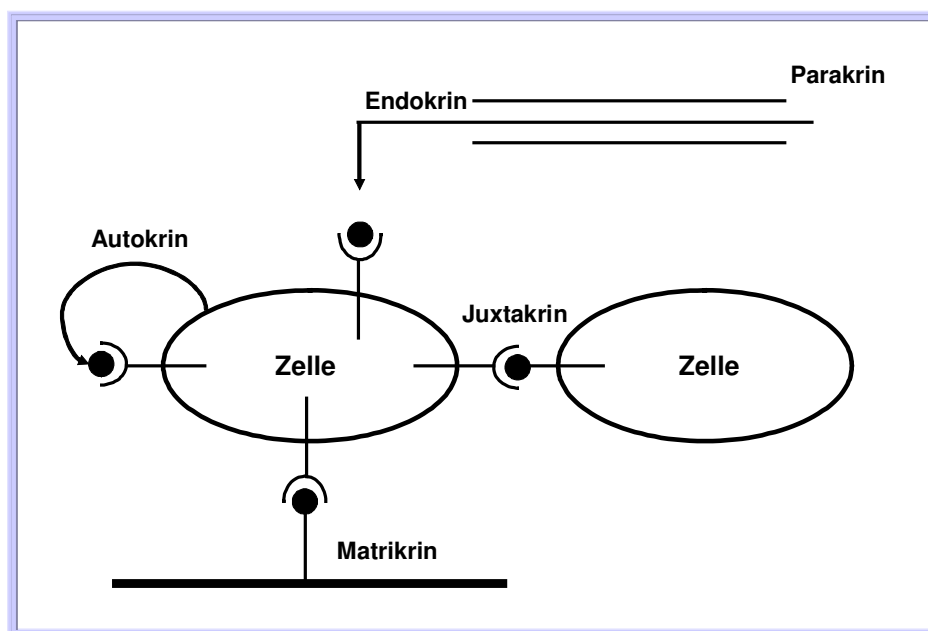


Abbildung 37:
Schematische Darstellung der Modelle zur Stimulation von Wachstumsfaktoren [nach Ito, 1998].

Die gerichtete Differenzierung wurde bisher ausschließlich durch im Medium gelöste Faktoren induziert. Dabei haben sich schon eine Vielzahl von Forschungsarbeiten mit der Modifizierung von Materialien zum Zweck der besseren Akzeptanz von Zellen zur Kultivierung beschäftigt. Verschiedene Ansätze haben mit dem Auftragen von ECM-Molekülen [Rozkiewicz et al., 2006; Flaim et al., 2005; Rhee et al., 2004; Ito, 2003]

und RGD-Mustern [Gasteier et al., 2007; Groll et al., 2005; Pierschbacher und Ruoslahti, 1984] auf unterschiedlichen Oberflächenmaterialien die Verbesserung des Zelladhäsionsverhaltens und die Unterstützung der Zellproliferation verfolgt. Für den Einsatz von Biomaterialien werden in der Regenerativen Medizin jedoch nicht nur Werkstoffe benötigt, die eine gute Biokompatibilität aufweisen sowie das Anhaften und Wachsen der Zellen unterstützen, sondern auch auf die Zelldifferenzierung einen direkten aktiven Einfluss nehmen. Dazu ist es notwendig, die zuvor identifizierten bioverträglichen Materialien mit differenzierungsinduzierenden Wachstumsfaktoren weiterhin zu funktionalisieren. Zahlreiche Anstrengungen auf dem Gebiet der Immobilisierung von Proteinen, Zytokinen und anderen Signalfaktoren wurden bereits unternommen. Cuatrecasas, Butcher et al. und Oka und Topper waren die ersten, die sich mit der Immobilisierung von Biomolekülen beschäftigten. Sie untersuchten die Interaktion zwischen Zellen und Insulin, welches an Sepharosegel gekoppelt vorlag und verfolgten dabei die Aufklärung der Insulinregulation [Cuatrecasas, 1969; Butcher et al., 1973; Oka und Topper, 1974]. Diesen Ansatz verfolgte insbesondere die Gruppe um Ito weiter. So veröffentlichte diese im Laufe der letzten Jahre zahlreiche Arbeiten in denen die adhäsive und kovalente Kopplung von Insulin [Ito, 1999; Liu et al., 1992a, 1992b; Ito, 1991], FGF [Ito et al., 2001] sowie EGF [Chen und Ito, 2000; Ito, 1996] und VEGF [Ito, 2005] beschrieben wird. Diese Faktoren wurden dabei auf Oberflächen wie Glas oder verschiedenste Polymere (PMMA, PPO, PS, PTFE, PET) immobilisiert. Neben diesen Signalfaktoren wurden zusätzlich auch IGF-1 [Watanabe et al., 2003] und BMP-2 [Kashiwagi et al., 2009] adhäsiv an Materialien gebunden. Auf diesen modifizierten Oberflächen wurden jedoch bisher nur Fibroblasten oder immortalisierte Zelllinien über relativ kurze Zeiträume zur Untersuchung der verbesserten Adhäsion und Proliferation kultiviert. Neben der Untersuchung von Zellanhaftung und Zellwachstum ist besonders die Differenzierung von Zellen interessant. So konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit die funktionale Immobilisierung und effektive Differenzierung von Makrophagen und Dendritischen Zellen aus Monozyten über bioaktive Substrate gezeigt und in Zusammenarbeit mit C. Leclerc veröffentlicht werden [Leclerc et al., 2007] (Abbildung 18). Die Kopplung von Signalmolekülen zur Zelldifferenzierung wurde in der Literatur weiterhin mehrfach beschrieben. Häufig wurden für die Differenzierung schon vorgeprägte Zellen eingesetzt. So differenzierten Zellen aus chondrogenem Gewebe unter Einfluss von TGF β zu Chondrozyten [Chou et al., 2005] oder Zellen aus Hirnisolaten

[Soen et al., 2006; Nakaoka et al., 2001] und Neuroblastomzelllinien [Gomez und Schmidt, 2006; Shibata et al., 2006; Chen et al., 2005] generierten unter Zugabe des neuronalen Wachstumsfaktors NGF (*nerve growth factor*) ins Medium neurale Ausläufer und differenzierten in Astrozyten oder Neurone. Für das Tissue Engineering sind jedoch die Stammzellen in den Fokus zum Einsatz in der Regeneration von geschädigten Geweben und Zellverbänden gerückt. So bestand ein wesentliches Ziel in dieser Arbeit in der Kopplung von Wachstumsfaktoren zur effektiven Differenzierung von Stammzellen. Es wurde erfolgreich gezeigt, dass die glandulären Stammzellen sowohl in Adipozyten als auch in Osteoblasten über die immobilisierten Differenzierungsinduktoren differenziert werden konnten (Abbildung 28 bzw. Abbildung 29). Da besonders Silane für die Oberflächenmodifizierung von Glas benutzt werden [Curran et al., 2005], kamen zu einem großen Teil ebenfalls silanisierte (Amino-, Epoxysilan) Oberflächen für die festphaseninduzierten Differenzierungsexperimente im Rahmen dieser Arbeit zum Einsatz. Für die adipogene Differenzierung wurde eine eingeschränkte Auswahl an biokompatiblen Oberflächen genutzt, wohingegen neben den amino- und epoxysilansierten sowie den neutravidinierten Glassubstraten auch Polystyrenoberflächen in die osteogenen Differenzierungsuntersuchungen miteinbezogen wurden. Diese gelten als Standardoberflächen in der Zellkultur. Die Verifizierung des adipogenen und osteogenen Differenzierungserfolges wurde dabei analog zur Differenzierung mit löslich vorliegendem IGF-1 bzw. BMP-2 mittels immunzytochemischen und histochemischen Analysen vorgenommen. Zusätzlich zu diesen Methoden wurde für die osteogene Differenzierungsrichtung die Konzentration der Alkalischen Phosphatase (ALP) und des Phosphates im Verlauf von vier bis 21 Tagen sowohl während der Differenzierung mit gelöstem Signalfaktor als auch mit immobilisiert vorliegendem Faktor verfolgt. Ito beschreibt in seiner Übersichtspublikation von 2007 den Zusammenhang zwischen immobilisierten Wachstumsfaktoren und einer erhöhten Differenzierungseffizienz. Hierfür wird die hohe lokale Konzentration des gekoppelten Signalfaktors und die damit verbundenen möglichen multivalenten Wechselwirkungen zwischen Signalmolekülen und korrespondierenden Rezeptoren verantwortlich gemacht. Eine hohe Anzahl an Signalmolekülen kann zum gleichen Zeitpunkt eine hohe Zahl von Rezeptoren, die in unmittelbarer Nachbarschaft liegen, binden und somit aktivieren. Diese mögliche Multivalenz und Interaktion von Ligandenmolekülen mit den komplementären Rezeptoren führt somit zu einer

Amplifikation der differenzierungsinduzierenden Signale und Signalkaskaden. Für die humanen und murinen GSCs konnte gleichermaßen eine erhöhte ALP-Aktivität und Phosphatkonzentration während der festphaseninduzierten osteogenen Differenzierung festgestellt werden. Die Aktivität der ALP und die Konzentration des Phosphats während der Osteoblastendifferenzierung mittels der konventionellen Anwendung gelöster Differenzierungsinduktoren fiel deutlich geringer aus (Abbildung 30). Watanabe et al. haben in ihrer Publikation von 2003 das Aufbringen des adipogenen Differenzierungsfaktors IGF-1 und Wachstumsfaktors FGF beschrieben, wobei sie die Myoblasten Zelllinie C₂C₁₂ auf diesem Array kultiviert und in die myogene Entwicklungsrichtung differenziert haben. Sie haben eine verschlechterte myogene Differenzierung mit Hilfe immobilisierter Faktoren im Gegensatz zu der Differenzierung mit löslich vorliegenden Faktoren festgestellt. Als mögliche Ursache diskutieren sie zum einen die verringerte Aktivität von IGF-1 durch die kopplungsmethodenbedingte Integration einer Azid-Phenyl-Gruppe, die für eine photoreaktive Ankopplung des Faktors notwendig ist. Zum anderen könnte auch eine zu hohe Konzentration des adipogenen Signalfaktors die Ursache für die verminderte Differenzierungseffizienz mittels des immobilisierten Faktors sein. Von Florini wurde ein solcher Effekt bereits beschrieben [Florini, 1989]. Sicherlich muss für die Beurteilung des Differenzierungserfolges und dem Vergleich von Differenzierung mit gelösten und immobilisierten Wachstumsfaktoren eine Unterscheidung der Signalfaktoren berücksichtigt werden, die unterschiedliche Entwicklungsrichtungen unterstützen und induzieren.

Einige erfolgreiche Untersuchungen bezüglich der osteogenen Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen wurden in der Literatur bereits beschrieben [Gonzalez et al., 2008; Xu et al., 2004]. Hinsichtlich der Oberflächenbeschichtungen im Zusammenhang mit Knochenerkrankungen richteten sich die Anstrengungen dabei zum einem wesentlichen Teil auf die Modifizierung von Titanoberflächen oder Titandioxid-Werkstoffen zur besseren Zellbesiedlung und Integration der Implantate in den geschädigten Bereich [Kashiwagi et al., 2009; Shi et al., 2008]. Als Trägermaterialien auf den Implantaten fungieren dabei oft Kollagene in Form von Kollagenbeschichtungen [Sigrudsson et al., 1997], Kollagenschwämmen [Boyne et al., 1997] oder Kollagengelen [King et al., 1998]. In vielen Studien wird auch die Kombination von Hydroxylapatiten [Tsuruga et al., 1997] und Kalziumphosphaten [Laffargue et al., 1999; Oda et al., 1997] mit BMP-2 erläutert. Diese dienen nach

Einsetzen des Implantates der chemotaktischen Anlockung von Zellen im Zielgewebe und deren möglichst lang anhaltende Stimulierung durch das immobilisierte Protein [Jennissen, 2000].

Zudem wurden auch Studien bezüglich der Regeneration von Knorpelgewebe an mesenchymalen Stammzellen durchgeführt. Diese konzentrieren sich dabei auf die Intergration der MSCs in Gerüststrukturen unter Einsatz von TGF β [Park et al., 2009; Fan et al., 2006] oder die Einbettung der Zellen in Hydrogele, die bereits Collagen Typ I und III enthalten [Bosnakovski et al., 2005]. Zwar implizieren die Daten der chondrogenen Differenzierung in dieser Arbeit den erfolgreichen Transfer dieser Differenzierungsrichtung vom 3D- (Abbildung 21) in das 2D-Kultivierungssystem (Anhang: Abbildung 38), jedoch wird üblicherweise die Differenzierung von Zellen in Chondrozyten in der Pelletkultur durchgeführt [Gonzalez et al., 2008]. Aus diesem Grund scheint die Knorpeldifferenzierung im therapeutischen Maßstab in Zellaggregaten wie Hydrogelen, Mikrosphären und Pellets erfolgsversprechender zu sein.

Adipozyten sind im Gegensatz zu der osteogenen und chondrogenen Differenzierung meist nur als Isolationsquelle für adulte Stammzellen interessant. Die Differenzierung in Adipozyten diente in dieser Arbeit als Modellsystem für die festphaseninduzierte Differenzierung von glandulären Stammzellen.

Vielfach wurde im Zusammenhang der Immobilisierung von Signalfaktoren für zellspezifisches Verhalten wie Adhäsion, Proliferation und Differenzierung über das Anbinden dieser Faktoren in Form von Gradienten oder Mustern nachgedacht. So sind Bioadhäsionschips, mit denen das Anhaften von Zellen auf einer Vielzahl von Adhäsionsproteinen gezielt und parallel untersucht werden kann, bereits kommerziell erhältlich. Chips in diesem multiplen Substrat-Array-Design können zum Beispiel mit Bestandteilen der ECM wie Laminin, Fibronectin, Vitronectin, Poly-L-Lysin, Serumalbuminen und auch verschiedenen Collagen Typen bei der Firma BioCat erworben werden. Jedoch auch einige andere Studien haben sich mit der Gestaltung und Kombination unterschiedlicher Signalmolekülen beschäftigt. So wurden RGD- [Groll et al., 2005] und ECM-Muster [Flaim et al., 2005] sowie Chip zum parallelen Testen des Zelladhäsions- und Zellproliferationsverhaltens auf unterschiedlichsten Polymeren [Anderson et al., 2004] generiert. Auch das Kombinieren von verschiedenen Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise IGF-1 mit FGF [Watanabe et al., 2003], zur Nachahmung des natürlichen zellulären Umfeldes im Organismus zur

Unterstützung der Zelldifferenzierung, wurde bereits durchgeführt. In Anlehnung an die gradientengesteuerten Differenzierungsprozesse im Körper während der embryonalen Entwicklung wurde in dieser Arbeit der osteogene Differenzierungsfaktor BMP-2 im Zuge der Stammzelldifferenzierung über immobilisierte Wachstumsfaktoren in einer Konzentrationsreihe angeordnet. Gleichzeitig konnten wie von Chen und Ito [2000] vorgeschlagen und unter 1.4.1.2 beschreiben konzentrationsbedingte Effekte hinsichtlich der Immobilisierung von Biomolekülen untersucht werden. So konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Konzentrationsreihe des gekoppelten BMP-2 Aufschluss darüber geben, dass eine effiziente Induzierung der Osteoblastendifferenzierung durch alle drei Konzentration (10 ng/ml, 100 ng/ml und 1000 ng/ml) an BMP-2 möglich ist (Abbildung 29, Anhang: Abbildung 39). Ferner weisen die Daten daraufhin, dass 100 ng/ml an BMP-2 die optimale Konzentration der Wachstumsfaktorlösung für die Knochendifferenzierung der humanen und murinen GSCs ist. Vielfach ist in der Literatur zur osteogenen Differenzierung von MSCs die gleiche BMP-2-Konzentration beschrieben [Gonzalez et al., 2008]. Jedoch wird wesentlich weniger Wachstumsfaktor bei der Differenzierung durch die Immobilisierung der Signalfaktoren verbraucht. Die punktförmige Applizierung des Faktors auf die Oberfläche benötigt weniger Material als die Differenzierung mit den Signalfaktoren in Lösung. Für die osteogene Differenzierung wird bei einem Differenzierungszeitraum von 21 Tagen und einem Mediumwechsel an jedem dritten oder vierten Tag ein Volumen von 10 bis 14 ml an Differenzierungsmedium mit 10 bis 14 μ l der Wachstumsfaktorlösung mit einer Konzentration von 100 ng/ml verbraucht. Die Osteoblastendifferenzierung auf der gleichen Wachstumsfläche mit immobilisiertem Faktor verbraucht bei gleichem Einsatz von Differenzierungsmedium und Wechsel des Mediums die Hälfte an BMP-2, d.h. bei 5 μ l einer 100 ng/ml konzentrierten Lösung 50 ng/ml BMP-2. Somit wird die Hälfte des Differenzierungsinduktors bei der Differenzierung mittels gekoppelten Faktors eingespart und die Differenzierungsexperimente können deutlich kosteneffizienter gestaltet werden. Mit der Konzentration von 1000 ng/ml BMP-2 konnte keine deutlich stärkere Differenzierung initiiert werden, wohingegen 10 ng/ml des osteogenen Wachstumsfaktors die Differenzierung induzieren konnte, jedoch in geringerer Masse als die mittlere Konzentration.

4.3.2.1 Konditioniertes Medium

Das Auftragen der verschiedenen konzentrierten BMP-2-Lösungen zur Immobilisierung des osteogenen Differenzierungsfaktors auf die unterschiedlichen planaren Oberflächen wurde in direkter Nachbarschaft zum Kontrollareal vorgenommen (Abbildung 29). Im Zuge der Überprüfung der Kontrollregionen zur Analyse des Differenzierungserfolges im Anschluss an den Versuchszeitraum von 21 Tagen wurden auch in den Kontrollabschnitten einige wenige osteogene Strukturen detektiert. Dadurch, dass Zellen im Zellverband nicht nur Signalmoleküle von dem umgebenden Untergrund aufnehmen, sondern vielmehr auch selbst Proteine sezernieren und sich damit selbst und ihre zelluläre Nachbarschaft antriggern, scheint die anfängliche und vergleichsweise schwache Differenzierung der Zellen auf den Kontrollarealen mit dem Konditionieren des Mediums durch die Zellen auf den wachstumsfaktorfunktionalisierten Regionen im Zusammenhang zu stehen. Ganz bewusst wird konditioniertes Medium bei der Kultivierung von embryonalen Stammzellen angewendet. Die embryonalen Stammzellen werden dafür auf einen Zelllayer von embryonalen Fibroblasten kultiviert und durch das von diesen Feederzellen produzierte LIF (*Leukemia inhibitory factor*) im undifferenzierten Stadium gehalten [Reubionoff et al., 2000; Thomson et al., 1998]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass testikularzellenkonditioniertes Medium die Differenzierung von embryonalen Stammzellen in Oozyten induzieren kann [Lacham-Kaplan et al., 2006]. Da Astrozyten einen regulativen Einfluss auf die Funktion von Endothelzellen der Gehirnkapillaren haben, wurde für diese beiden Zelltypen ein Co-Kultursystem etabliert, bei dem die zelleigene Konditionierung des Kulturmediums eine entscheidende Rolle spielt [Schroeter et al., 1998; Cancilla et al., 1993]. Zusätzlich zur Co-Kultur von Endothelzellen und Astrozyten ist auch der Einsatz von Neuronen [Duport et al., 1998] sowie Co-Kulturen mit Astrozyten und Perizyten in der Literatur belegt [Minakawa et al., 1991]. Zudem wird das konditionierte Medium von primären Endothelzellen als alleiniger Initiator des Zellwachstums von hämatopoetischen Vorläuferzellen beschreiben [Davis et al., 1997]. In einer weiteren Arbeit im Zusammenhang von konditioniertem Medium und der Co-Kultivierung von Zellen konnten Hirschi et al. [1999] zeigen, dass die Co-Kultur von Endothelzellen der Gehirnkapillaren mit mesenchymalen Zellen eine gegenseitige Proliferationsinhibierung bewirkte. Auch wird die Wirkung und Bedeutung von konditioniertem Medium im Zusammenhang mit hämatopoetischen Stammzellen, Makrophagen und

ihren Wachstumsfaktoren benannt [Gauwerky und Golde, 1983; Aye, 1977]. Diese Literaturdaten berücksichtigend, scheint die Konditionierung des osteogenen Differenzierungsmediums durch die Zellen auf den BMP-2-modifizierten Oberflächenabschnitten eine denkbare Erklärung für die schwache, aber dennoch detektierbare Differenzierung zu osteogenen Strukturen der Kontrollzellen zu sein.

4.4 Automatisierung und Miniaturisierung von Prozessen zur Zellkultivierung und Zelldifferenzierung

Die biomedizinische Anwendung von Stammzellen stellt hohe qualitative Ansprüche an die Zellkultivierung und Zellvermehrung. Einen wichtigen Aspekt im Bereich der Stammzellforschung ist deshalb in der Entwicklung von Medium und Kulturlösungen zu sehen [Terstegge und Burcin, 2004]. Darüber hinaus ist die Standardisierung der Zellkultur eine unabdingbare Voraussetzung für die Herstellung gewünschter Zellpopulationen für deren Einsatz in der Regenerativen Medizin und pharmazeutischen Industrie zur Forschung und Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze. Aus diesen genannten Gründen liegt ein Entwicklungsschwerpunkt der Stammzelltechnologie auf der Automatisierung von Zellkulturen, die sich an der konventionellen, manuell geprägten Zellkultur orientieren. Ein automatisierter Prozess, der möglichst wenige Interventionen durch die Anwender erforderlich macht, ist viel versprechend hinsichtlich der Reproduzierbarkeit und Standardisierung von Prozessen und deren einzelne Verfahrensschritten zur definierten und kontrollierten Kultivierung und Differenzierung von Stammzellen und anderen Zelllinien. Zudem ist die erfolgreiche computer- und robotergestützte Zellkultur Voraussetzung für den Einsatz von stammzellabgeleiteten Produkten in der Technologie des *High-Throughput-Screenings* der Pharmaindustrie. Solche Hochdurchsatzverfahren nutzen Substanzbibliotheken zur Untersuchung der in ihnen aufgeführten Verbindungen auf deren Effekt auf Zellkulturen und Zelllinien. Neben der Standardisierung für die kommerzielle Anwendung von Stammzellen ist auch die Verfügbarkeit von ausreichenden Zellzahlen erforderlich. Eine solche Maßstabsvergrößerung der Zellkultur kann durch den Einsatz von automatisierten Prozessen realisiert werden. Jedoch stößt ein solches parallelisiertes System bei der

Gewinnung von großen Zellzahlen auch an Grenzen. So ist die Kapazität solcher Kulturansätze bezüglich räumlicher und zeitlicher Auslastung limitiert. Zudem ist bei der Kultivierung von Zellen zu beachten, dass eine inhärente Varianz zwischen den einzelnen Zellansätzen auftreten kann. Weiterhin wird diese Variabilität durch Passagierungen fortgeführt. Darüber hinaus liegen selbst innerhalb einer Zellkulturschale an verschiedenen Positionen andere Mikroumgebungen und somit verschiedene Beeinflussungen der Zellen vor [Castilho und Medronho, 2002]. Für den Ansatz, bei dem möglichst großzügig zelluläres Ausgangsmaterial bereitgestellt werden soll, ist jedoch auch die Gewinnung von Zellen über die Bioreaktortechnologie denkbar. Dieser Ansatz erlaubt die Herstellung von spezifischen Zellpopulationen unter kontrollierten Umgebungsbedingungen und ist technisch herauf- und herunterregulierbar [Bullinger, 2006]. Der Einsatz von Mikrocarriern für die Zellkultivierung wird bereits bei embryonalen Stammzellen in Minispinner-Systemen angewendet [Fok und Zandstra, 2005; Gerecht-Nier et al., 2004]. Dabei ist auch zu bedenken, dass zunächst kleinere Zellzahlen für die *proof-of-concept*-Studien benötigt werden. Viele Arbeiten haben bisher schon einige Ansätze zur parallelisierten Testung von Zellfunktionen der zu untersuchenden Zellen in Microarray- und Durchflusssystemen vorgeschlagen [Domenech et al., 2009; Paguirigan und Beebe, 2008; Phillippi et al., 2008; Sato et al., 2008; Zhu et al., 2008; Millet et al., 2007; Flaim et al., 2005]. Terstegge et al. konnten die Kultivierung embryonaler Stammzellen in einem automatisierten System erfolgreich zeigen [2006, 2005, 2004]. Jedoch muss sich an dieser Stelle die Entwicklung zur Differenzierung von Stammzellen und anderen Zellen durch automatisierte Systeme anschließen. Hierbei bietet sich die Kultivierung von Zellen auf Zellcarriern an, die durch unterschiedliche Systeme, zum Beispiel Magnetismus, verschiedensten Testmodulen zugeführt werden können. Parallel kann so die Charakterisierung von neu isolierten Zellen und deren Differenzierungspotential ermittelt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde aus dieser Motivation heraus die Kultivierung und Differenzierung adulter Stammzellen sowohl mit gelöst vorliegenden als auch immobilisierten Wachstumsfaktoren von dem Standardlabormaßstab auf ein miniaturisiertes System erfolgreich übertragen. Hierbei konnten die gelösten und immobilisierten Biomoleküle die adipogene und osteogene Differenzierung der Stammzellen aus exokrinem Drüsengewebe und der Makrophagendifferenzierung aus Monozyten effektiv induzieren (Abbildung 34 bzw. Abbildung 35). Die für die Durchführung dieser

Experimente verwendeten Carrier wurden aus 1 mm x 2 mm großen, 170 µm dünnen Glasplättchen aufgebaut und können durch die Funktionalisierung mit verschiedenen Magnet- und Gleitschichten magnetisch manipuliert werden.

Zusätzlich wurde auch die Kultivierung und Differenzierung der glandulären humanen und murinen Stammzellen auf strukturierten Oberflächen in diese beiden Entwicklungsrichtungen untersucht. Die adipogene und osteogene Differenzierung konnte mittels gelöster Wachstumsfaktoren auch auf den Strukturierungen gezeigt werden. Die Zellen zeigten dabei ein anhand der Strukturen ein orientiertes Anhaften an der Oberfläche (Abbildung 36). Dieses verbesserte Adhäsionsverhalten von Zellen an strukturierten Oberflächen wird bereits in der Implantattechnologie durch den Einsatz von strukturierten Titanimplantaten genutzt. Weiterhin sind Anstrengungen in Richtung verbesserten Anhaftens von nicht gut adhäsiven Zelllinien und auch der Einsatz im Bereich der Zelltypselektion und Zellisolation denkbar. Ob dabei die Strukturen die Differenzierung der Stammzellen und anderer Zelllinien unterstützen und die Differenzierungseffizienz steigern können, ist Gegenstand der aktuellen Forschung und bedarf weiterführender Untersuchungen.

5 Zusammenfassung

Der Einsatz von adulten Stammzellen in der Regenerativen Medizin ist in den letzten Jahren enorm gestiegen. Um diesem Bedarf an zellulärem Material mit gleich bleibender Qualität gerecht werden zu können, müssen Stammzellen unter definierten und kontrollierten Kulturbedingungen auf die Integration in die geschädigte Architektur bei Regenerationsbedarf vorbereitet werden. Diese Standardisierung der Stammzellkultivierung und Stammzellendifferenzierung kann durch die Immobilisierung von Wachstumsfaktoren und anderen Signalmolekülen auf biokompatiblen Oberflächen erreicht werden. Hinsichtlich der Entwicklung eines Systems zur gezielten Zelldifferenzierung über immobilisierte Signalfaktoren wurde in der vorliegenden Arbeit die Differenzierung von Makrophagen als Modellsystem ausgewählt. Die aus Blutproben gesunder Spender isolierten Monozyten konnten sowohl über gelöstes als auch mittels immobilisiertem M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) auf aminosilansierten Glasoberflächen in reife Makrophagen differenziert werden. Durch ihr hohes Differenzierungs- und Proliferationspotential sind adulte Stammzellen besonders für den Einsatz in der Regenerationsmedizin geeignet und stehen aus diesem Grund im Fokus dieser Arbeit. Als Grundlage für die Differenzierung über die Festphase konnte die gezielte Differenzierung der humanen (CEsub2b) und murinen (MApan9i) adulten Stammzellen der Speicheldrüse bzw. des Pankreas in Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten erfolgreich mittels gelöster Wachstumsfaktoren gezeigt werden. In Vorbereitung auf die Stammzellendifferenzierung mittels bioaktiver Materialien wurden neutravidin-, aminosilan- und epoxysilanbeschichtete Glasoberflächen sowie Polystyren in Verbindung mit den korrespondierenden Kopplungsstrategien über Zellaktivitätstests als biokompatibel identifiziert. Die Langzeitkultivierung und Langzeitdifferenzierung der hier verwendeten Stammzellen konnte durch die Immobilisierung von geeigneten Wachstumsfaktoren erstmals in dieser Arbeit von der konventionellen Zellkulturtechnik mittels löslich im Medium vorliegenden Signalmolekülen auf die Festphase übertragen werden. Durch die Immobilisierung von IGF-1 (*insuline-like growth factor-1*) und BMP-2 (*bone morphogenic protein-2*) wurde die adipogene bzw. osteogene Differenzierung sowohl der humanen als auch der murinen glandulären Stammzellen erfolgreich über die Festphase gezeigt.

Die Standardisierung in der Zellkulturtechnik kann weiterhin über die Prozessautomatisierung und Prozessparallelisierung unterstützt werden. Dabei ist die Zellkultivierung und Zelldifferenzierung auf Carriersystemen denkbar, die durch magnetische Manipulation parallel verschiedensten Analyse- und Differenzierungsmodulen zugeführt werden können. In einem ersten Schritt zur Entwicklung eines solchen automatisierten Systems wurde die Übertragung der gezielten Stammzelldifferenzierung sowohl über lösliche als auch immobilisierte Signalfaktoren von der Laborstandardgröße auf ein miniaturisiertes Zellkultursystem erfolgreich transferiert.

Insbesondere die Immobilisierung von Signalmolekülen in Form von Gradienten und Konzentrationsgefällen ermöglicht die Nachahmung der natürlichen und physiologischen Mikroumgebung von Stammzellen, so genannten Nischen. In diesen artifiziellen Umgebungen kann das Verhalten von Stammzellen während der Kultivierung und Differenzierung studiert werden und bietet zudem die Chance weiterführende Erkenntnisse des Stammzellverhaltens zu gewinnen. Als ein weiteres Ergebnis in der vorliegenden Arbeit konnte eine konzentrationsabhängige Osteoblastendifferenzierung der humanen und murinen Stammzellen beobachtet werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen Chancen auf, das Verständnis der Stammzellbiologie zu erweitern. Sollte sich die gezielte Differenzierung von Stammzellen und anderen Vorläuferzellen über gelöste oder immobilisierte Signalfaktoren durch weitere *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen bestätigen und somit für den Einsatz im Tissue Engineering und der Regenerativen Medizin als geeignet erweisen, wäre ein weiterer Schritt zur Entwicklung erfolgreicher Therapieansätze für die Behandlung von Erkrankungen getan.

6 Summary

The application of adult stem cells in the field of regenerative medicine has increased dramatically during the past years. To guarantee constant quality of cellular material and to prepare stem cells for the integration in damaged areas, these cells should be produced under defined and controlled conditions. In this study the standardization of stem cell cultivation and differentiation was realized through immobilization of growth factors and other signaling molecules onto biocompatible surfaces. As the main aspect in this work the long-term cultivation and differentiation of adult stem cells was transferred from differentiation via soluble signaling molecules to differentiation using immobilized growth factors.

In this thesis the established differentiation of macrophages was chosen to develop a system for directed differentiation of stem cells via immobilized signal factors. For the macrophages differentiation monocytes were isolated from human blood and could be differentiated successfully with soluble as well as by immobilized M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) on aminosilanized glass surfaces. As stem cells have a high potential to proliferate and differentiate, they are very suitable for the tissue engineering and are focused on in this study. For the development of a differentiation system using immobilized factors to induce cell differentiation the direct differentiation of human (CEsub2b) and mouse (MApan9i) adult stem cells from exocrine glands were investigated by soluble molecules. These cells could be differentiated by soluble growth factors into adipocytes, chondrocytes and osteoblasts. As a basic requirement for the surface-induced differentiation of stem cells neutravidin-, aminosilanized and epoxysilanized coated, as well as polystyren surfaces with the corresponding coupling strategies were identified as biocompatible via cell viability and toxicity tests. In this work the long-term cultivation and differentiation of adult stem cells was transferred from the conventional way of differentiation using soluble signaling molecules to the surface-induced differentiation. Via immobilized IGF-1 (*insuline-like growth factor-1*) and BMP-2 (*bone morphogenic protein-2*) the human as well as the mouse stem cells were differentiated in the adipogene and osteogene direction for the first time in this study. The immobilization of signaling molecules further provide the possibility to mimic the physiological and cellular surrounding environment of stem cells. This technique offers

the chance to elucidate the behavior of stem cells during cultivation and differentiation in a more detailed manner. New findings was used for further development of continuative therapies.

The standardization of cell culture techniques could further support the automation and parallelization of cell culture processes. Therefore, the cultivation and differentiation of cells onto carrier sytems was investigated. These transfer cells through magnetic manipulation to different analyzing tools. One of the first steps of developing such a system is the directed differentiation of stem cells and progenitor cells by soluble, as well as by immobilized growth factors. This was successfully transferred from standard laboratory size to a miniaturized cell culture system.

The related results from this thesis showed possibilities for the identification of other aspects in understanding the stem cell biology in a more detailed manner. The directed differentiation of human and mouse stem cells and other progenitor cells via soluble, as well as through immobilized growth and signaling factors should be further investigated by *in vitro* and *in vivo* analysis. If the *in vivo* analysis show stable differentiation, these cells would qualify for the application in tissue engineering and respectively in regenerative medicine. Thus, a further step in the direction of therapy development would be achieved.

7 Literatur

Alberti, K.; Davey, R. E.; Onishi, K.; George, S.; Salchert, K.; Seib, F. P.; Bornhäuser, M.; Pompe, T.; Nagy, A.; Werner, C. & Zandstra, P. W. (2008), 'Functional immobilization of signaling proteins enables control of stem cell fate.', *Nat Methods* **5**(7), 645--650.

Altiock, S.; Xu, M. & Spiegelman, B. M. (1997), 'PPARgamma induces cell cycle withdrawal: inhibition of E2F/DP DNA-binding activity via down-regulation of PP2A.', *Genes Dev* **11**(15), 1987--1998.

Amit, M.; Margulets, V.; Segev, H.; Shariki, K.; Laevsky, I.; Coleman, R. & Itskovitz-Eldor, J. (2003), 'Human feeder layers for human embryonic stem cells.', *Biol Reprod* **68**(6), 2150--2156.

Andereya, S.; Maus, U.; Gavenis, K.; Gravius, S.; Stanzel, S.; Müller-Rath, R.; Miltner, O.; Mumme, T. & Schneider, U. (2007), '[Treatment of patellofemoral cartilage defects utilizing a 3D collagen gel: two-year clinical results]', *Z Orthop Unfall* **145**(2), 139--145.

Anderson, D. G.; Levenberg, S. & Langer, R. (2004), 'Nanoliter-scale synthesis of arrayed biomaterials and application to human embryonic stem cells.', *Nat Biotechnol* **22**(7), 863--866.

Anderson, J. M. (31/2001), 'Biological Responses to Materials.', *Annual Review of Materials Research, Annual Reviews*, 81--110, ISSN: 1531-7331

Baksh, D.; Song, L. & Tuan, R. S. (2004), 'Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy.', *J Cell Mol Med* **8**(3), 301--316.

Barry, F.; Boynton, R. E.; Liu, B. & Murphy, J. M. (2001), 'Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components.', *Exp Cell Res* **268**(2), 189--200.

Barry, F. P. (2003), 'Biology and clinical applications of mesenchymal stem cells.', *Birth Defects Res C Embryo Today* **69**(3), 250--256.

Barry, F. P. & Murphy, J. M. (2004), 'Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization.', *Int J Biochem Cell Biol* **36**(4), 568--584.

Bayes-Genis, A.; Conover, C. A. & Schwartz, R. S. (2000), 'The insulin-like growth factor axis: A review of atherosclerosis and restenosis.', *Circ Res* **86**(2), 125--130.

- Benvenuti, S.; Saccardi, R.; Luciani, P.; Urbani, S.; Deledda, C.; Cellai, I.; Francini, F.; Squecco, R.; Rosati, F.; Danza, G.; Gelmini, S.; Greeve, I.; Rossi, M.; Maggi, R.; Serio, M. & Peri, A. (2006), 'Neuronal differentiation of human mesenchymal stem cells: changes in the expression of the Alzheimer's disease-related gene seladin-1.', *Exp Cell Res* **312**(13), 2592--2604.
- Beresford, J. N. (1989), 'Osteogenic stem cells and the stromal system of bone and marrow.', *Clin Orthop Relat Res*(240), 270--280.
- Berger, M. G.; Berger, J.; Richard, C.; Jeanpierre, S.; Nicolini, F. E.; Tournilhac, O.; Michallet, M.; Maguer-Satta, V. & Satta, V. M. (2008), 'Preferential sensitivity of hematopoietic (HPs) and mesenchymal (MPs) progenitors to fludarabine suggests impaired bone marrow niche and HP mobilization.', *Leukemia* **22**(11), 2131--2134.
- Berre, V. L.; Trévisiol, E.; Dagkessamanskaia, A.; Sokol, S.; Caminade, A.-M.; Majoral, J. P.; Meunier, B. & François, J. (2003), 'Dendrimeric coating of glass slides for sensitive DNA microarrays analysis.', *Nucleic Acids Res* **31**(16), e88.
- Bianco, P.; Riminucci, M.; Gronthos, S. & Robey, P. G. (2001), 'Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications.', *Stem Cells* **19**(3), 180--192.
- Bianco, P. & Robey, P. G. (2001), 'Stem cells in tissue engineering.', *Nature* **414**(6859), 118--121.
- Billings, E., Jr. Und May, J. W., Jr. (1989), 'Histological review and present status of free fat graft autotransplantation in plastic and reconstructive surgery.', *Plast Reconstr Surg*. **82**(2), 368—381.
- Bosnakovski, D.; Mizuno, M.; Kim, G.; Ishiguro, T.; Okumura, M.; Iwanaga, T.; Kadosawa, T. & Fujinaga, T. (2004), 'Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells in pellet cultural system.', *Exp Hematol* **32**(5), 502--509.
- Boyne, P. J.; Marx, R. E.; Nevins, M.; Triplett, G.; Lazaro, E.; Lilly, L. C.; Alder, M. & Nummikoski, P. (1997), 'A feasibility study evaluating rhBMP-2/absorbable collagen sponge for maxillary sinus floor augmentation.', *Int J Periodontics Restorative Dent* **17**(1), 11--25.
- Bowlin, G. L.; Wnek, G. (2004), 'Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering.', *Marcel Decker, New York und Oxford*, ISBN: 0-82-475562-6.
- Bray, D.; Levin, M. D. & Morton-Firth, C. J. (1998), 'Receptor clustering as a cellular mechanism to control sensitivity.', *Nature* **393**(6680), 85--88.
- Brazelton, T. R.; Rossi, F. M.; Keshet, G. I. & Blau, H. M. (2000), 'From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice.', *Science* **290**(5497), 1775--1779.

Brose, C.; Schmitt, D.; von Briesen, H. & Reimann, M. (2009), 'Directed differentiation of pancreatic stem cells by soluble and immobilised signalling factors.', *Ann Anat* **191**(1), 83--93.

Bruder, S. P.; Kurth, A. A.; Shea, M.; Hayes, W. C.; Jaiswal, N. & Kadiyala, S. (1998), 'Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells.', *J Orthop Res* **16**(2), 155--162.

Brugger, W.; Kreutz, M. & Andreesen, R. (1991), 'Macrophage colony-stimulating factor is required for human monocyte survival and acts as a cofactor for their terminal differentiation to macrophages in vitro.', *J Leukoc Biol* **49**(5), 483--488.

Cancilla, P. A.; Bready, J.; Berliner, J. (1993), 'Brain endothelial-astrocyte interactions.', *The Blood-Brai-Barrier (Pardridge WM, eds), New York, Raven Press, 25--46*

Caplan, A. I. (1994), 'The mesengenic process.', *Clin Plast Surg* **21**(3), 429--435.

Caplan, A. I. (1991), 'Mesenchymal stem cells.', *J Orthop Res* **9**(5), 641--650.

Cassiede, P.; Dennis, J. E.; Ma, F. & Caplan, A. I. (1996), 'Osteochondrogenic potential of marrow mesenchymal progenitor cells exposed to TGF-beta 1 or PDGF-BB as assayed in vivo and in vitro.', *J Bone Miner Res* **11**(9), 1264--1273.

Cebotari, S.; Lichtenberg, A.; Tudorache, I.; Hilfiker, A.; Mertsching, H.; Leyh, R.; Breyman, T.; Kallenbach, K.; Maniuc, L.; Batrinac, A.; Repin, O.; Maliga, O.; Ciubotaru, A. & Haverich, A. (2006), 'Clinical application of tissue engineered human heart valves using autologous progenitor cells.', *Circulation* **114**(1 Suppl), I132--I137.

Cecchini, M. G.; Dominguez, M. G.; Mocci, S.; Wetterwald, A.; Felix, R.; Fleisch, H.; Chisholm, O.; Hofstetter, W.; Pollard, J. W. & Stanley, E. R. (1994), 'Role of colony stimulating factor-1 in the establishment and regulation of tissue macrophages during postnatal development of the mouse.', *Development* **120**(6), 1357--1372.

Cetinkaya, G.; Türko?lu, H.; Arat, S.; Odaman, H.; Onur, M. A.; Gümü?derelio?lu, M. & Tümer, A. (2007), 'LIF-immobilized nonwoven polyester fabrics for cultivation of murine embryonic stem cells.', *J Biomed Mater Res A* **81**(4), 911--919.

Chagues, J. C. et al. (2007), 'Myocardial assistance by grafting a new bioartificial upgraded myocardium (MAGNUM clinical trial): one year follow-up.' *Cell Transplantation* **16**(9), 927--934.

Chen, D.; Zhao, M. & Mundy, G. R. (2004), 'Bone morphogenetic proteins.', *Growth Factors* **22**(4), 233--241.

Chen, G. & Ito, Y. (2001), 'Gradient micropattern immobilization of EGF to investigate the effect of artificial juxtacrine stimulation.', *Biomaterials* **22**(18), 2453--2457.

Chen, P.-R.; Chen, M.-H.; Lin, F.-H. & Su, W.-Y. (2005), 'Release characteristics and bioactivity of gelatin-tricalcium phosphate membranes covalently immobilized with nerve growth factors.', *Biomaterials* **26**(33), 6579--6587.

Liang Chen, S.; Wang Fang, W.; Ye, F.; Liu, Y.-H.; Qian, J.; Jie Shan, S.; Jie Zhang, J.; Chunhua, R. Z.; Ming Liao, L.; Lin, S. & Ping Sun, J. (2004), 'Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction.', *Am J Cardiol* **94**(1), 92--95.

Chiu, R. C.-J. (2003), 'Bone-marrow stem cells as a source for cell therapy.', *Heart Fail Rev* **8**(3), 247--251.

Chiu, R. C.-J. (2003), 'Adult stem cell therapy for heart failure.', *Expert Opin Biol Ther* **3**(2), 215--225.

Choi, Y.; Ta, M.; Atouf, F. & Lumelsky, N. (2004), 'Adult pancreas generates multipotent stem cells and pancreatic and nonpancreatic progeny.', *Stem Cells* **22**(6), 1070--1084.

Colter, D. C.; Sekiya, I. & Prockop, D. J. (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.

Conrad, C. & Huss, R. (2005), 'Adult stem cell lines in regenerative medicine and reconstructive surgery.', *J Surg Res* **124**(2), 201--208.

Conrad, S.; Renninger, M.; Hennenlotter, J.; Wiesner, T.; Just, L.; Bonin, M.; Aicher, W.; Bühring, H.-J.; Mattheus, U.; Mack, A.; Wagner, H.-J.; Minger, S.; Matzkies, M.; Reppel, M.; Hescheler, J.; Sievert, K.-D.; Stenzl, A. & Skutella, T. (2008), 'Generation of pluripotent stem cells from adult human testis.', *Nature* **456**(7220), 344--349.

Crawford, K.; Gabuzda, D.; Pantazopoulos, V.; Xu, J.; Clement, C.; Reinherz, E. & Alper, C. A. (1999), 'Circulating CD2+ monocytes are dendritic cells.', *J Immunol* **163**(11), 5920--5928.

Cuatrecasas, P. (1969), 'Interaction of insulin with the cell membrane: the primary action of insulin.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **63**(2), 450--457.

Curran, J. M.; Chen, R. & Hunt, J. A. (2005), 'Controlling the phenotype and function of mesenchymal stem cells in vitro by adhesion to silane-modified clean glass surfaces.', *Biomaterials* **26**(34), 7057--7067.

Czerniecki, B. J.; Carter, C.; Rivoltini, L.; Koski, G. K.; Kim, H. I.; Weng, D. E.; Roros, J. G.; Hijazi, Y. M.; Xu, S.; Rosenberg, S. A. & Cohen, P. A. (1997), 'Calcium ionophore-treated peripheral blood monocytes and dendritic cells rapidly display characteristics of activated dendritic cells.', *J Immunol* **159**(8), 3823--3837.

Danner, S.; Kajahn, J.; Geismann, C.; Klink, E. & Kruse, C. (2007), 'Derivation of oocyte-like cells from a clonal pancreatic stem cell line.', *Mol Hum Reprod* **13**(1), 11--20.

Davis, T. A.; Black, A. T.; Kidwell, W. R. & Lee, K. P. (1997), 'Conditioned medium from primary porcine endothelial cells alone promotes the growth of primitive human haematopoietic progenitor cells with a high replating potential: evidence for a novel early haematopoietic activity.', *Cytokine* **9**(4), 263--275.

Deb, A.; Wang, S.; Skelding, K. A.; Miller, D.; Simper, D. & Caplice, N. M. (2003), 'Bone marrow-derived cardiomyocytes are present in adult human heart: A study of gender-mismatched bone marrow transplantation patients.', *Circulation* **107**(9), 1247--1249.

Dennis, J. E. & Caplan, A. I. (1996), 'Analysis of the developmental potential of conditionally immortal marrow-derived mesenchymal progenitor cells isolated from the H-2Kb-tsA58 transgenic mouse.', *Connect Tissue Res* **35**(1-4), 93--99.

Denny, P. C.; Ball, W. D. & Redman, R. S. (1997), 'Salivary glands: a paradigm for diversity of gland development.', *Crit Rev Oral Biol Med* **8**(1), 51--75.

Desbaillets, I.; Ziegler, U.; Groscurth, P. & Gassmann, M. (2000), 'Embryoid bodies: an in vitro model of mouse embryogenesis.', *Exp Physiol* **85**(6), 645--651.

Doetschman, T. C.; Eistetter, H.; Katz, M.; Schmidt, W. & Kemler, R. (1985), 'The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium.', *J Embryol Exp Morphol* **87**, 27--45.

Domenech, M.; Yu, H.; Warrick, J.; Badders, N. M.; Meyvantsson, I.; Alexander, C. M.; Beebe, D. J. (2009), 'Cellular observations enable by microculture: paracrine signaling and population demographics.', *Integr. Biol.* DOI; 10.1039/b823059e.

Drueckes, P.; Schinzel, R. & Palm, D. (1995), 'Photometric microtiter assay of inorganic phosphate in the presence of acid-labile organic phosphates.', *Anal Biochem* **230**(1), 173--177.

Duport, S.; Robert, F.; Muller, D.; Grau, G.; Parisi, L. & Stoppini, L. (1998), 'An in vitro blood-brain barrier model: cocultures between endothelial cells and organotypic brain slice cultures.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(4), 1840--1845.

Dustin, M. L. & Chan, A. C. (2000), 'Signaling takes shape in the immune system.', *Cell* **103**(2), 283--294.

Eisenberg, L. M. & Eisenberg, C. A. (2004), 'Adult stem cells and their cardiac potential.', *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* **276**(1), 103--112.

F, D. L.; Barnes, K. M.; Uyeda, J. A.; De-Levi, S.; Abad, V.; Palese, T.; Mericq, V. & Baron, J. (2001), 'Regulation of growth plate chondrogenesis by bone morphogenetic protein-2.', *Endocrinology* **142**(1), 430--436.

Fan, H.; Hu, Y.; Qin, L.; Li, X.; Wu, H. & Lv, R. (2006), 'Porous gelatin-chondroitin-hyaluronate tri-copolymer scaffold containing microspheres loaded with TGF-beta1 induces differentiation of mesenchymal stem cells in vivo for enhancing cartilage repair.', *J Biomed Mater Res A* **77**(4), 785--794.

Fell, H. B. (1925) *Morphol Physiol* **40**, 417—459.

Ferrari, G.; Angelis, G. C.-D.; Coletta, M.; Paolucci, E.; Stornaiuolo, A.; Cossu, G. & Mavilio, F. (1998), 'Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors.', *Science* **279**(5356), 1528--1530.

Finnin, M.; Hamilton, J. A. & Moss, S. T. (1999), 'Characterization of a CSF-induced proliferating subpopulation of human peripheral blood monocytes by surface marker expression and cytokine production.', *J Leukoc Biol* **66**(6), 953--960.

Fischer, U.; Hempel, U.; Becker, D.; Bierbaum, S.; Scharnweber, D.; Worch, H. & Wenzel, K.-W. (2003), 'Transforming growth factor beta1 immobilized adsorptively on Ti6Al4V and collagen type I coated Ti6Al4V maintains its biological activity.', *Biomaterials* **24**(15), 2631--2641.

Flaim, C. J.; Chien, S. & Bhatia, S. N. (2005), 'An extracellular matrix microarray for probing cellular differentiation.', *Nat Methods* **2**(2), 119--125.

van der Flier, A. & Sonnenberg, A. (2001), 'Function and interactions of integrins.', *Cell Tissue Res* **305**(3), 285--298.

Florini, J. R. & Magri, K. A. (1989), 'Effects of growth factors on myogenic differentiation.', *Am J Physiol* **256**(4 Pt 1), C701--C711.

Fortier, L. A.; Nixon, A. J. & Lust, G. (2002), 'Phenotypic expression of equine articular chondrocytes grown in three-dimensional cultures supplemented with supraphysiologic concentrations of insulin-like growth factor-1.', *Am J Vet Res* **63**(2), 301--305.

- Fouillard, L.; Bensidhoum, M.; Bories, D.; Bonte, H.; Lopez, M.; Moseley, A.-M.; Smith, A.; Lesage, S.; Beaujean, F.; Thierry, D.; Gourmelon, P.; Najman, A. & Gorin, N.-C. (2003), 'Engraftment of allogeneic mesenchymal stem cells in the bone marrow of a patient with severe idiopathic aplastic anemia improves stroma.', *Leukemia* **17**(2), 474--476.
- Francis-West, P. H.; Tatla, T. & Brickell, P. M. (1994), 'Expression patterns of the bone morphogenetic protein genes Bmp-4 and Bmp-2 in the developing chick face suggest a role in outgrowth of the primordia.', *Dev Dyn* **201**(2), 168--178.
- Frankenberger, M.; Pechumer, H. & Ziegler-Heitbrock, H. W. (1995), 'Interleukin-10 is upregulated in LPS tolerance.', *J Inflamm* **45**(1), 56--63.
- Frankenberger, M.; Sternsdorf, T.; Pechumer, H.; Pforte, A. & Ziegler-Heitbrock, H. W. (1996), 'Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: a polymerase chain reaction analysis.', *Blood* **87**(1), 373--377.
- French, M. M.; Rose, S.; Canseco, J. & Athanasiou, K. A. (2004), 'Chondrogenic differentiation of adult dermal fibroblasts.', *Ann Biomed Eng* **32**(1), 50--56.
- Friedenstein, A. J.; Piatetzky-Shapiro, I. I. & Petrakova, K. V. (1966), 'Osteogenesis in transplants of bone marrow cells.', *J Embryol Exp Morphol* **16**(3), 381--390.
- Fuchs, J. R.; Pomerantseva, I.; Ochoa, E. R.; Vacanti, J. P. & Fauza, D. O. (2003), 'Fetal tissue engineering: in vitro analysis of muscle constructs.', *J Pediatr Surg* **38**(9), 1348--1353.
- Gangji, V.; Hauzeur, J.-P.; Matos, C.; Maertelaer, V. D.; Toungouz, M. & Lambermont, M. (2004), 'Treatment of osteonecrosis of the femoral head with implantation of autologous bone-marrow cells. A pilot study.', *J Bone Joint Surg Am* **86-A**(6), 1153--1160.
- Gauwerky, Ch. E. und Golde, D. W. (1983), 'Hämatopoetische Stammzellen und ihre Wachstumsfaktoren.', *Klin Wochenschr* **61**, 975--981
- Gerber, I. & ap Gwynn, I. (2002), 'Differentiation of rat osteoblast-like cells in monolayer and micromass cultures.', *Eur Cell Mater* **3**, 19--30.
- Germain, R. N. (1997), 'T-cell signaling: the importance of receptor clustering.', *Curr Biol* **7**(10), R640--R644.
- Gimble, J. & Guilak, F. (2003), 'Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential.', *Cytotherapy* **5**(5), 362--369.

Gimble, J. M.; Youkhana, K.; Hua, X.; Bass, H.; Medina, K.; Sullivan, M.; Greenberger, J. & Wang, C. S. (1992), 'Adipogenesis in a myeloid supporting bone marrow stromal cell line.', *J Cell Biochem* **50**(1), 73--82.

Goessler, U. R.; Bugert, P.; Bieback, K.; Deml, M.; Sadick, H.; Hormann, K. & Riedel, F. (2005), 'In-vitro analysis of the expression of TGFbeta -superfamily-members during chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and chondrocytes during dedifferentiation in cell culture.', *Cell Mol Biol Lett* **10**(2), 345--362.

Goldyne, M. E. & Stobo, J. D. (1979), 'Synthesis of prostaglandins by subpopulations of human peripheral blood monocytes.', *Prostaglandins* **18**(5), 687--695.

Gomez, N.; Lu, Y.; Chen, S. & Schmidt, C. E. (2007), 'Immobilized nerve growth factor and microtopography have distinct effects on polarization versus axon elongation in hippocampal cells in culture.', *Biomaterials* **28**(2), 271--284.

Gomez, N. & Schmidt, C. E. (2007), 'Nerve growth factor-immobilized polypyrrole: bioactive electrically conducting polymer for enhanced neurite extension.', *J Biomed Mater Res A* **81**(1), 135--149.

Gorjup, E.; Danner, S.; Rotter, N.; Habermann, J.; Brassat, U.; Brummendorf, T. H.; Wien, S. L.; Meyerhans, A.; Wollenberg, B.; Kruse, C.; von Briesen H. (2009), 'Glandular tissue from human pancreas and salivary gland yields similar stem cell populations.', akzeptiert bei *European Journal of Cell Biology*

Govender, S.; Csimma, C.; Genant, H. K.; Valentin-Opran, A.; Amit, Y.; Arbel, R.; Aro, H.; Atar, D.; Bishay, M.; Börner, M. G.; Chiron, P.; Choong, P.; Cinats, J.; Courtenay, B.; Feibel, R.; Geulette, B.; Gravel, C.; Haas, N.; Raschke, M.; Hammacher, E.; van der Velde, D.; Hardy, P.; Holt, M.; Josten, C.; Ketterl, R. L.; Lindeque, B.; Lob, G.; Mathevon, H.; McCoy, G.; Marsh, D.; Miller, R.; Munting, E.; Oevre, S.; Nordsletten, L.; Patel, A.; Pohl, A.; Rennie, W.; Reynders, P.; Rommens, P. M.; Rondia, J.; Rossouw, W. C.; Daneel, P. J.; Ruff, S.; Rüter, A.; Santavirta, S.; Schildhauer, T. A.; Gekle, C.; Schnettler, R.; Segal, D.; Seiler, H.; Snowdowne, R. B.; Stapert, J.; Taglang, G.; Verdonk, R.; Vogels, L.; Weckbach, A.; Wentzensen, A.; Wisniewski, T. & in Surgery for Tibial Trauma (BESTT) Study Group, B. M. P.-2. E. (2002), 'Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients.', *J Bone Joint Surg Am* **84-A**(12), 2123--2134.

Green, H. & Kehinde, O. (1975), 'An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion.', *Cell* **5**(1), 19--27.

-
- Greenberg, A. S.; Egan, J. J.; Wek, S. A.; Garty, N. B.; Blanchette-Mackie, E. J. & Londos, C. (1991), 'Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets.', *J Biol Chem* **266**(17), 11341--11346.
- Greenberg, A. S.; Egan, J. J.; Wek, S. A.; Moos, M. C.; Londos, C. & Kimmel, A. R. (1993), 'Isolation of cDNAs for perilipins A and B: sequence and expression of lipid droplet-associated proteins of adipocytes.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(24), 12035--12039.
- Gregoire, F. M.; Smas, C. M. & Sul, H. S. (1998), 'Understanding adipocyte differentiation.', *Physiol Rev* **78**(3), 783--809.
- Griffith, L. G. & Naughton, G. (2002), 'Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities.', *Science* **295**(5557), 1009--1014.
- Grimberg, A. & Cohen, P. (2000), 'Role of insulin-like growth factors and their binding proteins in growth control and carcinogenesis.', *J Cell Physiol* **183**(1), 1--9.
- Grove, J. E.; Bruscia, E. & Krause, D. S. (2004), 'Plasticity of bone marrow-derived stem cells.', *Stem Cells* **22**(4), 487--500.
- Guan, K.; Nayernia, K.; Maier, L. S.; Wagner, S.; Dressel, R.; Lee, J. H.; Nolte, J.; Wolf, F.; Li, M.; Engel, W. & Hasenfuss, G. (2006), 'Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis.', *Nature* **440**(7088), 1199--1203.
- Guan, K.; Wagner, S.; Unsöld, B.; Maier, L. S.; Kaiser, D.; Hemmerlein, B.; Nayernia, K.; Engel, W. & Hasenfuss, G. (2007), 'Generation of functional cardiomyocytes from adult mouse spermatogonial stem cells.', *Circ Res* **100**(11), 1615--1625.
- Guldner, N. W.; Kajahn, J.; Klinger, M.; Sievers, H.-H. & Kruse, C. (2006), 'Autonomously contracting human cardiomyocytes generated from adult pancreatic stem cells and enhanced in co-cultures with myocardial biopsies.', *Int J Artif Organs* **29**(12), 1158--1166.
- Guo, L.; Kawazoe, N.; Fan, Y.; Ito, Y.; Tanaka, J.; Tateishi, T.; Zhang, X. & Chen, G. (2008), 'Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on photoreactive polymer-modified surfaces.', *Biomaterials* **29**(1), 23--32.
- Guo, L.; Kawazoe, N.; Hoshihara, T.; Tateishi, T.; Chen, G. & Zhang, X. (2008), 'Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on chargeable polymer-modified surfaces.', *J Biomed Mater Res A* **87**(4), 903--912.
-

Hall, B. K. & Miyake, T. (2000), 'All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development.', *Bioessays* **22**(2), 138--147.

Harris, M. T.; Butler, D. L.; Boivin, G. P.; Florer, J. B.; Schantz, E. J. & Wenstrup, R. J. (2004), 'Mesenchymal stem cells used for rabbit tendon repair can form ectopic bone and express alkaline phosphatase activity in constructs.', *J Orthop Res* **22**(5), 998--1003.

Hashimoto, S.; Yamada, M.; Motoyoshi, K. & Akagawa, K. S. (1997), 'Enhancement of macrophage colony-stimulating factor-induced growth and differentiation of human monocytes by interleukin-10.', *Blood* **89**(1), 315--321.

Havemann, K.; Pujol, B. F. & Adamkiewicz, J. (2003), 'In vitro transformation of monocytes and dendritic cells into endothelial like cells.', *Adv Exp Med Biol* **522**, 47--57.

Hench, L. L. (1980), 'Biomaterials.', *Science* **208**(4446), 826--831.

Heng, B. C.; Cao, T. & Lee, E. H. (2004), 'Directing stem cell differentiation into the chondrogenic lineage in vitro.', *Stem Cells* **22**(7), 1152--1167.

Hersel, U.; Dahmen, C. & Kessler, H. (2003), 'RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond.', *Biomaterials* **24**(24), 4385--4415.

Hirschi, K. K.; Rohovsky, S. A.; Beck, L. H.; Smith, S. R. & D'Amore, P. A. (1999), 'Endothelial cells modulate the proliferation of mural cell precursors via platelet-derived growth factor-BB and heterotypic cell contact.', *Circ Res* **84**(3), 298--305.

Hoffman, R. M. (2006), 'The pluripotency of hair follicle stem cells.', *Cell Cycle* **5**(3), 232--233.

Hoffmann, A. & Gross, G. (2001), 'BMP signaling pathways in cartilage and bone formation.', *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **11**(1-3), 23--45.

Hogan, B. L. (1996), 'Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development.', *Genes Dev* **10**(13), 1580--1594.

Horwitz, E. M.; Gordon, P. L.; Koo, W. K. K.; Marx, J. C.; Neel, M. D.; McNall, R. Y.; Muul, L. & Hofmann, T. (2002), 'Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(13), 8932--8937.

Hubbell, J. A. (2003), 'Materials as morphogenetic guides in tissue engineering.', *Curr Opin Biotechnol* **14**(5), 551--558.

Hyun, I.; Hochedlinger, K.; Jaenisch, R. & Yamanaka, S. (2007), 'New advances in iPS cell research do not obviate the need for human embryonic stem cells.', *Cell Stem Cell* 1(4), 367--368.

Ichinose, J.; Morimatsu, M.; Yanagida, T. & Sako, Y. (2006), 'Covalent immobilization of epidermal growth factor molecules for single-molecule imaging analysis of intracellular signaling.', *Biomaterials* 27(18), 3343--3350.

Ito, Y. (2008), 'Covalently immobilized biosignal molecule materials for tissue engineering.', *Soft Matter* 4, 46--56

Ito, Y. (1999), 'Surface micropatterning to regulate cell functions.', *Biomaterials* 20(23-24), 2333--2342.

Ito, Y.; Chen, G. & Imanishi, Y. (1998), 'Micropatterned immobilization of epidermal growth factor to regulate cell function.', *Bioconjug Chem* 9(2), 277--282.

Ito, Y.; Chen, G. & Imanishi, Y. (1996), 'Photoimmobilization of insulin onto polystyrene dishes for protein-free cell culture.', *Biotechnol Prog* 12(5), 700--702.

Ito, Y.; Chen, G.; Imanishi, Y.; Morooka, T.; Nishida, E.; Okabayashi, Y. & Kasuga, M. (2001), 'Differential control of cellular gene expression by diffusible and non-diffusible EGF.', *J Biochem* 129(5), 733--737.

Ito, Y.; Hasuda, H.; Terai, H. & Kitajima, T. (2005), 'Culture of human umbilical vein endothelial cells on immobilized vascular endothelial growth factor.', *J Biomed Mater Res A* 74(4), 659--665.

Ito, Y.; Kondo, S.; Chen, G. & Imanishi, Y. (1997), 'Patterned artificial juxtacrine stimulation of cells by covalently immobilized insulin.', *FEBS Lett* 403(2), 159--162.

Ito, Y.; Li, J. S.; Takahashi, T.; Imanishi, Y.; Okabayashi, Y.; Kido, Y. & Kasuga, M. (1997), 'Enhancement of the mitogenic effect by artificial juxtacrine stimulation using immobilized EGF.', *J Biochem* 121(3), 514--520.

Ito, Y.; Zheng, J. & Imanishi, Y. (1995), 'Serum-free cell culture on insulin-immobilized porous collagen beads.', *Biotechnol Bioeng* 45(2), 144--148.

Ito, Y.; Liu, S. Q. & Imanishi, Y. (1991), 'Enhancement of cell growth on growth factor-immobilized polymer film.', *Biomaterials* 12(5), 449--453.

Ito, Y.; Liu, S. Q.; Nakabayashi, M. & Imanishi, Y. (1992), 'Cell growth on immobilized cell-growth factor. II. Adhesion and growth of fibroblast cells on poly(methyl methacrylate) membrane immobilized with proteins of various kinds.', *Biomaterials* 13(11), 789--794.

- Ito, Y.; Zheng, J.; Imanishi, Y.; Yonezawa, K. & Kasuga, M. (1996), 'Protein-free cell culture on an artificial substrate with covalently immobilized insulin.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(8), 3598--3601.
- Izumi, M.; Fujio, Y.; Kunisada, K.; Negoro, S.; Tone, E.; Funamoto, M.; Osugi, T.; Oshima, Y.; Nakaoka, Y.; Kishimoto, T.; Yamauchi-Takahara, K. & Hirota, H. (2001), 'Bone morphogenetic protein-2 inhibits serum deprivation-induced apoptosis of neonatal cardiac myocytes through activation of the Smad1 pathway.', *J Biol Chem* **276**(33), 31133--31141.
- Jaiswal, N.; Haynesworth, S. E.; Caplan, A. I. & Bruder, S. P. (1997), 'Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro.', *J Cell Biochem* **64**(2), 295--312.
- Jaiswal, R. K.; Jaiswal, N.; Bruder, S. P.; Mbalaviele, G.; Marshak, D. R. & Pittenger, M. F. (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.
- Janderová, L.; McNeil, M.; Murrell, A. N.; Mynatt, R. L. & Smith, S. R. (2003), 'Human mesenchymal stem cells as an in vitro model for human adipogenesis.', *Obes Res* **11**(1), 65--74.
- Jennissen, H. P. (2000), 'Verträglichkeit groß geschrieben.', *Essener Unikate* **13**, 78—93.
- Jiang, Y.; Jahagirdar, B. N.; Reinhardt, R. L.; Schwartz, R. E.; Keene, C. D.; Ortiz-Gonzalez, X. R.; Reyes, M.; Lenvik, T.; Lund, T.; Blackstad, M.; Du, J.; Aldrich, S.; Lisberg, A.; Low, W. C.; Largaespada, D. A. & Verfaillie, C. M. (2002), 'Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow.', *Nature* **418**(6893), 41--49.
- Joannides, A.; Gaughwin, P.; Schwiening, C.; Majed, H.; Sterling, J.; Compston, A. & Chandran, S. (2004), 'Efficient generation of neural precursors from adult human skin: astrocytes promote neurogenesis from skin-derived stem cells.', *Lancet* **364**(9429), 172--178.
- Johnston, R. B. (1988), 'Current concepts: immunology. Monocytes and macrophages.', *N Engl J Med* **318**(12), 747--752.
- Johnston, R. B.; Kitagawa, S.; Edwards, C. K.; Channon, J. Y.; Suzuki, H. & Pabst, M. J. (1988), 'The respiratory burst in activated macrophages: studies of its molecular basis and evidence for downregulation in chronic infection.', *Adv Exp Med Biol* **239**, 63--72.
- Johnstone, B.; Hering, T. M.; Caplan, A. I.; Goldberg, V. M. & Yoo, J. U. (1998), 'In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells.', *Exp Cell Res* **238**(1), 265--272.

- Ju, W.; Hoffmann, A.; Verschuere, K.; Tylzanowski, P.; Kaps, C.; Gross, G. & Huylebroeck, D. (2000), 'The bone morphogenetic protein 2 signaling mediator Smad1 participates predominantly in osteogenic and not in chondrogenic differentiation in mesenchymal progenitors C3H10T1/2.', *J Bone Miner Res* **15**(10), 1889--1899.
- Kadereit, S.; Deeds, L. S.; Haynesworth, S. E.; Koc, O. N.; Kozik, M. M.; Szekely, E.; Daum-Woods, K.; Goetchius, G. W.; Fu, P.; Welniak, L. A.; Murphy, W. J. & Laughlin, M. J. (2002), 'Expansion of LTC-ICs and maintenance of p21 and BCL-2 expression in cord blood CD34(+)/CD38(-) early progenitors cultured over human MSCs as a feeder layer.', *Stem Cells* **20**(6), 573--582.
- Kadivar, M.; Khatami, S.; Mortazavi, Y.; Shokrgozar, M. A.; Taghikhani, M. & Soleimani, M. (2006), 'In vitro cardiomyogenic potential of human umbilical vein-derived mesenchymal stem cells.', *Biochem Biophys Res Commun* **340**(2), 639--647.
- Kadiyala, S.; Young, R. G.; Thiede, M. A. & Bruder, S. P. (1997), 'Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro.', *Cell Transplant* **6**(2), 125--134.
- Kaji, K.; Norrby, K.; Paca, A.; Mileikovsky, M.; Mohseni, P. & Woltjen, K. (2009), 'Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors.', *Nature*.
- Kashiwagi, K.; Tsuji, T. & Shiba, K. (2009), 'Directional BMP-2 for functionalization of titanium surfaces.', *Biomaterials* **30**(6), 1166--1175.
- Keller, G. (2005), 'Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine.', *Genes Dev* **19**(10), 1129--1155.
- Keller, G. M. (1995), 'In vitro differentiation of embryonic stem cells.', *Curr Opin Cell Biol* **7**(6), 862--869.
- Kennedy, M. B. (2000), 'Signal-processing machines at the postsynaptic density.', *Science* **290**(5492), 750--754.
- Kerr, C. L.; Hill, C. M.; Blumenthal, P. D. & Gearhart, J. D. (2008), 'Expression of pluripotent stem cell markers in the human fetal testis.', *Stem Cells* **26**(2), 412--421.
- Khansari, N.; Chou, Y. K. & Fudenberg, H. H. (1985), 'Human monocyte heterogeneity: interleukin 1 and prostaglandin E2 production by separate subsets.', *Eur J Immunol* **15**(1), 48--51.
- Khansari, N. & Fudenberg, H. H. (1984), 'Functional heterogeneity of human cord blood monocytes.', *Scand J Immunol* **19**(4), 337--342.

Kiessling, L. L.; Gestwicki, J. E. & Strong, L. E. (2006), 'Synthetic multivalent ligands as probes of signal transduction.', *Angew Chem Int Ed Engl* **45**(15), 2348--2368.

Kim, J. B.; Sebastinao, V.; Wu, G.; Arauzo-Bravo, M. J.; Sasse, P.; Gentile, L.; Ko, K.; Ruau, D.; Ehrich, M.; van den Boom, D.; Meyer, J.; Hübner, K.; Bernemann, C.; Ortmeier, C.; Zenke, M.; Fleischmann, B. K.; Zaehres, H. and Schöler, H. R. (2009), 'Oct-4-Induced Pluripotency in Adult Stem Cells.', *Cell* **136**, 411—419.

Kim, D. M.; Schwerdtner, O.; Schmidt-Westhausen, A.-M.; Kage, A. & Klein, M. (2007), 'Cultured epithelial autografts in the treatment of facial skin defects: clinical outcome.', *J Oral Maxillofac Surg* **65**(3), 439--443.

Kim, D.-J.; Moon, S.-H.; Kim, H.; Kwon, U.-H.; Park, M.-S.; Han, K.-J.; Hahn, S.-B. & Lee, H.-M. (2003), 'Bone morphogenetic protein-2 facilitates expression of chondrogenic, not osteogenic, phenotype of human intervertebral disc cells.', *Spine* **28**(24), 2679--2684.

Kim, J. H. & Haganir, R. L. (1999), 'Organization and regulation of proteins at synapses.', *Curr Opin Cell Biol* **11**(2), 248--254.

King, G. N.; King, N. & Hughes, F. J. (1998), 'Effect of two delivery systems for recombinant human bone morphogenetic protein-2 on periodontal regeneration in vivo.', *J Periodontal Res* **33**(4), 226--236.

Kleinman, H. K.; Philp, D. & Hoffman, M. P. (2003), 'Role of the extracellular matrix in morphogenesis.', *Curr Opin Biotechnol* **14**(5), 526--532.

Klenkler, B. J.; Griffith, M.; Becerril, C.; West-Mays, J. A. & Sheardown, H. (2005), 'EGF-grafted PDMS surfaces in artificial cornea applications.', *Biomaterials* **26**(35), 7286--7296.

Klenkler, B. J. & Sheardown, H. (2006), 'Characterization of EGF coupling to aminated silicone rubber surfaces.', *Biotechnol Bioeng* **95**(6), 1158--1166.

Klinkmann, H.; Baurmeister, U.; Davidson, A. M. (1994), 'The Consensus Conference on Biocompatibility: a contribution to the solution of the biocompatibility puzzle.', *Nephrol Dial Transplant* (9), Suppl (2), 1--2

Klinkmann, H. & Ivanovich, P. (1993), 'Biocompatibility: the need for a systems approach.', *J Lab Clin Med* **121**(2), 203--204.

Klinkmann, H.; Ivanovich, P. & Falkenhagen, D. (1993), 'Biocompatibility: the need for a systems approach.', *Nephrol Dial Transplant* **8 Suppl 2**, 40--42.

Koestenbauer, S.; Zech, N. H.; Juch, H.; Vanderzwalmen, P.; Schoonjans, L. & Dohr, G. (2006), 'Embryonic stem cells: similarities and differences between human and murine embryonic stem cells.', *Am J Reprod Immunol* **55**(3), 169--180.

Korn, B. S.; Kikkawa, D. O. & Hicok, K. C. (2009), 'Identification and characterization of adult stem cells from human orbital adipose tissue.', *Ophthal Plast Reconstr Surg* **25**(1), 27--32.

Koç, O. N.; Day, J.; Nieder, M.; Gerson, S. L.; Lazarus, H. M. & Krivit, W. (2002), 'Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH).', *Bone Marrow Transplant* **30**(4), 215--222.

Koch, P.; Biegler, A.; Pfennig, A.; Müller, T.; Klein-Vehne, A.; Terstegge, S.; Itskovitz-Eldor, J. und Brüstle O. (2005), 'Automated generation of human stem cell clones by Image-Activated Cell Selection.' (IACSTM), *Application Note, Nature Methods* **2**(11), i--ii

Krause, D. S.; Theise, N. D.; Collector, M. I.; Henegariu, O.; Hwang, S.; Gardner, R.; Neutzel, S. & Sharkis, S. J. (2001), 'Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell.', *Cell* **105**(3), 369--377.

Kruse, C., Borth, M., Rohwedel, J., Assmuth, K., Goepel, A., Wedel, T. (2004). Pluripotency of adult stem cells derived from human and rat pancreas. *Appl. Phys. A* **79**, 1617-1624.

Kruse, C., Kajahn, J., Petschnik, A., Maaß, A., Klink, E., Rapoport, D., Wedel, T. (2006). Adult stem cells/progenitor cells spontaneously differentiate in vitro into multiple cell lineages and form teratomalike structures. *Ann. Anat.* **188**, 503-517.

Kubota, H. & Brinster, R. L. (2006), 'Technology insight: In vitro culture of spermatogonial stem cells and their potential therapeutic uses.', *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* **2**(2), 99--108.

Körbling, M.; Estrov, Z. & Champlin, R. (2003), 'Adult stem cells and tissue repair.', *Bone Marrow Transplant* **32 Suppl 1**, S23--S24.

Kreutz, M.; Hennemann, B.; Ackermann, U.; Grage-Griebenow, E.; Krause, S. W. & Andreesen, R. (1999), 'Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor modulates lipopolysaccharide (LPS)-binding and LPS-response of human macrophages: inverse regulation of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-10.', *Immunology* **98**(4), 491--496.

Kreutz, M.; Krause, S. W.; Hennemann, B.; Rehm, A. & Andreesen, R. (1992), 'Macrophage heterogeneity and differentiation: defined serum-free culture conditions induce different types of macrophages in vitro.', *Res Immunol* **143**(1), 107--115.

-
- Lacham-Kaplan, O.; Chy, H. & Trounson, A. (2006), 'Testicular cell conditioned medium supports differentiation of embryonic stem cells into ovarian structures containing oocytes.', *Stem Cells* **24**(2), 266--273.
- Laffargue, P.; Hildebrand, H. F.; Rtaimate, M.; Frayssinet, P.; Amoureux, J. P. & Marchandise, X. (1999), 'Evaluation of human recombinant bone morphogenetic protein-2-loaded tricalcium phosphate implants in rabbits' bone defects.', *Bone* **25**(2 Suppl), 55S--58S.
- Langer, R. & Vacanti, J. P. (1993), 'Tissue engineering.', *Science* **260**(5110), 920--926.
- Lawrence, D. A. (1996), 'Transforming growth factor-beta: a general review.', *Eur Cytokine Netw* **7**(3), 363--374.
- Leclerc, C.; Brose, C.; Nouzé, C.; Leonard, F.; Majlessi, L.; Becker, S.; von Briesen, H. & Lo-Man, R. (2008), 'Immobilized cytokines as biomaterials for manufacturing immune cell based vaccines.', *J Biomed Mater Res A* **86**(4), 1033--1040.
- Lee, K.-D.; Kuo, T. K.-C.; Whang-Peng, J.; Chung, Y.-F.; Lin, C.-T.; Chou, S.-H.; Chen, J.-R.; Chen, Y.-P. & Lee, O. K.-S. (2004), 'In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells.', *Hepatology* **40**(6), 1275--1284.
- Leung, V. Y. L.; Chan, D. & Cheung, K. M. C. (2006), 'Regeneration of intervertebral disc by mesenchymal stem cells: potentials, limitations, and future direction.', *Eur Spine J* **15** Suppl 3, S406--S413.
- Liechty, K. W.; MacKenzie, T. C.; Shaaban, A. F.; Radu, A.; Moseley, A. M.; Deans, R.; Marshak, D. R. & Flake, A. W. (2000), 'Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep.', *Nat Med* **6**(11), 1282--1286.
- Lin, F. T. & Lane, M. D. (1994), 'CCAAT/enhancer binding protein alpha is sufficient to initiate the 3T3-L1 adipocyte differentiation program.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(19), 8757--8761.
- Liu, S. Q.; Ito, Y. & Imanishi, Y. (1992), 'Cell growth on immobilized cell-growth factor; 4: Interaction of fibroblast cells with insulin immobilized on poly(methyl methacrylate) membrane.', *J Biochem Biophys Methods* **25**(2-3), 139--148.
- Liu, S. Q.; Ito, Y. & Imanishi, Y. (1992), 'Cell growth on immobilized cell growth factor. I. Acceleration of the growth of fibroblast cells on insulin-immobilized polymer matrix in culture medium without serum.', *Biomaterials* **13**(1), 50--58.
-

Loercher, A. E.; Nash, M. A.; Kavanagh, J. J.; Platsoucas, C. D. & Freedman, R. S. (1999), 'Identification of an IL-10-producing HLA-DR-negative monocyte subset in the malignant ascites of patients with ovarian carcinoma that inhibits cytokine protein expression and proliferation of autologous T cells.', *J Immunol* **163**(11), 6251--6260.

Long, X.; Olszewski, M.; Huang, W. & Kletzel, M. (2005), 'Neural cell differentiation in vitro from adult human bone marrow mesenchymal stem cells.', *Stem Cells Dev* **14**(1), 65--69.

Lyons, K. M.; Pelton, R. W. & Hogan, B. L. (1990), 'Organogenesis and pattern formation in the mouse: RNA distribution patterns suggest a role for bone morphogenetic protein-2A (BMP-2A).', *Development* **109**(4), 833--844.

Mackay, A. M.; Beck, S. C.; Murphy, J. M.; Barry, F. P.; Chichester, C. O. & Pittenger, M. F. (1998), 'Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow.', *Tissue Eng* **4**(4), 415--428.

Makino, H.; Hasuda, H. & Ito, Y. (2004), 'Immobilization of leukemia inhibitory factor (LIF) to culture murine embryonic stem cells.', *J Biosci Bioeng* **98**(5), 374--379.

Mandrup, S. & Lane, M. D. (1997), 'Regulating adipogenesis.', *J Biol Chem* **272**(9), 5367--5370.

Mann, B. K.; Schmedlen, R. H. & West, J. L. (2001), 'Tethered-TGF-beta increases extracellular matrix production of vascular smooth muscle cells.', *Biomaterials* **22**(5), 439--444.

Martinez, F. O.; Gordon, S.; Locati, M. & Mantovani, A. (2006), 'Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression.', *J Immunol* **177**(10), 7303--7311.

Matsuuchi, L. & Gold, M. R. (2001), 'New views of BCR structure and organization.', *Curr Opin Immunol* **13**(3), 270--277.

Memmel & Bertel (1995), 'Role of surface states for the epitaxial growth on metal surfaces.', *Phys Rev Lett* **75**(3), 485--488.

Mercati, F.; Pascucci, L.; Gargiulo, A. M.; Dall'Aglio, C. & Ceccarelli, P. (2008), 'Immunohistochemical evaluation of intermediate filament nestin in dog hair follicles.', *Histol Histopathol* **23**(9), 1035--1041.

Metcalfe, A. D. & Ferguson, M. W. J. (2005), 'Harnessing wound healing and regeneration for tissue engineering.', *Biochem Soc Trans* **33**(Pt 2), 413--417.

-
- Metzger, W.; Grenner, N.; Motsch, S. E.; Strehlow, R.; Pohlemann, T. & Oberringer, M. (2007), 'Induction of myofibroblastic differentiation in vitro by covalently immobilized transforming growth factor-beta(1).', *Tissue Eng* **13**(11), 2751--2760.
- Mezey, E.; Key, S.; Vogelsang, G.; Szalayova, I.; Lange, G. D. & Crain, B. (2003), 'Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(3), 1364--1369.
- Millet, L. J.; Stewart, M. E.; Sweedler, J. V.; Nuzzo, R. G. & Gillette, M. U. (2007), 'Microfluidic devices for culturing primary mammalian neurons at low densities.', *Lab Chip* **7**(8), 987--994.
- Minakawa, T.; Bready, J.; Berliner, J.; Fisher, M. & Cancilla, P. A. (1991), 'In vitro interaction of astrocytes and pericytes with capillary-like structures of brain microvessel endothelium.', *Lab Invest* **65**(1), 32--40.
- Minguell, J. J.; Erices, A. & Conget, P. (2001), 'Mesenchymal stem cells.', *Exp Biol Med (Maywood)* **226**(6), 507--520.
- Nakajima, M.; Ishimuro, T.; Kato, K.; Ko, I.-K.; Hirata, I.; Arima, Y. & Iwata, H. (2007), 'Combinatorial protein display for the cell-based screening of biomaterials that direct neural stem cell differentiation.', *Biomaterials* **28**(6), 1048--1060.
- Nayernia, K. (2007), 'Stem cells derived from testis show promise for treating a wide variety of medical conditions.', *Cell Res* **17**(11), 895--897.
- Nayernia, K.; Li, M. & Engel, W. (2004), 'Spermatogonial stem cells.', *Methods Mol Biol* **253**, 105--120.
- Nie, X.; Zhang, J. Y.; Cai, K. J.; Yang, M. H.; Xiao, A. H.; Hu, H. D.; Liu, L. Y.; Wang, H. J.; Wen, N. & Jin, Y. (2007), 'Cosmetic improvement in various acute skin defects treated with tissue-engineered skin.', *Artif Organs* **31**(9), 703--710.
- Novak, N.; Bieber, T. & Katoh, N. (2001), 'Engagement of Fc epsilon RI on human monocytes induces the production of IL-10 and prevents their differentiation in dendritic cells.', *J Immunol* **167**(2), 797--804.
- Nuñez, G.; Giles, R. C.; Ball, E. J.; Hurley, C. K.; Capra, J. D. & Stastny, P. (1984), 'Expression of HLA-DR, MB, MT and SB antigens on human mononuclear cells: identification of two phenotypically distinct monocyte populations.', *J Immunol* **133**(3), 1300--1306.
- Oatley, J. M. & Brinster, R. L. (2008), 'Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal in mammals.', *Annu Rev Cell Dev Biol* **24**, 263--286.
-

Oda, S.; Kinoshita, A.; Higuchi, T.; Shizuya, T. & Ishikawa, I. (1997), 'Ectopic bone formation by biphasic calcium phosphate (BCP) combined with recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2).', *J Med Dent Sci* **44**(3), 53--62.

Olive, V. & Cuzin, F. (2005), 'The spermatogonial stem cell: from basic knowledge to transgenic technology.', *Int J Biochem Cell Biol* **37**(2), 246--250.

Otto, W. R. & Rao, J. (2004), 'Tomorrow's skeleton staff: mesenchymal stem cells and the repair of bone and cartilage.', *Cell Prolif* **37**(1), 97--110.

Paesold, G.; Nerlich, A. G. & Boos, N. (2007), 'Biological treatment strategies for disc degeneration: potentials and shortcomings.', *Eur Spine J* **16**(4), 447--468.

Paguirigan, A. L. & Beebe, D. J. (2008), 'Microfluidics meet cell biology: bridging the gap by validation and application of microscale techniques for cell biological assays.', *Bioessays* **30**(9), 811--821.

Park, K.; Cho, K.-J.; Kim, J.-J.; Kim, I.-H. & Han, D. K. (2009), 'Functional PLGA scaffolds for chondrogenesis of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells.', *Macromol Biosci* **9**(3), 221--229.

Partridge, K. A. & Oreffo, R. O. C. (2004), 'Gene delivery in bone tissue engineering: progress and prospects using viral and nonviral strategies.', *Tissue Eng* **10**(1-2), 295--307.

Passlick, B.; Flieger, D. & Ziegler-Heitbrock, H. W. (1989), 'Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood.', *Blood* **74**(7), 2527--2534.

Payne, C. J. & Braun, R. E. (2008), 'Human adult testis-derived pluripotent stem cells: revealing plasticity from the germline.', *Cell Stem Cell* **3**(5), 471--472.

Pittenger, M. F.; Mackay, A. M.; Beck, S. C.; Jaiswal, R. K.; Douglas, R.; Mosca, J. D.; Moorman, M. A.; Simonetti, D. W.; Craig, S. & Marshak, D. R. (1999), 'Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.', *Science* **284**(5411), 143--147.

Pittenger, M. F. & Martin, B. J. (2004), 'Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics.', *Circ Res* **95**(1), 9--20.

Pittenger, M. F.; Mosca, J. D. & McIntosh, K. R. (2000), 'Human mesenchymal stem cells: progenitor cells for cartilage, bone, fat and stroma.', *Curr Top Microbiol Immunol* **251**, 3--11.

Planat-Bénard, V.; Menard, C.; André, M.; Puceat, M.; Perez, A.; Garcia-Verdugo, J.-M.; Pénicaud, L. & Casteilla, L. (2004), 'Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells.', *Circ Res* **94**(2), 223--229.

-
- Priller, J.; Persons, D. A.; Klett, F. F.; Kempermann, G.; Kreutzberg, G. W. & Dirnagl, U. (2001), 'Neogenesis of cerebellar Purkinje neurons from gene-marked bone marrow cells in vivo.', *J Cell Biol* **155**(5), 733--738.
- Prockop, D. J.; Sekiya, I. & Colter, D. C. (2001), 'Isolation and characterization of rapidly self-renewing stem cells from cultures of human marrow stromal cells.', *Cytotherapy* **3**(5), 393--396.
- Puleo, D. A.; Kissling, R. A. & Sheu, M. S. (2002), 'A technique to immobilize bioactive proteins, including bone morphogenetic protein-4 (BMP-4), on titanium alloy.', *Biomaterials* **23**(9), 2079--2087.
- Quarto, R.; Mastrogiacomo, M.; Cancedda, R.; Kutepov, S. M.; Mukhachev, V.; Lavroukov, A.; Kon, E. & Marcacci, M. (2001), 'Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells.', *N Engl J Med* **344**(5), 385--386.
- Rahaman, M. N. & Mao, J. J. (2005), 'Stem cell-based composite tissue constructs for regenerative medicine.', *Biotechnol Bioeng* **91**(3), 261--284.
- Raisz, L. G. (1999), 'Physiology and pathophysiology of bone remodeling.', *Clin Chem* **45**(8 Pt 2), 1353--1358.
- Ratner, B. D. & Bryant, S. J. (2004), 'Biomaterials: where we have been and where we are going.', *Annu Rev Biomed Eng* **6**, 41--75.
- Ratner, B. (2004), 'Biomaterial Science. An Introduction to Materials in Medicine.' Elsevier, Amsterdam, ISBN: 0-12-582463-7
- Reddi, A. H. (1997), 'Bone morphogenetic proteins: an unconventional approach to isolation of first mammalian morphogens.', *Cytokine Growth Factor Rev* **8**(1), 11--20.
- Refior, H. J.; Hackenbroch, M. & Wirth, C. J. (1998), '[Bone substitution materials]', *Orthopade* **27**(2), 71.
- Rehli, M.; Krause, S. W. & Andreesen, R. (2000), 'The membrane-bound ectopeptidase CPM as a marker of macrophage maturation in vitro and in vivo.', *Adv Exp Med Biol* **477**, 205--216.
- Rehli, M.; Krause, S. W.; Kreutz, M. & Andreesen, R. (1995), 'Carboxypeptidase M is identical to the MAX.1 antigen and its expression is associated with monocyte to macrophage differentiation.', *J Biol Chem* **270**(26), 15644--15649.
-

Revell, P. A.; Damien, E.; Silvio, L. D.; Gurav, N.; Longinotti, C. & Ambrosio, L. (2007), 'Tissue engineered intervertebral disc repair in the pig using injectable polymers.', *J Mater Sci Mater Med* **18**(2), 303--308.

Revzin, A.; Rajagopalan, P.; Tilles, A. W.; Berthiaume, F.; Yarmush, M. L. & Toner, M. (2004), 'Designing a hepatocellular microenvironment with protein microarraying and poly(ethylene glycol) photolithography.', *Langmuir* **20**(8), 2999--3005.

Revzin, A.; Sekine, K.; Sin, A.; Tompkins, R. G. & Toner, M. (2005), 'Development of a microfabricated cytometry platform for characterization and sorting of individual leukocytes.', *Lab Chip* **5**(1), 30--37.

Reyes, M.; Lund, T.; Lenvik, T.; Aguiar, D.; Koodie, L. & Verfaillie, C. M. (2001), 'Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells.', *Blood* **98**(9), 2615--2625.

Reyes, M. & Verfaillie, C. M. (2001), 'Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells.', *Ann N Y Acad Sci* **938**, 231--3; discussion 233-5.

Ring, M. E. (2001), 'How a dentist's name became a synonym for a life-saving device: the story of Dr. Charles Stent.', *J Hist Dent* **49**(2), 77--80.

Rosen, E. D. (2002), 'The molecular control of adipogenesis, with special reference to lymphatic pathology.', *Ann N Y Acad Sci* **979**, 143--58; discussion 188-96.

Rueger, J. M. (1998), '[Bone substitution materials. Current status and prospects]', *Orthopade* **27**(2), 72--79.

Saheki, S.; Takeda, A. & Shimazu, T. (1985), 'Assay of inorganic phosphate in the mild pH range, suitable for measurement of glycogen phosphorylase activity.', *Anal Biochem* **148**(2), 277--281.

Sato, K.; Mawatari, K. & Kitamori, T. (2008), 'Microchip-based cell analysis and clinical diagnosis system.', *Lab Chip* **8**(12), 1992--1998.

Sánchez-Torres, C.; García-Romo, G. S.; Cornejo-Cortés, M. A.; Rivas-Carvalho, A. & Sánchez-Schmitz, G. (2001), 'CD16+ and CD16- human blood monocyte subsets differentiate in vitro to dendritic cells with different abilities to stimulate CD4+ T cells.', *Int Immunol* **13**(12), 1571--1581.

Schlesier, M.; Krause, S.; Dräger, R.; Wolff-Vorbeck, G.; Kreutz, M.; Andreesen, R. & Peter, H. H. (1994), 'Monocyte differentiation and accessory function: different effects on the proliferative responses of an autoreactive T cell clone as compared to alloreactive or antigen-specific T cell lines and primary mixed lymphocyte cultures.', *Immunobiology* **190**(1-2), 164--174.

Schmitt, B.; Ringe, J.; Häupl, T.; Notter, M.; Manz, R.; Burmester, G.-R.; Sittinger, M. & Kaps, C. (2003), 'BMP2 initiates chondrogenic lineage development of adult human mesenchymal stem cells in high-density culture.', *Differentiation* **71**(9-10), 567--577.

Schreiber, A. D.; Kelley, M.; Dziarski, A. & Levinson, A. I. (1983), 'Human monocyte functional heterogeneity: monocyte fractionation by discontinuous albumin gradient centrifugation.', *Immunology* **49**(2), 231--238.

Schroeter, M. L.; Mertsch, K.; Sporbert, A.; Lindenau, J.; Wiesner, B.; Mueller, S.; Ertelt, M.; Blasig, J. E. (1998), 'MnSOD is induced in brain capillary endothelial cells by cocultivation with astrocytes.', *Symposium 'In vitro models for neuroprotective drug discovery' Magdeburg*.

Schwartz, R. E.; Reyes, M.; Koodie, L.; Jiang, Y.; Blackstad, M.; Lund, T.; Lenvik, T.; Johnson, S.; Hu, W.-S. & Verfaillie, C. M. (2002), 'Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells.', *J Clin Invest* **109**(10), 1291--1302.

Seaberg, R. M.; Smukler, S. R.; Kieffer, T. J.; Enikolopov, G.; Asghar, Z.; Wheeler, M. B.; Korbitt, G. & van der Kooy, D. (2004), 'Clonal identification of multipotent precursors from adult mouse pancreas that generate neural and pancreatic lineages.', *Nat Biotechnol* **22**(9), 1115--1124.

Seeberger, K. L.; Dufour, J. M.; Shapiro, A. M. J.; Lakey, J. R. T.; Rajotte, R. V. & Korbitt, G. S. (2006), 'Expansion of mesenchymal stem cells from human pancreatic ductal epithelium.', *Lab Invest* **86**(2), 141--153.

Sekiya, I.; Vuoristo, J. T.; Larson, B. L. & Prockop, D. J. (2002), 'In vitro cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(7), 4397--4402.

Shi, Z.; Neoh, K. G.; Kang, E.-T.; Poh, C. & Wang, W. (2008), 'Titanium with Surface-Grafted Dextran and Immobilized Bone Morphogenetic Protein-2 for Inhibition of Bacterial Adhesion and Enhancement of Osteoblast Functions.', *Tissue Eng Part A*.

Shibata, S. C.; Hibino, K.; Mashimo, T.; Yanagida, T. & Sako, Y. (2006), 'Formation of signal transduction complexes during immobile phase of NGFR movements.', *Biochem Biophys Res Commun* **342**(1), 316--322.

Shimizu, T. S.; Novère, N. L.; Levin, M. D.; Bevil, A. J.; Sutton, B. J. & Bray, D. (2000), 'Molecular model of a lattice of signalling proteins involved in bacterial chemotaxis.', *Nat Cell Biol* **2**(11), 792--796.

Shum, L.; Coleman, C. M.; Hatakeyama, Y. & Tuan, R. S. (2003), 'Morphogenesis and dysmorphogenesis of the appendicular skeleton.', *Birth Defects Res C Embryo Today* **69**(2), 102--122.

Sigurdsson, T. J.; Fu, E.; Tatakis, D. N.; Rohrer, M. D. & Wikesjö, U. M. (1997), 'Bone morphogenetic protein-2 for peri-implant bone regeneration and osseointegration.', *Clin Oral Implants Res* **8**(5), 367--374.

da Silva Meirelles, L.; Caplan, A. I. & Nardi, N. B. (2008), 'In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells.', *Stem Cells* **26**(9), 2287--2299.

Skutella, T. (2009), 'Induced pluripotent stem cells from adult testis: a new source of stem cells?', *Regen Med* **4**(1), 3--5.

Smas, C. M. & Sul, H. S. (1993), 'Pref-1, a protein containing EGF-like repeats, inhibits adipocyte differentiation.', *Cell* **73**(4), 725--734.

Soldner, F.; Hockemeyer, D.; Beard, C.; Gao, Q.; Bell, G. W.; Cook, E. G.; Hargus, G.; Blak, A.; Cooper, O.; Mitalipova, M.; Isacson, O. & Jaenisch, R. (2009), 'Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors.', *Cell* **136**(5), 964--977.

Southern, E.; Mir, K. & Shchepinov, M. (1999), 'Molecular interactions on microarrays.', *Nat Genet* **21**(1 Suppl), 5--9.

Soyez, H.; Schacht, E.; Vanderkerken, S. (1996), 'The crucial role of spacer groups in macromolecular prodrug design.', *Adv. Drug Delivery Rev.* **21**, 81--106.

Spiro, R. C.; Liu, L.; Heidarani, M. A.; Thompson, A. Y.; Ng, C. K.; Pohl, J. & Poser, J. W. (2000), 'Inductive activity of recombinant human growth and differentiation factor-5.', *Biochem Soc Trans* **28**(4), 362--368.

Stastny, P. & Nunez, G. (1984), 'Monocyte surface antigens.', *Prog Clin Biol Res* **149**, 189--203.

Streuli, C. (1999), 'Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation.', *Curr Opin Cell Biol* **11**(5), 634--640.

Sung, J. H.; Yang, H.-M.; Park, J. B.; Choi, G.-S.; Joh, J.-W.; Kwon, C. H.; Chun, J. M.; Lee, S.-K. & Kim, S.-J. (2008), 'Isolation and characterization of mouse mesenchymal stem cells.', *Transplant Proc* **40**(8), 2649--2654.

Suzuki, A.; Nakauchi, H. & Taniguchi, H. (2004), 'Prospective isolation of multipotent pancreatic progenitors using flow-cytometric cell sorting.', *Diabetes* **53**(8), 2143--2152.

Taléns-Visconti, R.; Bonora, A.; Jover, R.; Mirabet, V.; Carbonell, F.; Castell, J.-V. & Gómez-Lechón, M. J. (2006), 'Hepatogenic differentiation of human mesenchymal stem cells from adipose tissue in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells.', *World J Gastroenterol* **12**(36), 5834--5845.

Terstegge, S.; Laufenberg, I.; Pochert, J.; Schenk, S.; Itskovitz-Eldor, J.; Endl, E. und Brüstle O. (2006), 'Automated Maintenance of Embryonic Stem Cell Culture.', *Biotechnology and Bioengineering* online publiziert 7. September 2006. DOI: 10.1002/bit.21061.

Terstegge, S.; Pochert, J. und Brüstle O. (2004), 'Hamilton's new cellhost system for full automation of embryonic stem cell culture.', *Application Note, Nature Methods* 1(3), 271--272

Terstegge, S. und Burchin M. (2004), 'Mediumsupplemente zur Förderung der Kultivierung von embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) in Suspensionen.' *Deutsche Patentanmeldung* 10 2004 014 116.9-11

Tersegege, S. und Brüstle O. (2004), 'Skalierbarer Prozess zur Kultivierung undifferenzierter Stammzellen in Suspension.' *Europäische Patentanmeldung* PCT-EP-2005-009611

Thomson, J. A.; Itskovitz-Eldor, J.; Shapiro, S. S.; Waknitz, M. A.; Swiergiel, J. J.; Marshall, V. S. & Jones, J. M. (1998), 'Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts.', *Science* **282**(5391), 1145--1147.

Toma, C.; Pittenger, M. F.; Cahill, K. S.; Byrne, B. J. & Kessler, P. D. (2002), 'Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart.', *Circulation* **105**(1), 93--98.

Treves, A. J.; Barak, V.; Tal, T. & Fuks, Z. (1983), 'Constitutive secretion of interleukin 1 by human monocytes.', *Eur J Immunol* **13**(8), 647--651.

Treves, A. J.; Haimovitz, A. & Fuks, Z. (1982), 'Changes in surface markers of human monocytes following their in vitro maturation to macrophages.', *Adv Exp Med Biol* **155**, 227--232.

Tsujigiwa, H.; Nagatsuka, H.; Gunduz, M.; Rodriguez, A.; Rivera, R. S.; Legeros, R. Z.; Inoue, M. & Nagai, N. (2005), 'Effects of immobilized recombinant human bone morphogenetic protein-2/succinylated type I atelocollagen on cellular activity of ST2 cells.', *J Biomed Mater Res A* **75**(1), 210-215.

Tsujigiwa, H.; Nagatsuka, H.; Lee, Y. J.; Han, P. P.; Gunduz, M.; Legeros, R. Z.; Inoue, M.; Yamada, M. & Nagai, N. (2006), 'Immobilized rhBMP-2/succinylated type I atelocollagen gene expression of intracellular signaling molecules on ST2 cells.', *J Biomed Mater Res A* **77**(3), 507--511.

Tsuruga, E.; Takita, H.; Itoh, H.; Wakisaka, Y. & Kuboki, Y. (1997), 'Pore size of porous hydroxyapatite as the cell-substratum controls BMP-induced osteogenesis.', *J Biochem* **121**(2), 317--324.

Tuan, R. S.; Boland, G. & Tuli, R. (2003), 'Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering.', *Arthritis Res Ther* **5**(1), 32--45.

Urist, M. R. (1965), 'Bone: formation by autoinduction.', *Science* **150**(698), 893--899.

Vacanti, J. P. & Langer, R. (1999), 'Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation.', *Lancet* **354** **Suppl 1**, SI32--SI34.

Wakitani, S.; Saito, T. & Caplan, A. I. (1995), 'Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine.', *Muscle Nerve* **18**(12), 1417--1426.

Wang, I. M.; Contursi, C.; Masumi, A.; Ma, X.; Trinchieri, G. & Ozato, K. (2000), 'An IFN-gamma-inducible transcription factor, IFN consensus sequence binding protein (ICSBP), stimulates IL-12 p40 expression in macrophages.', *J Immunol* **165**(1), 271--279.

Wang, S. Y.; Mak, K. L.; Chen, L. Y.; Chou, M. P. & Ho, C. K. (1992), 'Heterogeneity of human blood monocyte: two subpopulations with different sizes, phenotypes and functions.', *Immunology* **77**(2), 298--303.

Wang, X. J.; Li, Y. C.; Lin, J. G.; Yamada, Y.; Hodgson, P. D. & Wen, C. E. (2008), 'In vitro bioactivity evaluation of titanium and niobium metals with different surface morphologies.', *Acta Biomater* **4**(5), 1530--1535.

Watanabe, K.; Miyazaki, T. & Matsuda, R. (2003), 'Growth factor array fabrication using a color ink jet printer.', *Zoolog Sci* **20**(4), 429--434.

Way, K. J.; Dinh, H.; Keene, M. R.; White, K. E.; Clanchy, F. I. L.; Lusby, P.; Roiniotis, J.; Cook, A. D.; Cassady, A. I.; Curtis, D. & Hamilton, J. A. (2009), 'The generation and properties of human macrophage populations from hemopoietic stem cells.', *J Leukoc Biol*.

Whitelaw, D. M. (1972), 'Observations on human monocyte kinetics after pulse labeling.', *Cell Tissue Kinet* **5**(4), 311--317.

Whitelaw, D. M. (1972), 'Observations on human monocyte kinetics after pulse labeling.', *Cell Tissue Kinet* **5**(4), 311--317.

Whitelaw, D. M. & Batho, H. F. (1972), 'The distribution of monocytes in the rat.', *Cell Tissue Kinet* **5**(3), 215--225.

Wiese, C.; Rolletschek, A.; Kania, G.; Blyszczuk, P.; Tarasov, K. V.; Tarasova, Y.; Wersto, R. P.; Boheler, K. R. & Wobus, A. M. (2004), 'Nestin expression--a property of multi-lineage progenitor cells?', *Cell Mol Life Sci* **61**(19-20), 2510--2522.

Williams, D. F. (2006), 'To engineer is to create: the link between engineering and regeneration.', *Trends Biotechnol* **24**(1), 4--8.

Wobus, A. M. & Boheler, K. R. (2005), 'Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy.', *Physiol Rev* **85**(2), 635--678.

Wobus, A. M.; Wallukat, G. & Hescheler, J. (1991), 'Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca²⁺ channel blockers.', *Differentiation* **48**(3), 173--182.

Woltjen, K.; Michael, I. P.; Mohseni, P.; Desai, R.; Mileikovsky, M.; Hämäläinen, R.; Cowling, R.; Wang, W.; Liu, P.; Gertsenstein, M.; Kaji, K.; Sung, H.-K. & Nagy, A. (2009), 'piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells.', *Nature*.

Wozney, J. M. (1992), 'The bone morphogenetic protein family and osteogenesis.', *Mol Reprod Dev* **32**(2), 160--167.

Xu, W.; Zhang, X.; Qian, H.; Zhu, W.; Sun, X.; Hu, J.; Zhou, H. & Chen, Y. (2004), 'Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro.', *Exp Biol Med (Maywood)* **229**(7), 623--631.

Yang, D.; Howard, O. M.; Chen, Q. & Oppenheim, J. J. (1999), 'Cutting edge: immature dendritic cells generated from monocytes in the presence of TGF-beta 1 express functional C-C chemokine receptor 6.', *J Immunol* **163**(4), 1737--1741.

Yi, S. E.; Daluiski, A.; Pederson, R.; Rosen, V. & Lyons, K. M. (2000), 'The type I BMP receptor BMPRII is required for chondrogenesis in the mouse limb.', *Development* **127**(3), 621--630.

Yoshida, S. (2009), 'Spermatogenic Stem Cell System in the Mouse Testis.', *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*.

Zhang, S.; Ge, J.; Sun, A.; Xu, D.; Qian, J.; Lin, J.; Zhao, Y.; Hu, H.; Li, Y.; Wang, K. & Zou, Y. (2006), 'Comparison of various kinds of bone marrow stem cells for the repair of infarcted myocardium: single clonally purified non-hematopoietic mesenchymal stem cells serve as a superior source.', *J Cell Biochem* **99**(4), 1132--1147.

Zheng, J.; Ito, Y. & Imanishi, Y. (1995), 'Growth enhancement of anchorage-dependent and anchorage-independent cells by coimmobilization of insulin with poly(allylamine) or gelatin.', *Biotechnol Prog* **11**(6), 677--681.

Zheng, J.; Ito, Y. & Imanishi, Y. (1995), 'Cell growth on insulin/RGDS-coimmobilized poly(methyl methacrylate) films.', *J Biomater Sci Polym Ed* **7**(6), 515--522.

Zheng, J.; Ito, Y. & Imanishi, Y. (1994), 'Cell growth on immobilized cell-growth factor. 10. Insulin and polyallylamine co-immobilized materials.', *Biomaterials* 15(12), 963--968.

Zhou, L. J. & Tedder, T. F. (1996), 'CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells.', *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(6), 2588--2592.

Zhu, H.; Stybayeva, G.; Macal, M.; Ramanuculov, E.; George, M. D.; Dandekar, S. And Revzin, A. (2008), 'A microdevice for multiplexed detection of T-cell-secreted cytokines.', *Lab on a Chip* 8, 219--2205.

Ziegler-Heitbrock, H. W.; Fingerle, G.; Ströbel, M.; Schraut, W.; Stelzer, F.; Schütt, C.; Passlick, B. & Pforte, A. (1993), 'The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages.', *Eur J Immunol* 23(9), 2053--2058.

Ziegler-Heitbrock, H. W.; Passlick, B. & Flieger, D. (1988), 'The monoclonal antimonocyte antibody My4 stains B lymphocytes and two distinct monocyte subsets in human peripheral blood.', *Hybridoma* 7(6), 521--527.

8 Anhang

8.1 Übersicht über ergänzende Ergebnisse

In diesem Abschnitt der Arbeit sind alle ergänzenden Darstellungen zu den Ergebnissen im Kapitel 3 aufgeführt.

8.1.1 Kultivierung und gezielte Differenzierung der GSCs mittels löslicher Wachstumsfaktoren (3.2.2)

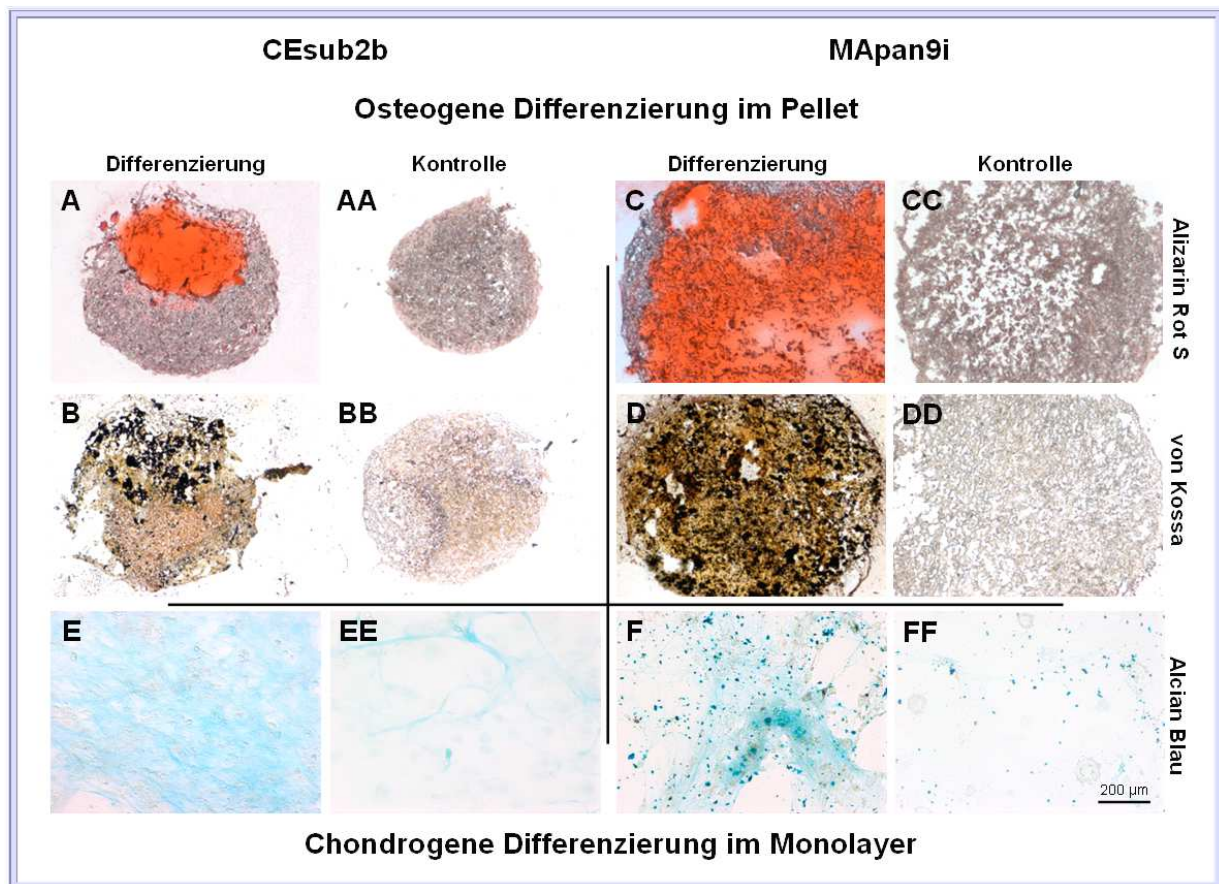


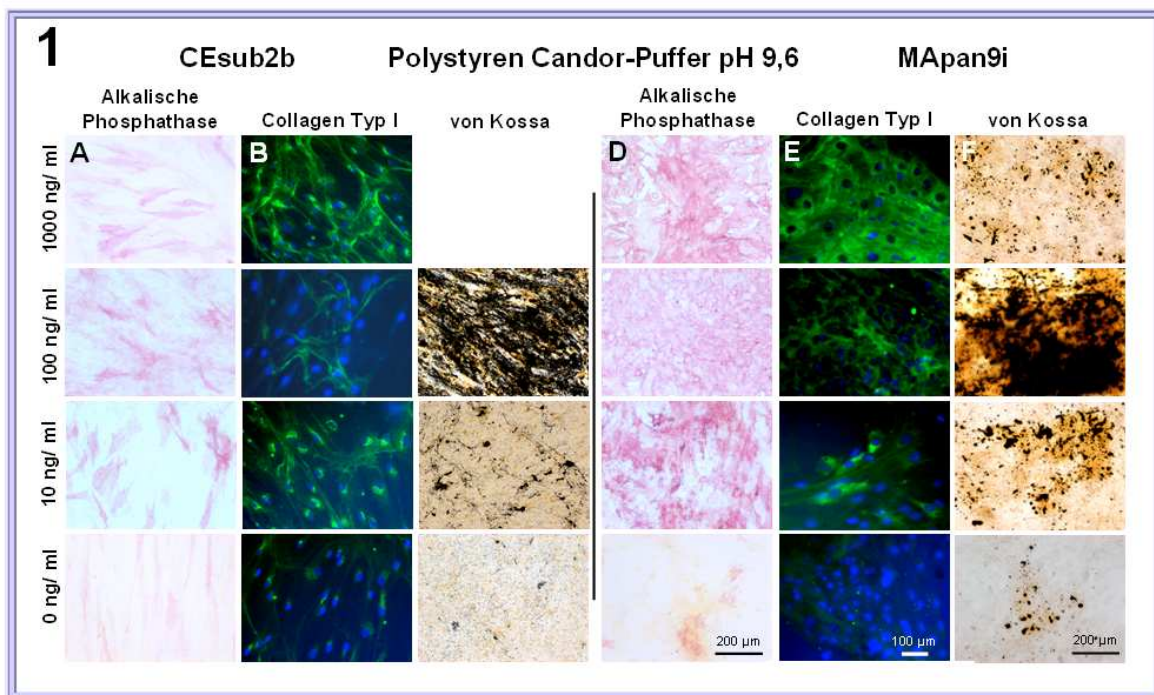
Abbildung 38: Humane und murine GSCs können mittels gelöster Signalfaktoren gezielt differenziert werden. In dieser Darstellung sind die Ergebnisse der Differenzierungsexperimente der humanen (links) und murinen (rechts) GSCs mittels gelöster Wachstumsfaktoren zusammengefasst. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 21 Tagen differenziert. Die Osteoblastendifferenzierung der humanen und murinen GSCs wurde im Pelletsystem durchgeführt und anhand der Alizarin Rot S-

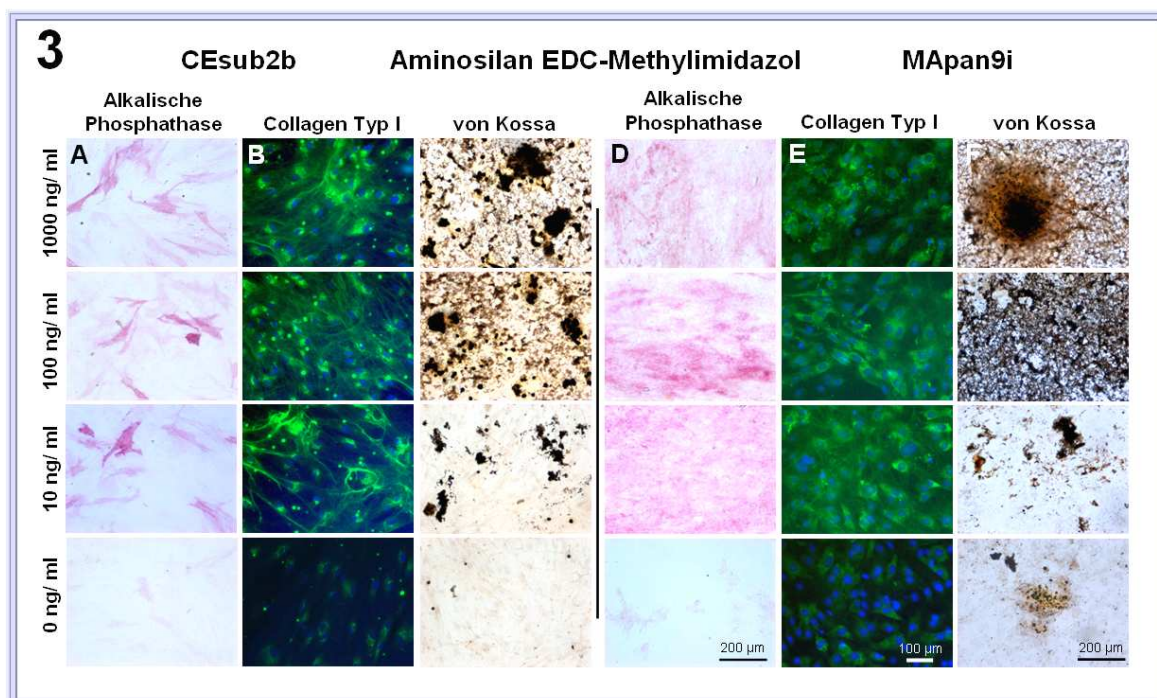
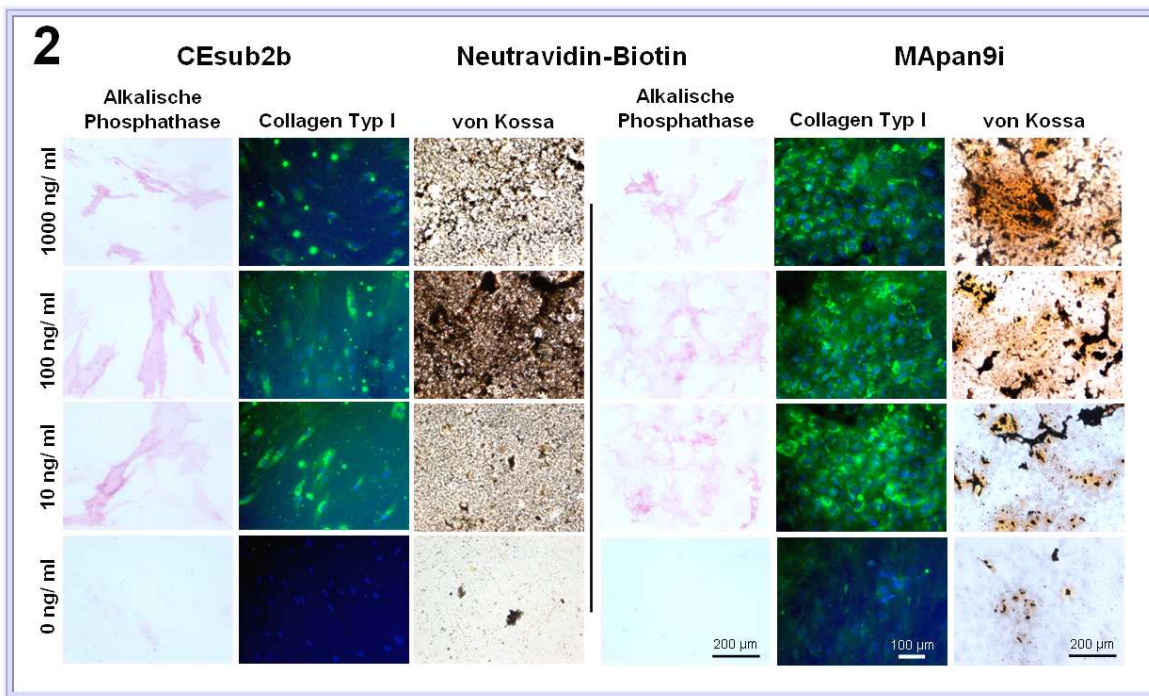
(human: A; AA, murin: C, CC) und von Kossa- (human: B, BB; murin: D, DD) Färbung im Vergleich zu unbehandelten Kontrollkulturen nachgewiesen. Eine chondrogene Differenzierung konnte während der Kultivierung der glandulären Stammzellen im Monolayer mittels Alcian Blau vergleichend zu den Kontrollen gezeigt werden (human: E, EE; murin: F, FF).

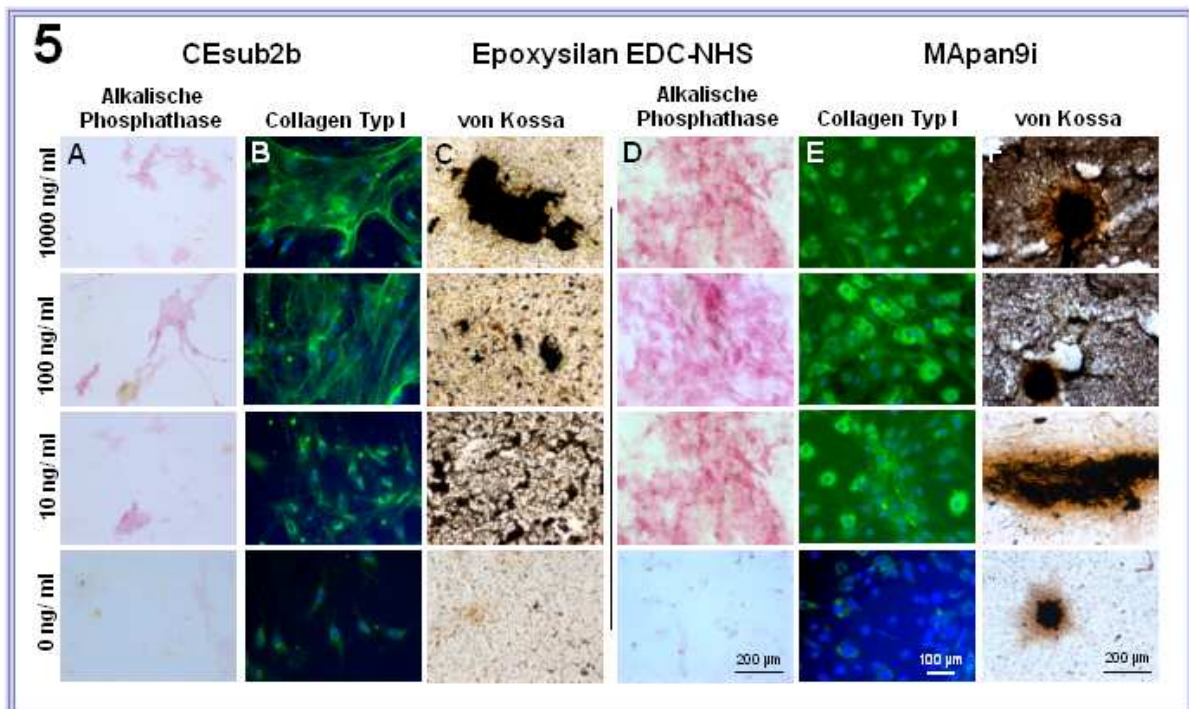
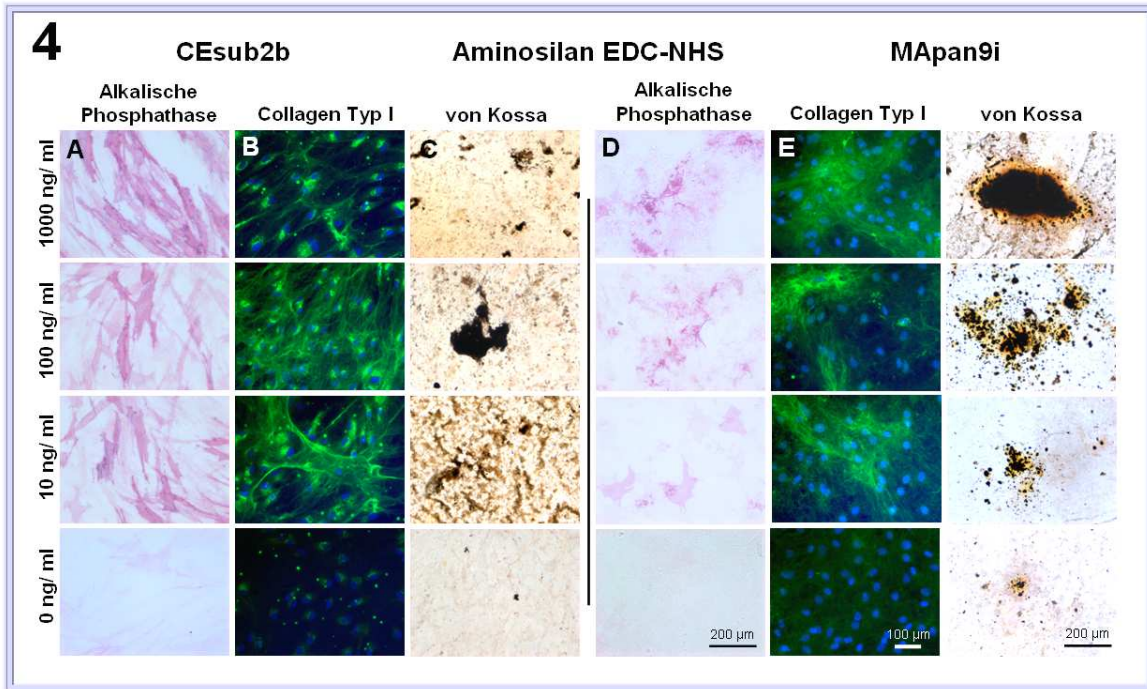
8.1.2 Differenzierung der GSCs mittels immobilisierter

Wachstumsfaktoren auf unterschiedlichen Oberflächen (3.5)

8.1.2.1 Osteogene Differenzierung (3.5.2)







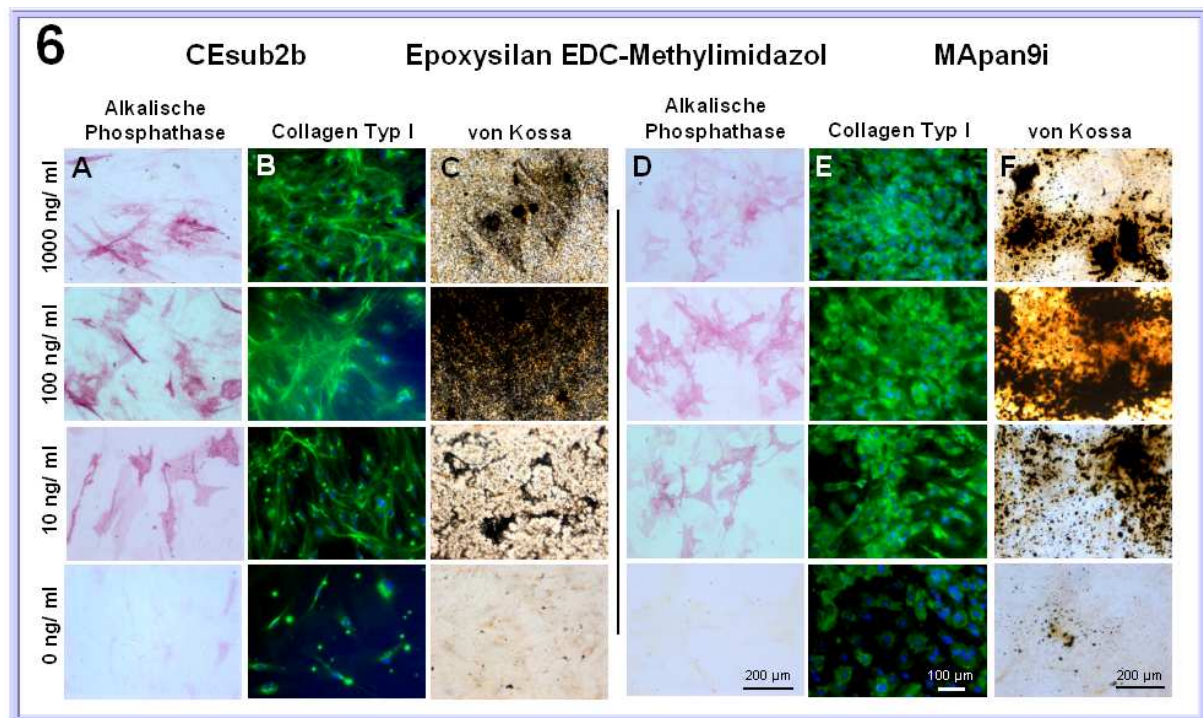


Abbildung 39: Die festphaseninduzierte Differenzierung der humanen und murinen adulten Stammzellen in Osteoblasten zeigt konzentrationsabhängige Differenzierungserfolge induziert durch gekoppeltes BMP-2. In dieser Zusammenstellung sind die osteogenen Differenzierungen der humanen (links) und murinen (rechts) GSCs mittels immobilisiertem BMP-2 auf Polystyren mit Candor-Puffer pH 9,6 (1), Neutravidin mit biotinyliertem BMP-2 (2), auf Aminosilan mit EDC-Methylimidazol (3) bzw. EDC-NHS (4) sowie Epoxysilan mit EDC-NHS (5) bzw. EDC- Methylimidazol (6) dargestellt. Als Untergrund für die kovalente Kopplung von Neutravidin sowie Amino- und Epoxysilan dienten Glasoberflächen. Der Differenzierungserfolg wurde jeweils nach 21 Tagen Differenzierungszeit durch das Anfärben der Alkalischen Phosphatase (ALP) (human: A, murin: D), des Collagen Typ I (human: B, murin: E) und der Visualisierung der Mineralisierung der extrazellulären Matrix durch die von Kossa-Färbung (human: C, murin: F) nachgewiesen.

8.1.3 Kontrolle der Differenzierungsinduktion durch abgelöste Wachstumsfaktoren (3.5.2.2)

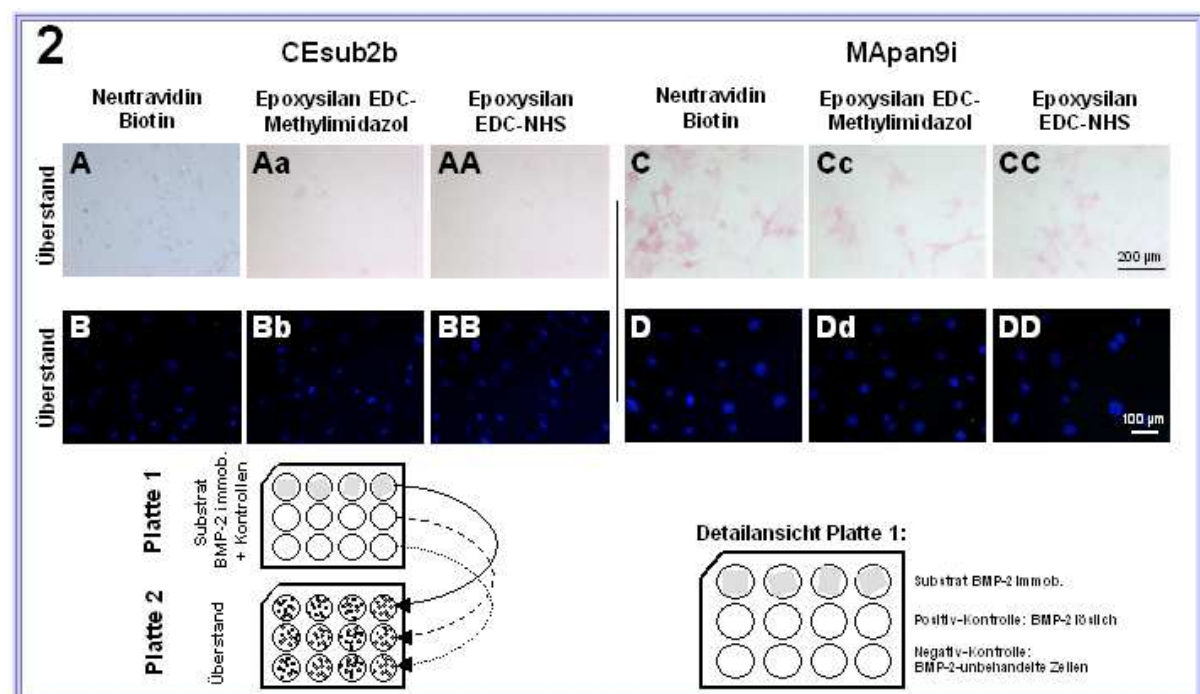
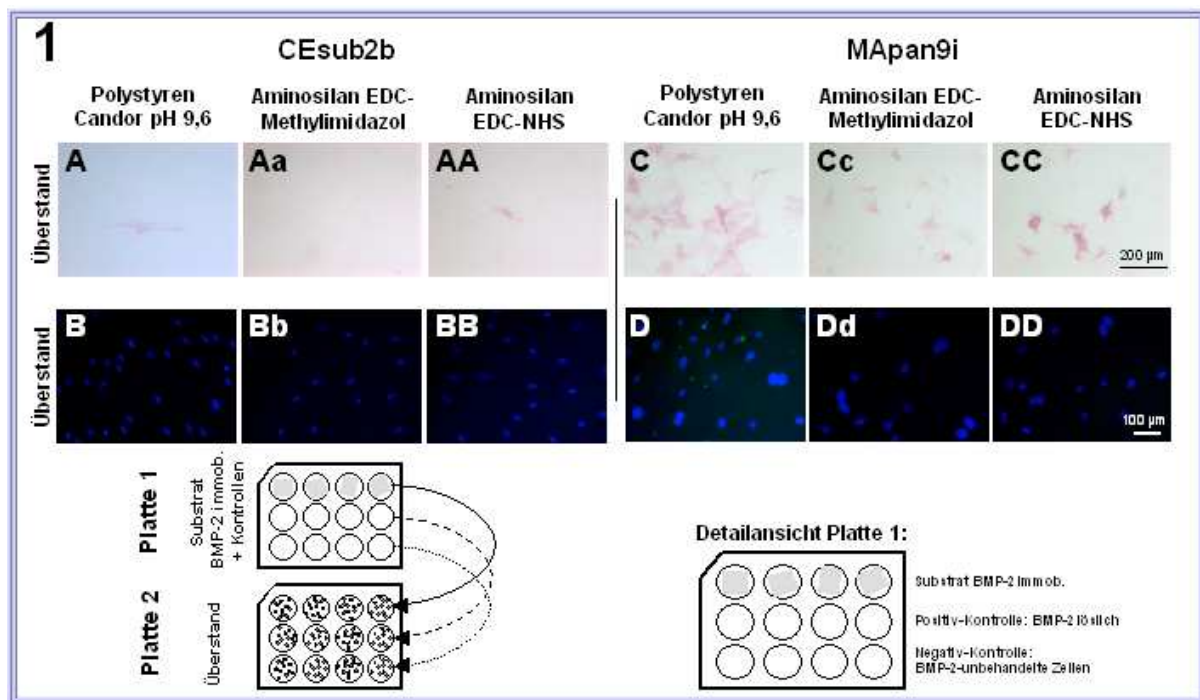


Abbildung 40: Die osteogene Differenzierung kann nicht durch Substratüberstände induziert werden. Die Überprüfung einer Differenzierungsinduktion durch eventuell abgelöste Wachstumsfaktoren wurde neben dem Polystyren Candor-Puffer- (pH 7,4) System auch auf Polystyren mit Candor-Puffer pH 9,6, Aminosilan mit EDC-Methylimidazol bzw. EDC-NHS (1) sowie

auf Neutravidin mit biotinyliertem BMP-2, Epoxysilan mit EDC-Methylimidazol bzw. EDC-NHS (2) durchgeführt. Als Untergrund für die kovalente Kopplung von Neutravidin, Amino- und Epoxysilan dienten Glasoberflächen.

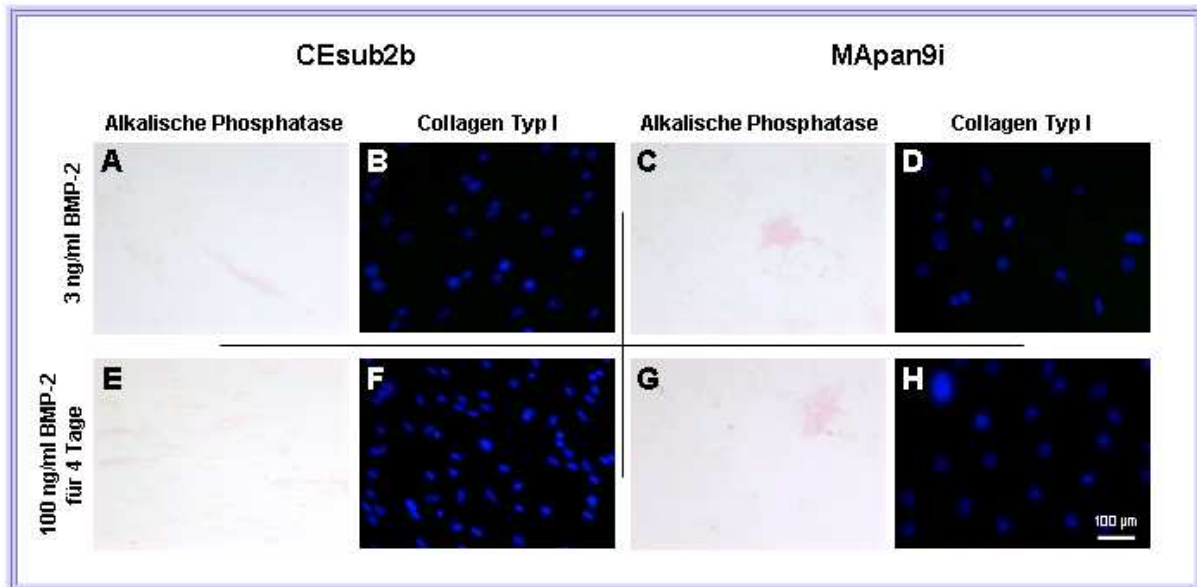
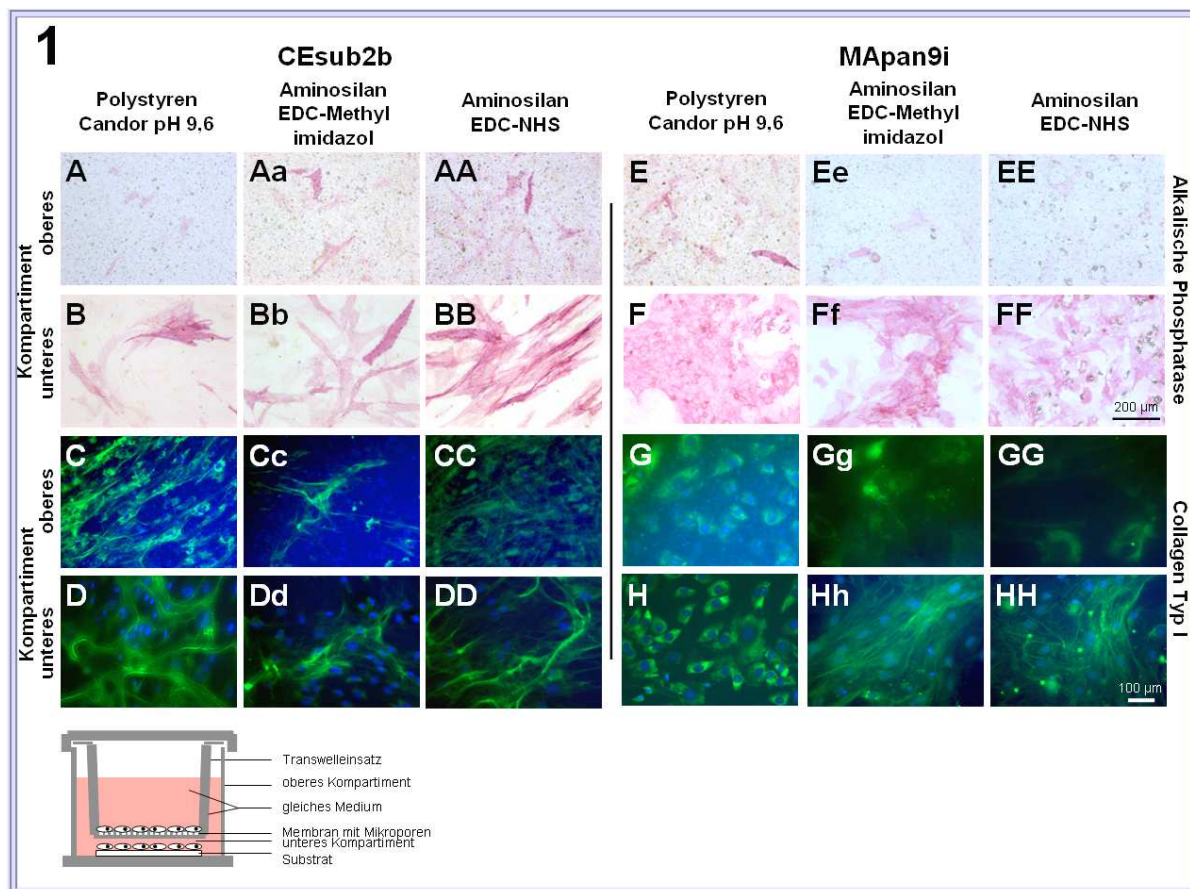


Abbildung 41: Die Induzierung der osteogenen Differenzierung ist durch eine geringe Konzentration von 3 ng/ml BMP-2 im Medium oder dem Bereitstellen des Signalfaktors nur zu Versuchsbeginn nicht möglich. Die Konzentration von 3 ng/ml BMP-2 im Differenzierungsmedium konnte keine osteogene Differenzierung der humanen (A, B) und murinen (C, D) GSCs innerhalb von 21 Tagen induzieren. Ebenfalls wurde keine Differenzierung der adulten Stammzellen in Osteoblasten durch die Applizierung des Differenzierungsfaktors für den Zeitraum von vier Tagen initiiert (human: E, F; murin: G, H). Die Zellen wurden hierbei ab dem fünften bis zum 21. Tag in Differenzierungsmedium ohne BMP-2 kultiviert. In beiden Versuchsansätzen konnten durch Anfärben der ALP (human: A, E; murin: C, G) und des Collagens Typ I (human: B, F; murin: D, H) keine osteogen differenzierten Zellen detektiert werden.

8.1.4 Konditionierung des Mediums durch Zellaktivität (3.5.2.3)



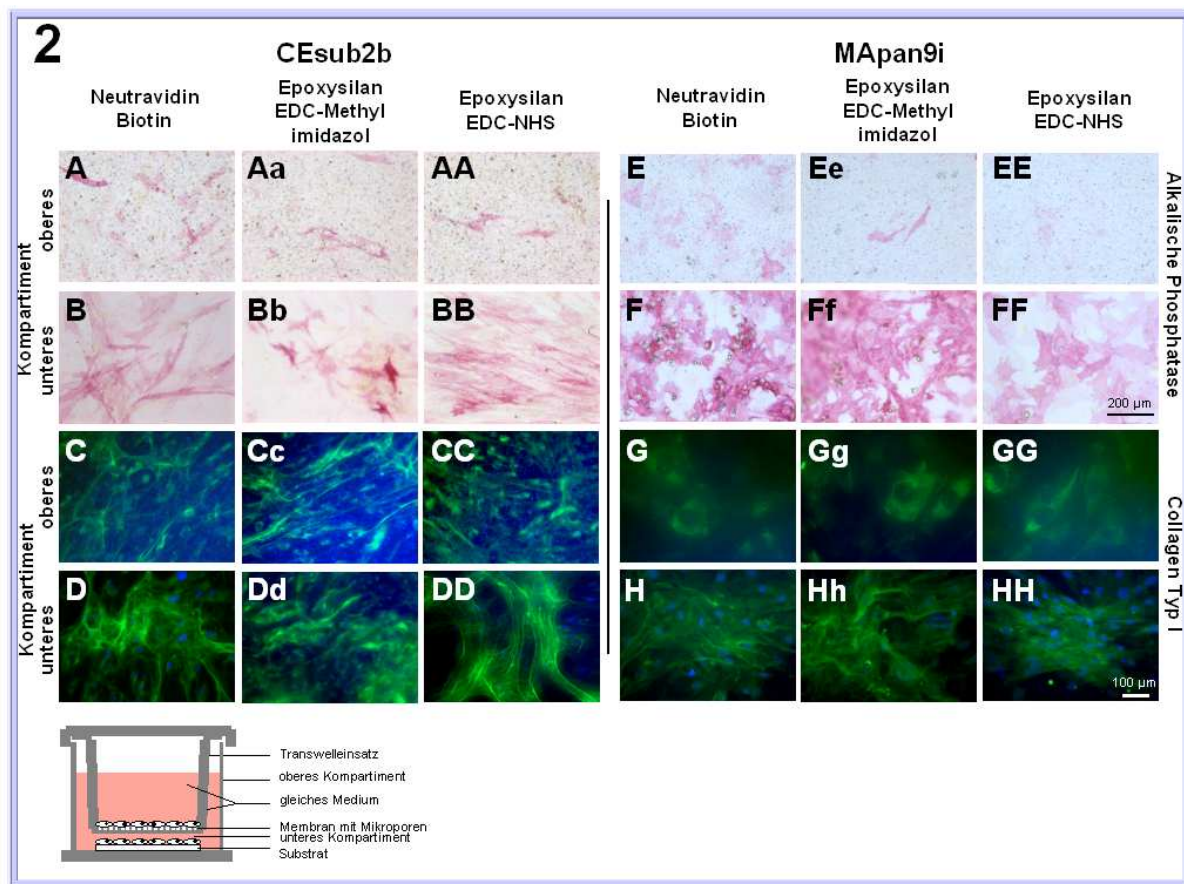
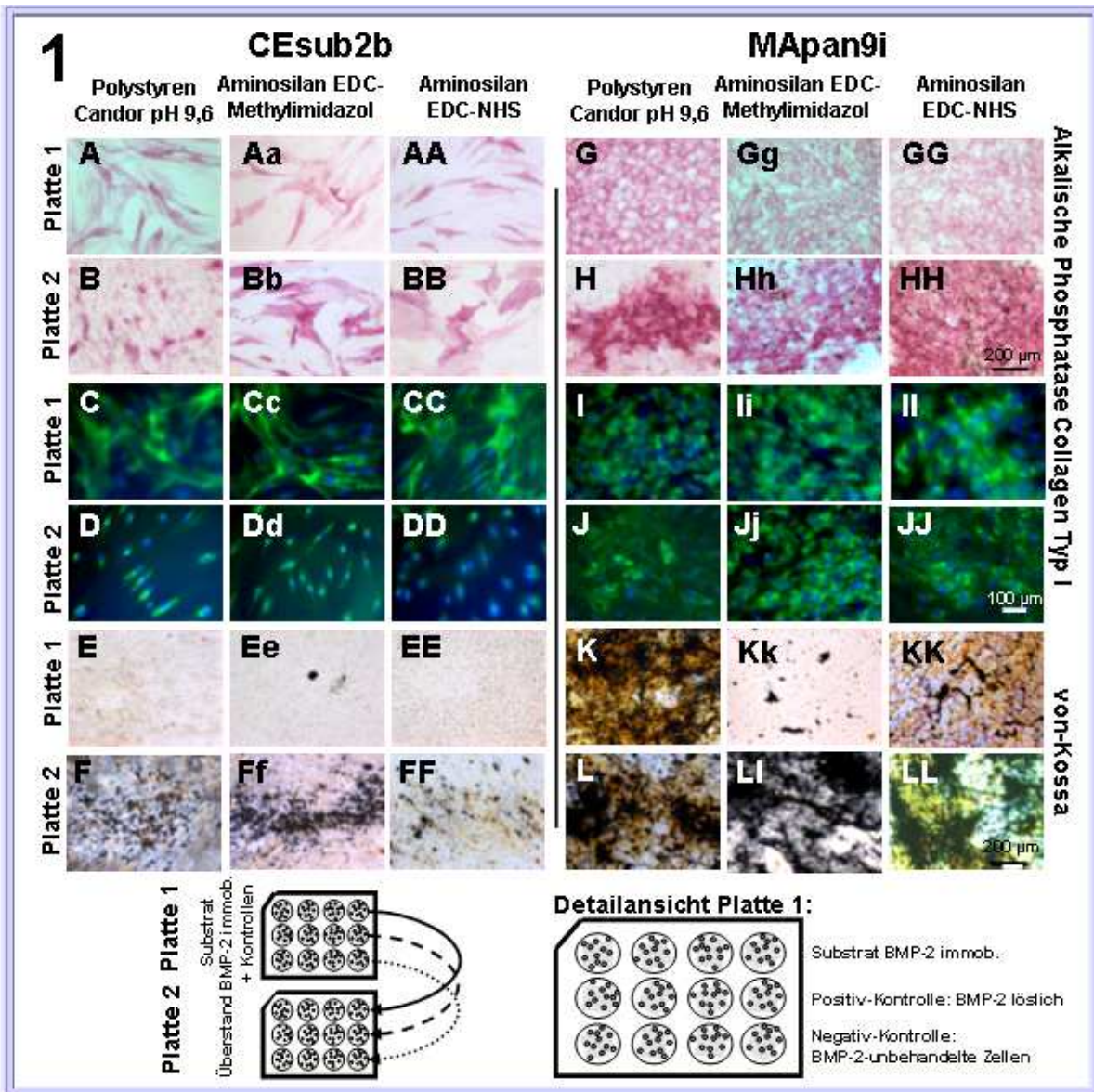


Abbildung 42: Die osteogene Differenzierung kann auch durch konditioniertes Medium induziert werden. Mit Hilfe des Transwellensystems (unten), in dem sich im unteren Kompartiment Zellen auf BMP-2-funktionalisierten Oberflächen und auf der porösen Membran des oberen Kompartimentes befanden, konnte die osteogene Differenzierung durch konditioniertes Medium gezeigt werden. Neben der Kultivierung der GSCs auf BMP-2-modifiziertem Polystyren mittels Candor-Puffer pH 7,4 wurden die Zellen parallel auch auf funktionalisiertem Polystyren mit Candor-Puffer pH 9,6, Aminosilan mit EDC-Methylimidazol bzw. EDC-NHS (1) sowie auf Neutravidin mit biotinyliertem BMP-2, Epoxyasilan mit EDC-Methylimidazol bzw. EDC-NHS (2) im unteren Transwellkompartiment kultiviert. Über das Medium standen die Zellen beider Transwelleinheiten miteinander in Verbindung. Der Differenzierungsnachweis erfolgte durch das Anfärben der ALP und des Collagen Typ I.



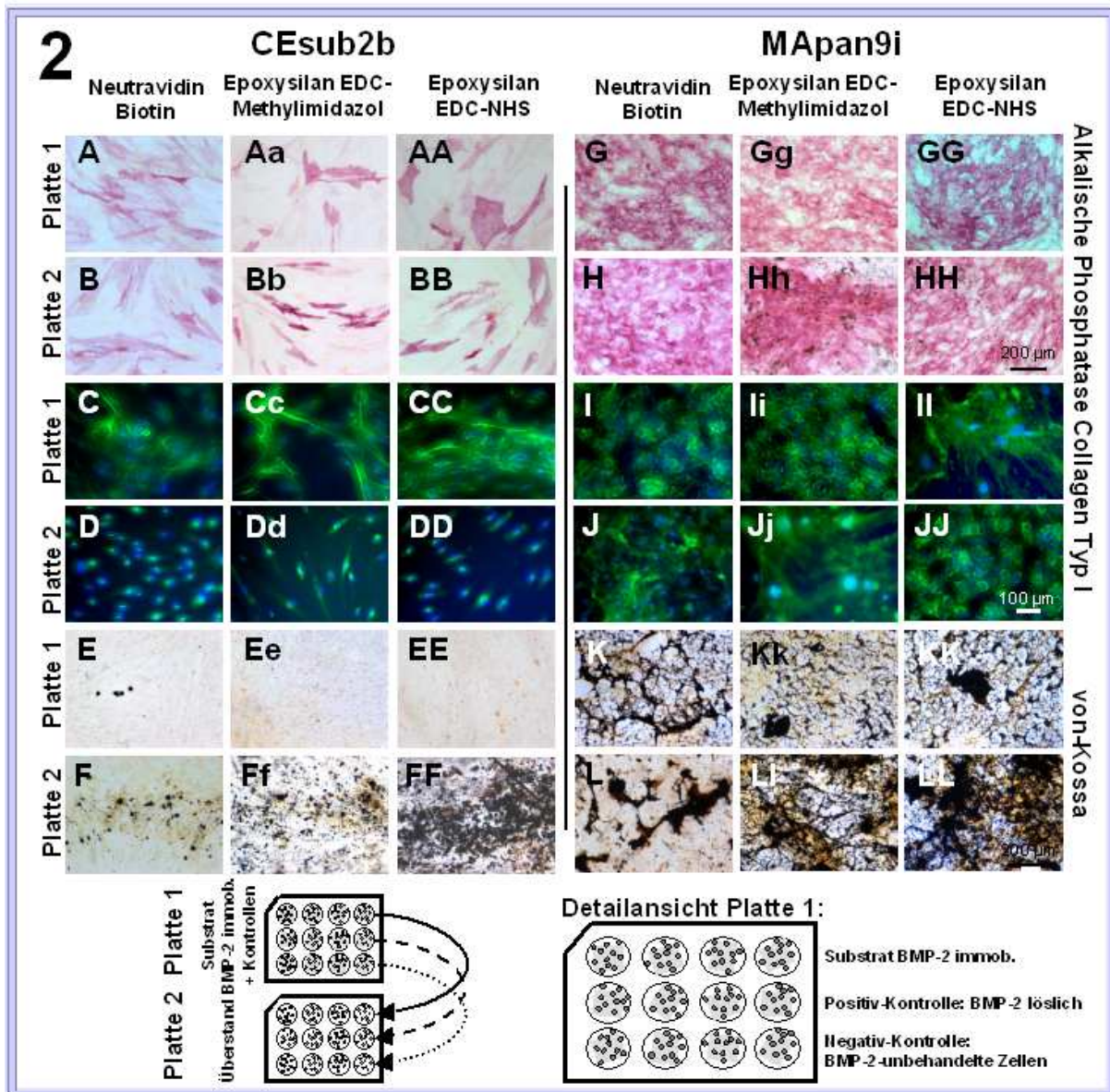


Abbildung 43: Die Induktion der Osteoblastendifferenzierung ist auch durch konditioniertes Medium möglich. Die Darstellung zeigt den Versuchsaufbau (unten) zur Überprüfung von konditioniertem Medium auf den osteogenen Differenzierungserfolg. Die Zellkulturüberstände der GSCs auf wachstumsfaktorfunktionalisierten Substraten wurden im Intervall von vier Tagen zu Zellen auf Standardoberflächen überführt. Die Zellkultivierung erfolgte auf folgenden Oberflächen: Polystyren mit Candor-Puffer pH 9,6, Aminosilan mit EDC-Methylimidazol bzw. EDC-NHS (1) sowie auf Neutravidin mit biotinyliertem BMP-2, Epoxyasilan mit EDC-Methylimidazol bzw. EDC-NHS (2). Als Untergrund für die kovalente Kopplung von Neutravidin, Amino- und Epoxyasilan dienten Glasoberflächen.

Veröffentlichte Arbeiten

Im Folgenden sind die im Rahmen dieser Arbeit entstandenen Publikationen aufgeführt.

Artikel in Fachzeitschriften

Manuskript zum Einreichen
in Vorbereitung

„Immobilised signalling molecules induced the osteogenic differentiation of adult stem cells from exocrine glands“

Claudia Brose; Daniel Schmitt; Meike Reimann, Ph.D.

Annals of Anatomy
Jan 09; 191 (1): 83 - 93

„Directed differentiation of pancreatic stem cells by 2009 soluble and immobilised signalling factors“

Claudia Brose; Daniel Schmitt; Hagen von Briesen, Ph.D.; Meike Reimann, Ph.D.

Journal of Biomedical
Research A
2008 Sep 15; 86 (4): 1033 - 40

“Immobilized cytokines as biomaterials for Materials manufacturing immune cell based vaccines“

Claude Leclerc, Claudia Brose, Cle´mence Nouze´, Fransisca Leonard, Laleh Majlessi, Sybille Becker, Hagen von Briesen and Richard Lo-Man

Posterbeiträge

2008, Kreta
(Griechenland)

„Stem cell differentiation with immobilized factors and cell interaction with nanostructured surfaces“
Nano2Life Final Meeting

2007, Lübeck
(Schleswig-Holstein)

„PSLC differentiation with immobilized factors“
CellProm Stem Cell Workshop

2008 in Sulzbach
(Saarland)

„Adult stem cell differentiation with immobilized cytokines inside the MagnaLab“
CellProm Final Meeting

Erklärung gemäß § 7 Abs. 1 Nr. 4

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

St. Ingbert, den

Claudia Brose

Danksagung

Herrn Professor Günter R. Fuhr möchte ich für das in mich gesetzte Vertrauen bedanken, dieses spannende Thema vollständig und gründlich zu bearbeiten.

Herrn Professor Andreas Meyerhans danke ich für die Bereitschaft und sein Interesse, diese Arbeit vonseiten der Medizinischen Fakultät an der Universität des Saarlandes zu betreuen.

Herrn Professor Hagen von Briesen danke ich für die Betreuung dieser Arbeit.

Mein ganz besonders herzlicher Dank gilt Frau Dr. Meike Reimann und Herrn Diplom Physiker Daniel Schmitt, die mir durch Ihre wertvolle Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei problematischen Fragestellungen und durch vielfältige Diskussionen und Anregungen eine große Hilfe waren.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Diplom Biologen Rothin Strehlow (FhG-IBMT, Institutsteil Golm) und Herrn Dr. Stefan Gerbes (INM, Saarbrücken) für die Bereitstellung der neutravidinierten, aminosilanisierten bzw. epoxysilanisierten Glasoberflächen bedanken.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts möchte ich mich für die angenehme Atmosphäre, die freundliche Hilfsbereitschaft und die stete Bereitschaft zur Beantwortung von Fragen und Problemen bedanken.

Ganz besonders bedanke ich mich auch bei meinem Freund Herrn Diplom Wirtschaftsingenieur Claas Seider und meiner Familie, die mich in jeder Phase meines Lebens und bei all meinen bisherigen Plänen und Visionen unterstützt haben.

9 Lebenslauf

Name: Claudia Brose
Geburtsdatum: 09. 11. 1977
Geburtsort: Templin
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schulbildung

1984 - 1987 Goethe-Oberschule in Templin
1987 – 1989 Werner-Prochnow-Oberschule in Berlin
1989 – 1997 Käte-Kollwitz-Gymnasium in Berlin
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Berufsbildung

08/1997 – 01/ 2000 Ausbildung zur Zahnarzthelferin in Berlin

Studium

10/2000 – 04/2005 Studium der Biologie an der Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn

05/2004 – 04/2005 Diplomarbeit zum Thema: *Einfluss der STX bzw. PST/PSA-NCAM-Überexpression auf die neurale Differenzierung embryonaler Stammzellen und die PSA-NCAM-vermittelte neurale Migration*

Promotion

10/2005 – XX/2010 Dissertation zum Thema: *Kultivierung und Differenzierung adulter Stammzellen und anderer Vorläuferzellen auf biomodifizierten Oberflächen*
