
Nicht invasive Charakterisierung von Differenzierungsprozessen in humanen Stammzellen

Dissertation
zur Erlangung des Grades
des Doktors der Naturwissenschaften
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften
der Universität des Saarlandes

von

Dipl.-Biochem. Cornelia Hildebrandt

Saarbrücken

Januar, 2011

Tag des Kolloquiums:	31.05.2011
Dekan:	Prof. Dr. Maier
Berichterstatter:	Prof. Dr. Fuhr
	Prof. Dr. Lehr
Vorsitz:	Prof. Dr. Walter
Akad. Mitarbeiter:	Dr. Noor

Die experimentellen Untersuchungen dieser Arbeit wurden am Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik (IBMT), St. Ingbert, in der Abteilung Biohybride Systeme und der Abteilung Ultraschall durchgeführt.

Gekürzte Zusammenfassung

Gegenstand dieser Arbeit war die vergleichende Charakterisierung der osteogenen Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark (BM-MSCs), dem Fettgewebe (AT-MSCs) und dem Nabelschnurblut (CB-MSCs) mit der humanen embryonalen Stammzelllinie hES H1 in 2D und 3D *in vitro* Kulturen. Weiterhin wurde evaluiert, ob man Differenzierungsprozesse mit nicht invasiven Verfahren bestimmen kann.

Die Charakterisierung der Stammzellen in 2D demonstrierte ein hohes osteogenes Potential in allen mesenchymalen Stammzellpopulationen, allerdings war das replikative Potential der CB-MSCs stark eingeschränkt. Für die osteogene Differenzierung der Stammzellen wurde ein trägerfreies 3D *in vitro* Modell (Sphäroid) etabliert. In diesem Modellsystem war es nicht möglich, die osteogene Differenzierung der hES H1-Zellen zu induzieren, obwohl diese Zellen in 2D-Zellkulturen erfolgreich in Osteoblasten differenzierbar waren.

Die Untersuchung der Sphäroide mittels Impedanzspektroskopie demonstrierte charakteristische Veränderungen der Spektren infolge des Differenzierungsprozesses. Die Heterogenität der osteogenen Sphäroide nahm mit fortschreitender Differenzierung zu, wobei AT-MSCs schneller differenzierten als BM-MSCs. Zelluläre Strukturen sowie fibrilläre ECM und deren Kalzifizierung wurden mittels akustischer Mikroskopie in 2D-Kulturen abgebildet. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die mechanischen Eigenschaften der Zellkulturen spezifisch für multipotente Differenzierungsprozesse waren.

Abstract

The purpose of this study was a comparative characterization of the osteogenic potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow (BM-MSCs), adipose tissue (AT-MSCs) and cord blood (CB-MSCs) and the human embryonic stem cell line hES H1 in 2D and 3D *in vitro* cultures. For the investigation of the differentiation process, non-invasive techniques were implemented and evaluated.

The basic characterization of the stem cell cultures demonstrated a high osteogenic potential in all mesenchymal stem cell populations, but a reduced replicative capacity was shown in CB-MSCs. A self-contained 3D *in vitro* model (spheroid) for the osteogenic differentiation of the stem cells was established. In this *in vitro* model, it was not possible to induce osteogenic development of hES H1, while in 2D-cultures these cells differentiated into the osteogenic lineage successfully.

The investigation of the spheroids by impedance spectroscopy demonstrated characteristic changes in the recorded spectra. The heterogeneity of the spheroids increased according to the differentiation process at which AT-MSCs differentiated faster than BM-MSCs. Acoustic microscopy aimed in investigation of differentiation processes in monolayer cultures detecting cell structures as well as fibres of ECM and its mineralization. Further, specific changes in the mechanical properties of these cells were demonstrated related to multipotent differentiation processes.

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Die Arbeit wurde bisher weder im In- oder Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem Verfahren zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt.

Saarbrücken, den 25.01.2011

Cornelia Hildebrandt

Formelzeichen

Impedanzspektroskopie

Zeichen	Bedeutung	Einheit
A	Fläche	m^2
a	Dispersionsparameter	-
a_u	Effektivwert der Spannung	V
a_i	Effektivwert des Stroms	A
C	Kapazität	F
C_m	Kapazität der Zellmembran, Abb. 15A	F
$C_m^* = 2C_m$	Kapazität der Zellmembran, Abb. 15B	F
C_{mem}	Kapazität der Zellmembran, Abb. 16	F
CPE	<i>constant phase element</i> ; auch Cole-Element	
CPE_1 / CPE_2	Kapazitäten der Membran bei Modellbildung	F
$CPE_{elektronde}$	Kapazität des Meßsystems	F
CPE_{streu}	parasitäre Streukapazität	F
$CPE - P / P$	Dispersionsparameter eines Cole-Element	-
$CPE - T / T$	elektrische Kapazität eines Cole-Element	$\text{Fs}^{\alpha-1}$
D	elektrische Flussdichte	
d	Abstand	m
E	elektrische Feldstärke	V m^{-1}
ε	Permittivität/Dielektrizitätskonstante	F m^{-1}
f	Frequenz	Hz
φ	Phasenwinkel	°
i	komplexe Größe	
i	Wechselstrom, Gl. 5 und Gl. 6	A
j	Stromdichte	A m^{-2}
κ	elektrische Leitfähigkeit	S^{-1}
π	Kreiszahl	-
R	Widerstand	Ω
R_1	Widerstand des Messsystems	Ω
R_e	extrazellulärer Widerstand	Ω
R_{extra}	extrazellulärer Widerstand bei Modellbildung	Ω
$R_{extra,p} / R_{intra,p}$	extrazellulärer/intrazellulärer Widerstand, parallel, Abb. 16	Ω
$R_{extra,s} / R_{intra,s}$	extrazellulärer/intrazellulärer Widerstand, seriell, Abb. 16	Ω
R_i	intrazellulärer Widerstand	Ω
R_{intra}	intrazellulärer Widerstand bei Modellbildung	Ω
R_m	Widerstand der Zellmembran, Abb. 15A	Ω
$R_m^* = 2R_m$	Widerstand der Zellmembran, Abb. 15B	Ω

Formelzeichen

R_∞	Widerstand bei unendlicher Frequenz	Ω
R_0 mit $R_0 = R_\infty + R$	Widerstand bei Nullfrequenz	Ω
t	Zeit	s
τ mit $\tau = (2\pi f)^{-1}$	Relaxationszeitkonstante eines RC -Gliedes	s
u	Wechselspannung	V
ω mit $\omega = 2\pi f$	Winkel- oder Rotationsgeschwindigkeit	s^{-1}
Z	Komplexe elektrische Impedanz	Ω
$ Z $	Betrag der Impedanz	Ω
Z'	Realteil der Impedanz (Wirkwiderstand; Resistanz)	Ω
Z''	Imaginärteil der Impedanz (Blindwiderstand; Reaktanz)	Ω

Akustische Mikroskopie

Zeichen	Bedeutung	Einheit
c	Schallgeschwindigkeit	$m\ s^{-1}$
c_1	Schallgeschwindigkeit im 1. Medium	$m\ s^{-1}$
c_2	Schallgeschwindigkeit im 2. Medium	$m\ s^{-1}$
f	Frequenz	Hz
I	Schallintensität	$W\ m^{-2}$
I_r	Intensität des reflektierten Schalls	$W\ m^{-2}$
I_t	Intensität des transmittierten Schalls	$W\ m^{-2}$
I_i	Intensität des einfallenden Schalls	$W\ m^{-2}$
K	Kompressionsmodul	Pa
λ	Wellenlänge	m
p	Schalldruck	Pa
p_r	Schalldruck der reflektierten Welle	Pa
p_i	Schalldruck der einfallenden Welle	Pa
R	Reflexionskoeffizient	
v	Schallschnelle	$m\ s^{-1}$
θ_1	Einfallswinkel des Schalls auf einer Grenzfläche	
θ_2	Ausbreitungswinkel des Schalls im zweiten Medium nach Brechung an einer Grenzfläche	
Z_1	akustische Impedanz des Mediums 1	Rayl
Z_2	akustische Impedanz des Mediums 2	Rayl

Abkürzungsverzeichnis

ALP	Alkalische Phosphatase
Alpha-MEM	Bezeichnung für ein basales Zellkulturmedium
A-Projektion	Amplituden-Projektion eines Echos in Abhängigkeit von der Zeit
AT-MSCs	mesenchymale Stammzellen aus dem Fettgewebe
At%	Flächenprozent
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BM-MSCs	mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark
BMP-2	<i>bone morphogenic protein 2</i>
B-Projektion	vertikales akustisches Schnittbild
BSA	bovines Serumalbumin
BSP	<i>bone sialoprotein 2</i>
°C	Grad Celsius
CB-MSCs	mesenchymale Stammzellen aus dem Nabelschnurblut
CD	<i>cluster of differentiation</i> , z.B. CD90
CPE	<i>constant phase element</i>
C-Projektion	horizontales akustisches Schnittbild
CT	<i>cycle treshold</i>
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliertes Wasser
DiOC	3,3-Dihexyloxacarbocyanine-iodid (DiOC ₆ (3))
DMEM	Dulbeco`s modifiziertes Eagle Medium
DMEM/F12	Dulbeco`s modifiziertes Eagle Medium/Nährstoffmischung F12
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EB	<i>embryoid body</i>
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylen-diamin-tetraacetat
eV	Elektronenvolt
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> ; synonym für Durchflusszytometrie
F-Aktin	filamentäres Aktin
FDA/Pi	Fluoresceindiacetat/Propidiumjodid
FKS	fötales Kälberserum

Abkürzungsverzeichnis

g	Gravitationsbeschleunigung
gDNA	genomische Desoxyribonukleinsäuren
GHz	Gigahertz
GMP	<i>good manufacturing practice</i>
h	Stunde
IgG	Immunglobulin G
HA	Hydroxylapatit
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure
hES H1	humane embryonale Stammzelllinie H1
HIF-1 α	<i>hypoxia-inducible factor</i>
Hz	Hertz
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IGF-1	<i>insulin-like growth factor</i>
iPS	<i>induced-pluripotent stem cells</i>
ITS	Insulin, Transferin und Selenit
keV	Kiloelektronenvolt
kHz	Kilohertz
Kol-1	Kollagen-1
Kol-3	Kollagen-3
MAPCs	<i>multipotent adult progenitor cells</i>
MAP-Kinase	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
max.	maximal
MEFs	<i>mouse embryonic fibroblasts</i>
MHz	Megahertz
min	Minute
mind.	mindestens
mM	Millimol
μ m	Mikrometer
MSCs	mesenchymale Stammzellen
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
n	Probenanzahl
NIH	<i>National Institutes of Health, USA</i>
NSCB	<i>National Stem Cell Bank, Madison, USA</i>
OC	Osteocalcin
OD	optische Dichte
OPN	Osteopontin
P	Passagezahl
PBS	<i>phosphat buffered saline</i>

Abkürzungsverzeichnis

PCR	Polymerasekettenreaktion
PD	Populationsverdopplung
Poly-HEMA	Poly-2-Hydroxyethylmethacrylate
PPAR γ	<i>peroxisome proliferator-activated receptor γ</i>
PTH	<i>parathyroid hormone</i>
PTHrP	<i>parathyroid hormon-related peptide</i>
R ²	Bestimmtheitsmaß der Regressionsanalyse, statistischer Fehler einer abhängigen Variablen
RANK	<i>receptor for activation of nuclear factor kappa B</i>
RANKL	<i>receptor for activation of nuclear factor kappa B ligand</i>
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	<i>real time</i> Polymerasekettenreaktion
RUNX2	<i>runt-related transcription factor 2</i>
SD	Standardabweichung
sec	Sekunde
sog.	sogenannt
SOP	<i>standard operating protocol</i>
TCSCs	<i>tissue-committed stem cells</i>
TE	Tris-Essigsäure/Ethylen-diamin-tetraacetat
TGF- β 3	<i>transforming growth factor β3</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
v/v	Volumen/Volumen
WST-1	<i>water soluble tetrazolium</i>
Wt%	Gewichtsprozent
w/v	Gewicht/Volumen

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Fuhr für die Überlassung des Themas sowie für die Möglichkeit, diese Arbeit am Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik durchführen zu können. Weiterhin danke ich ihm für die Bereitstellung der finanziellen Mittel, die diese Arbeit ermöglicht haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Lehr, Inhaber des Lehrstuhles für Biopharmazie und Pharmazeutische Technologie am Institut für Pharmazie der Universität des Saarlandes, für die Übernahme des Koreferates dieser Arbeit.

Ich danke Herrn Dr.-Ing. Thielecke, Leiter der Abteilung Biohybride Systeme, für die Betreuung dieser Arbeit.

Des Weiteren bin ich Frau Dr. Karin Bieback, Transfusionsmedizin Mannheim, und Dr. M. Maue und Dr. M. Hassinger, evangelisches Krankenhaus Zweibrücken, für die Bereitstellung der Zellkulturen und von Biopsiematerial zu sehr großem Dank verpflichtet.

Ich danke Herrn Dr.-Ing. Impidjati und Herrn Dr.-Ing. Cho für die Zusammenarbeit bei den Impedanzmessungen, Alisa Katsen-Globe für die REM-Aufnahmen und Herrn Dr. Lemor und Herrn Dr. Weiss für die Unterstützung am SASAM-System.

Mein persönlicher Dank gilt den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung Biohybride Systeme und der Abteilung Zellbiologie und angewandte Virologie für die Unterstützung und das freundschaftliche Arbeitsklima. Insbesondere danke ich Herrn Ehrhard und Frau Carstensen für die technische Assistenz bei der Laborarbeit.

Ich danke Herrn Dr. Gorjup, Frau Kohl und Herrn Dr. Lermen für die Durchsicht der Arbeit.

Cornelia Hildebrandt

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Stammzellen	2
1.1.1 Embryonale Stammzellen.....	3
1.1.2 Adulte mesenchymale Stammzellen	5
1.1.3 <i>In vitro</i> Modelle für die osteogene Differenzierung	8
1.1.4 Potential der MSCs in der regenerativen Medizin	10
1.2 Aufbau des Knochengewebes	11
1.2.1 Extrazelluläre Knochenmatrix.....	13
1.2.2 Osteoblastäre Differenzierungskaskade.....	14
1.2.3 Induktion der osteogenen Differenzierung.....	15
1.3 Knorpel und chondrogene Differenzierung	17
1.4 Fettgewebe und adipogene Differenzierung	18
1.5 Impedanzspektroskopie	19
1.5.1 Physikalische Grundlagen der Impedanzspektroskopie.....	21
1.5.2 Aufbau eines Impedanzmesssystems	23
1.5.3 Modellbildung	25
1.5.4 Impedanzbasierte Systeme zur Zell- und Gewebecharakterisierung	30
1.6 Akustische Mikroskopie	31
1.6.1 Physikalische Grundlagen der Akustik	31
1.7 Zielsetzung	34
2. Material und Methoden	37
2.1 Allgemeine Angaben	37
2.2 Zellbiologische Methoden	37
2.2.1 Verwendete Zellen.....	37
2.2.2 Präparation der mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark.....	37
2.2.3 Passage und Kultivierung der MSCs.....	38
2.2.4 Zellzahlbestimmung.....	38
2.2.5 Kryokonservierung.....	39
2.2.6 Induktion der Differenzierung in 2D-Zellkulturen	39
2.2.7 Kultivierung und Wachstumsinhibierung der MEFs.....	39
2.2.8 Kultivierung der hES H1, EB-Formation und Differenzierung.....	40

2.2.9 Zellaggregation und osteogene Differenzierung in 3D	41
2.2.10 Durchflusszytometrie	43
2.2.11 WST-1-Test	43
2.2.12 FDA/Pi-Färbung.....	44
2.2.13 DiOC-Membranfärbung	44
2.2.14 Präparation der Gefrierschnitte	44
2.2.15 Probenvorbereitung für die Histologie	44
2.2.16 Immunhistologische Färbungen	45
2.2.17 Alkalische Phosphatase-Färbung.....	45
2.2.18 Histochemische Färbung nach von Kossa	45
2.2.19 Aktin-Färbung mittels Phalloidin	46
2.2.20 Alizarinrot-Färbung	46
2.2.21 Osteogenese-Assay	46
2.2.22 Oil red O-Färbung.....	47
2.2.23 Safranin O-Färbung.....	47
2.2.24 Alcianblau-Färbung	47
2.2.25 <i>real time</i> PCR	47
2.3 Impedanzspektroskopie	50
2.3.1 Erstellung eines Programms zur Auswertung der Impedanzspektren.....	53
2.3.2 Elektrische Modellbildung.....	54
2.3.3 Regressionsanalyse des Phasengangs	55
2.4 Akustische Mikroskopie	56
3. Ergebnisse	60
3.1 Grundlegende Charakterisierungen der Stammzellkulturen.....	60
3.1.1 Zellmorphologie adulter Stammzellen	60
3.1.2 Proliferationspotential adulter Stammzellen	60
3.1.3 Charakterisierung der embryonalen Stammzellen	61
3.1.4 Embryoid Bodies	63
3.1.5 Expression mesenchymaler Marker in MSCs und hES H1	64
3.1.6 Osteogene Differenzierung adulter MSCs in 2D-Zellkulturen.....	65
3.1.7 Charakterisierung zellulärer Strukturen im Rasterelektronenmikroskop	67
3.1.8 Osteogene Differenzierung der hES H1 in 2D-Zellkulturen.....	70
3.1.9 Quantifizierung der Mineralisierung.....	72

3.1.10 Osteogenese-Assay	73
3.2 Etablierung eines trägerfreien 3D <i>in vitro</i> Modells für die osteogene Differenzierung	75
3.2.1 Vergleich unterschiedlicher Kulturtechniken.....	75
3.2.2 Größenentwicklung und metabolische Aktivität.....	77
3.2.3 Osteogene Differenzierung der Sphäroide	78
3.2.4. Quantifizierung der Expression osteoblastentypischer Gene.....	81
3.3 Impedanzspektroskopische Charakterisierung der osteogenen Differenzierung in 3D	83
3.3.1 Programm zur Auswertung der Impedanzspektren	83
3.3.2 Evaluierung zufälliger Einflüsse auf die Impedanzmessung	84
3.3.3 Einfluss der Sphäroidgröße auf die Impedanzmessung.....	86
3.3.4 Impedanzspektren der BM-MSK-basierten Sphäroide.....	89
3.3.5 Impedanzspektren der AT-MSK-basierten Sphäroide.....	92
3.3.6 Impedanzspektren der hES H1-basierten Sphäroiden	97
3.3.7 Modellbildung	100
3.3.8 Quantitative Bestimmung der zellulären Parameter nach Modellbildung.....	102
3.3.9 Untersuchung der Dispersion im Phasengang	105
3.3.10 Zellbiologische Charakterisierung der Sphäroide.....	111
3.4 Charakterisierung der multipotenten Differenzierung mittels akustischer Mikroskopie.....	117
3.4.1 Darstellung vitaler BM-MSKs mittels akustischer Mikroskopie.....	117
3.4.2 Quantifizierung der mechanischen Eigenschaften	121
3.4.3 Darstellung BM-MSK-basierter Sphäroide	122
3.4.4 Untersuchung des Aktinzytoskeletts.....	123
3.4.5 Untersuchung der extrazellulären Matrix und spezifischer Zellorganellen	124
4. Diskussion	126
4.1 Grundlegende Charakterisierungen der Zellkulturen	126
4.2 Etablierung eines trägerfreien 3D <i>in vitro</i> Modells für die osteogene Differenzierung	132
4.3 Impedanzspektroskopische Charakterisierung der osteogenen Differenzierung in 3D	135
4.4 Charakterisierung der multipotenten Differenzierung mittels akustischer Mikroskopie.....	141
4.5 Kapitelübergreifende Diskussion	144

5. Zusammenfassung	149
6. Ausblick	152
7. Anhang	155
7.1 Material, Geräte und Lösungsformulierungen	155
7.2 Programm zur Auswertung der Impedanzspektren	165
7.3 Durchflusszytometrie	169
7.4 Modellbildung	174
7.5 Genehmigung zur Verwendung humaner embryonaler Stammzellen	176
7.6 Liste der Veröffentlichungen	180
7.7 Literatur	183
7.8 Lebenslauf	201



1. Einleitung

Die Fähigkeit von Stammzellen zur Replikation und Differenzierung in spezialisierte Gewebezellen ermöglicht die Rekonstruktion von Organen und Geweben basierend auf autologem Zellmaterial. Neben Gewebeersatz nach Traumata oder kanzerogenen Erkrankungen ist – insbesondere in Hinblick auf die demographische Entwicklung der Bevölkerung – mit einem steigenden Bedarf an Knochen und Knochenersatzmaterialien durch degenerative Prozesse des osteoskelettalen Apparates zu rechnen. Konventionell werden metallische Transplantate zur Stabilisierung großer Kontinuitätsdefekte oder von Knochenbrüchen verwendet. Diese werden allerdings vom Empfängergewebe nicht optimal integriert, woraus eine verminderte mechanische Belastbarkeit resultiert (Dekker *et al.*, 2003). Eine Alternative stellen keramische oder kalziumphosphatbasierte Trägermaterialien dar, die eine bessere chemische Bindung der Zellen und des Knochengewebes ermöglichen (Ohgushi *et al.*, 1999). Dabei zeigt eine Vielzahl von Forschungsergebnissen, dass eine Besiedlung dieser Knochenersatzmaterialien mit MSCs zu einer sehr guten Gewebeintegration führen und zudem der Prozess der Knochenneubildung induziert wird (Cancedda *et al.*, 2003, Ohgushi *et al.*, 2003). Im Bereich der Knorpelregeneration ist ebenfalls eine verbesserte Gewebeheilung durch eine zusätzliche Besiedlung verschiedener Ersatzmaterialien mit MSCs belegt (Jung *et al.*, 2009, Wilke *et al.*, 2007).

Da die Verfügbarkeit humaner primärer Gewebezellen stark limitiert ist und sich die reifen Gewebezellen zudem nicht mehr replizieren, werden durch die spezifischen zellulären Eigenschaften von Stammzellen progressive Ansätze in der zellbasierten *in vitro* Forschung eröffnet. Diese adulten Stammzellen repräsentieren eine Ressource humaner Zellen zur Untersuchung entwicklungsbiologischer Prozesse und die Etablierung differenzierter Gewebezellkulturen für pharmazeutische und toxikologische *screenings*. Bislang erfolgen diese Untersuchungen an tierischen *in vitro* Kulturen oder humanen gewebespezifischen Krebszelllinien, wie z.B. die humanen Osteosarkomzellen SAOS-2. Diese zeigen teilweise ähnliche Eigenschaften wie primäre Osteoblasten, z.B. die Expression mineralisierter ECM (Rodan *et al.*, 1987), unterscheiden sich aber in ihren proliferativen Eigenschaften und dem Expressionsprofil osteoblastenassoziierter Markerproteine (Spreafico *et al.*, 2006). In Anbetracht der Relevanz von Ergebnissen, die an diesen Modellsystemen gewonnen werden, sind humane stammzellbasierte *in vitro* Modelle von wachsender Bedeutung. Eine konventionelle Kultivierung von adhärenenten Zellen erfolgt in artifiziellen zweidimensionalen (2D) Zellverbänden auf Kunststoffsubstraten. Da aber der Einfluss der zellulären Umgebung auf zellbiologische Prozesse wie Proliferation, Migration, Differenzierung und Apoptose bekannt ist (Rossi *et al.*, 2005), konzentriert sich die Forschung auf die Etablierung von Zellkulturtechniken, die die Verhältnisse *in vivo* imitieren. Durch eine Kultivierung von Zellen in dreidimensionalen (3D) Zellverbänden, z.B. in Aggregaten oder auf Trägermatrices bestehend aus physiologischen Materialien, werden 3D-Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Interaktionen ermöglicht, die regulativ auf diese zellulären Prozesse wirken (Berrier *et al.*, 2007). So könnte der Einsatz von 3D *in vitro* Kulturmodellen basierend auf humanen Zellen als physiologische Testsysteme für pharmakologische *screenings* langfristig zu einer Reduktion von Tierversuchen führen.

Unabhängig von einer potentiellen Applikation im Bereich der regenerativen Medizin oder der *in vitro* Forschung stellt sich das Problem der Charakterisierung und Überwachung der Zellkulturen. Die meisten molekularbiologischen und proteinbiochemischen Techniken zur

Zellcharakterisierung, wie z.B. PCR, Proteinblotts, FACS/Durchflusszytometrie und histologische Färbungen, sind invasiv und zudem zeitaufwendig. Da aber eine ständige Prozesskontrolle eine Voraussetzung für medizinische Applikationen und für standardisierte Hochdurchsatz-*screenings* darstellt, gewinnen nicht invasive analytische Verfahren an Bedeutung. Neben der optischen Mikroskopie, die eine subjektive phänomenologische Beurteilung der Zellkulturen bezüglich der Konfluenz, der Morphologie, der Migration sowie von Ablösungsprozessen oder Apoptose ermöglicht, leisten nicht invasive Verfahren, wie Ultraschall oder Impedanzspektroskopie, eine direkte objektive Messung zellspezifischer Parameter. Diese Verfahren können unter sterilen und GMP-konformen Bedingungen erfolgen, wodurch neue Möglichkeiten zur Langzeitüberwachung der Zellkulturen realisiert werden.

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Etablierung eines trägerfreien *in vitro* Modells für die osteogene Differenzierung und deren Charakterisierung mittels Impedanzspektroskopie. Im Vordergrund steht dabei die Frage, ob Impedanzspektroskopie eine konkrete Identifizierung spezifischer osteogeneseassoziiierter Prozesse in den Aggregaten leistet. Da beim gegenwärtigen Stand der Forschung über das Potential von Stammzellen aus unterschiedlichen Geweben diskutiert wird, werden humane adulte mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark, dem Fettgewebe und dem Nabelschnurblut sowie die humane embryonale Stammzelllinie H1 vergleichend charakterisiert. Ein weiterer Ansatz zur nicht invasiven Zellcharakterisierung sind ultraschallbasierte Verfahren. Hochfrequenter Ultraschall ermöglicht eine Auflösung im Mikrometerbereich (μm), wodurch eine Erfassung von zellulären Strukturen technisch möglich ist. Ein Vorteil dieses Verfahrens gegenüber konventioneller optischer Mikroskopie besteht darin, dass nicht nur Strukturen auf der Oberfläche der Zellkulturen dargestellt werden können, sondern eine Abbildung interner Strukturen innerhalb eines multiplen Zelllayers ermöglicht wird. Aber es bleibt offen, ob dieses bildgebende Verfahren, welches auf makroskopischer Ebene die verschiedenen Gewebe aufgrund der spezifischen mechanischen und strukturellen Eigenschaften diskriminiert, auf den mikroskopischen Kontext übertragbar ist. In einem Teilgebiet dieser Arbeit wird daher untersucht, ob die spezifischen zellmechanischen Eigenschaften als nicht invasiver Marker für Differenzierungsprozesse fungieren.

1.1 Stammzellen

Stammzellen werden durch die Fähigkeit zur Replikation und zur Differenzierung in spezialisierte Gewebezellen definiert, womit die zentrale Funktion dieser Zellen bei der Embryogenese, aber auch beim Gewebeaufbau und bei regenerativen Prozessen im adulten Organismus wiedergespiegelt wird. Je nachdem wie ausgeprägt dieses Potential bei den spezifischen Stammzelltypen ist, erfolgt eine weitere Einteilung. Das Differenzierungspotential ist mit zunehmender Spezialisierung eingeschränkt. Während unipotente Stammzellen in einen spezifischen somatischen Zelltyp differenzieren, können sich multipotente Zellen in verschiedene spezialisierte Gewebezellen entwickeln. Wenn dieses Differenzierungspotential sich über das Ursprungsgewebe der Stammzellen hinaus erstreckt, z.B. dem mesenchymalen Keimblatt, bezeichnet man diesen Stammzelltyp als pluripotent. Eine Totipotenz, das Vermögen einen mehrzelligen funktionalen Organismus aufzubauen, wurde bislang nur in der Zygote, der befruchteten Eizelle, bis maximal zum Achtzellstadium nachgewiesen.

Pluripotenz wird mit embryonalen Stammzellen assoziiert. Neuere Forschungsergebnisse belegen, dass dieses Differenzierungspotential ebenfalls durch Gentransfer verschiedener pluripotenzassoziierter Transkriptionsfaktoren OCT-3/4, Klf4, c-Myc und SOX-2 in somatischen Zellen, wie z.B. humanen oder murinen Fibroblasten (Takahashi *et al.*, 2006, Okita *et al.*, 2007, Nakagawa *et al.*, 2008, Woltjen *et al.*, 2009) und mononukleären Zellen des Knochenmarks (BM-MSCs) (Kunisato *et al.*, 2009), induziert werden kann. Des Weiteren konnten Fibroblasten durch das Einbringen der korrelierenden rekombinanten Proteine mittels Konjunktion an *cell penetrating peptides* in induzierte pluripotente Stammzellen (iPS) transformiert werden (Zhou *et al.*, 2009, Kim *et al.*, 2009).

1.1.1 Embryonale Stammzellen

Die Isolation und *in vitro* Kultivierung pluripotenter Stammzellen wurde erstmals 1981 aus Embryonen der Maus beschrieben (Evans *et al.*, 1981). Diese Zellen entwickelten nach subkutaner Injektion in immundefiziente Mäuse Teratome, organoide Tumore, die aus Zellen aller drei Keimblätter bestanden. Daher wird die Ausbildung von Teratomen (Keimzelltumore) als ein Merkmal für Pluripotenz verstanden. Die Isolierung humaner embryonaler Stammzellen und deren stabile Kultivierung über eine Zeitperiode von fünf Monaten wurden erstmals 1998 von Thomson *et al.* beschrieben. Neben der pluripotenten Differenzierung *in vitro* und der Ausbildung von Teratomen *in vivo* sind eine hohe Aktivität der Alkalischen Phosphatase, die Expression der Oberflächenmarker SSEA-3, SSEA-4, TRA-60 und TRA-81 sowie der Transkriptionsfaktoren OCT-3 bzw. OCT-4, Nanog und SOX-2 Charakteristika humaner embryonaler Stammzellen (Thomson *et al.*, 1998, Stojkovic *et al.*, 2004, Chambers *et al.*, 2009).

Die Isolation embryonaler Stammzellen erfolgt aus einem frühen Embryonalstadium, der Blastocyste, welches vor der Nidation in die Uteruswand vorliegt (Fischbach *et al.*, 2004). Dabei ist das Isolationsprinzip im Wesentlichen unabhängig von der Spezies (Kim *et al.*, 2004) und unterscheidet sich in den verschiedenen Verfahren zur Generierung der Embryonen und den spezifischen Entwicklungszeiten der befruchteten Eizelle. Während bei embryonalen Stammzellen der Maus die Möglichkeit zur Entnahme aus dem Uterus *in vivo* bis ca. 76 Stunden nach erfolgter Kopulation besteht (Martin, 1981) oder die Blastocysten nach Entnahme der Ovarien und des Uterus *in vitro* in einer intrauterinen Kultur erzeugt werden (Evans *et al.*, 1981), sind diese Verfahren zur Erzeugung humaner Embryonen ethisch nicht vertretbar. Humane embryonale Stammzellen werden aus überzähligen befruchteten Eizellen, die bei der *in vitro* Fertilisation entstehen, gewonnen (Thomson *et al.*, 1998, Park *et al.*, 2004). In einer *in vitro* Kultur durchläuft die Zygote die frühen Stadien der Embryonalentwicklung, die Furchungsteilungen, bis hin zum Morulastadium. Die Zellen der Morula sind totipotent, d.h. sie können sich sowohl in Zellen des Embryonalgewebes als auch in Zellen der extraembryonalen Gewebe differenzieren. Im weiteren Entwicklungsverlauf kommt es zu einer Veränderung der Zelladhäsion, der Kompaktion. Der Embryo zieht sich zusammen und bildet nach 4 - 5 Tagen die Blastocyste (Sills *et al.*, 2005). Diese besteht aus der äußeren Zellschicht, den Trophoblasten, und der inneren Zellmasse. Bei der Embryonalentwicklung *in vivo* bilden die Trophoblasten die extraembryonalen Gewebe zur Implantation in den Uterus, während der eigentliche Embryo sich aus der inneren Zellmasse entwickelt (Fischbach *et al.*, 2004). Zur Gewinnung der embryonalen Stammzellen werden die äußeren

1. Einleitung

Trophoblastenzellen mittels Laserdissektion (Cortes *et al.*, 2007) oder durch Antikörper (Moon *et al.*, 2005) zerstört und die innere Zellmasse isoliert und subkultiviert (Thomson *et al.*, 1998, Sills *et al.*, 2005, Amit *et al.*, 2002). Durch diesen Prozess werden die Integrität und das Entwicklungspotential zu einem kompletten Organismus inhibiert (Fischbach *et al.*, 2004).

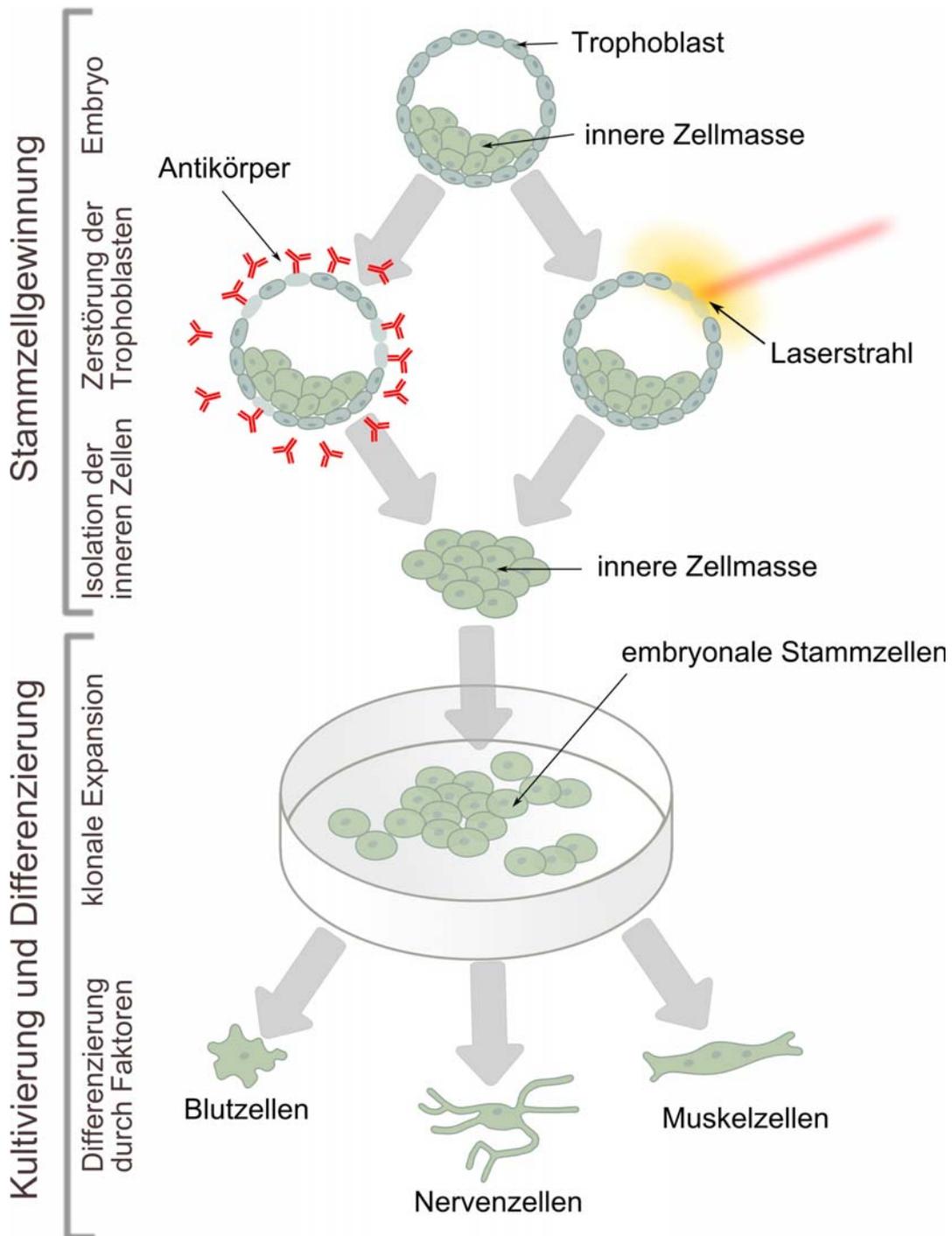


Abb. 1: Isolation und Kultivierung embryonaler Stammzellen.

Das Prinzip der Isolation und Subkultivierung humaner embryonaler Stammzellen ist in **Abbildung 1** dargestellt. Die gewonnenen embryonalen Stammzellen können *in vitro* expandiert werden. Diese Zellen differenzieren unter geeigneten Bedingungen in spezifische somatische Gewebezellen des Endoderms, des Ektoderms und des Mesoderms, wie z.B. Herzmuskelzellen, Hepatozyten, neuronale Zellen, insulinproduzierende pankreatische Zellen (Keller, 2005), Lungenepithelzellen (Samadikuchaksaraei *et al.*, 2006), Adipozyten (Nieden *et al.*, 2005), Chondrozyten (Vats *et al.*, 2006) und Osteoblasten (Nieden *et al.*, 2003, Bielby *et al.*, 2004). Aber der faktische Beweis, dass embryonale Stammzellen *in vitro* in alle Zelltypen eines komplexen Organismus (ca. 220) differenzieren, wurde bislang noch nicht erbracht.

Das hohe Differenzierungspotential embryonaler Stammzellen ist aufgrund spontan auftretender Differenzierungsprozesse *in vitro* schwer zu kontrollieren. Dieser Prozess wird durch eine Kokultivierung mit wachstumsinhibierten Mausfibroblasten (MEFs), den sog. *feeder*-Zellen, reduziert, aber nicht vollständig inhibiert. Diese xenogene Kulturmethode ist relativ aufwendig. Zudem besteht das Risiko exogener Kontaminationen, weswegen eine weitere Verwendung dieser Zellen für klinische Applikation ausgeschlossen ist (Stacey *et al.*, 2006). Neben der Etablierung von humanen *feeder*-Kulturen, teilweise basierend auf autologen Zellen (Choo *et al.*, 2008, Stojkovic *et al.*, 2005, Yoo *et al.*, 2005), besteht der Ansatz einer *feeder*-freien Kultur. Diese wird durch eine Behandlung der embryonalen Stammzellkulturen mit dem Wachstumsfaktor LIF (*leukemia inhibitory factor*) (Smith *et al.*, 1988, Williams *et al.*, 1988, Amit *et al.*, 2004, Amit *et al.*, 2006) oder einer Kultivierung auf humanen Matrixkomponenten realisiert (Meng *et al.*, 2009, Stojkovic *et al.*, 2005).

1.1.2 Adulte mesenchymale Stammzellen

Die ersten mesenchymalen Stammzellen wurden 1968 von A. Friedenstein identifiziert. Er wies im adulten Knochenmark eine Population von Knochenmarkstromazellen nach (*bone marrow stromal cells*, BMSCs), die nicht mit dem hämatopoetischen (blutbildenden) System assoziiert war und ein starkes Potential zur Knochenneubildung (Osteogenese) zeigte (Friedenstein *et al.*, 1968). Diese im Knochenmark residierenden, nicht hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen wurden Gegenstand intensiver Forschung und es wurden verschiedene Populationen mit unterschiedlich stark ausgeprägtem Differenzierungspotential diskriminiert, wie z.B. MAPCs (*multipotential adult progenitor cells*) (Reyes *et al.*, 2001), TCSCs (*tissue-committed stem cells*) (Ratajczek *et al.*, 2004) und MSCs (*mesenchymal stem cells*) (Pittenger *et al.*, 1999, Prockop, 1997).

Der Begriff der mesenchymalen Stammzelle (MSC) wurde von Caplan geprägt (Caplan, 1991, Bruder *et al.*, 1994) und charakterisiert adhärente Zellen mit der Fähigkeit zur stetigen Replikation, die sich multipotent in mesenchymale Gewebezellen differenzieren lassen, wie z.B. in Osteoblasten (Maniatopoulos *et al.*, 1988), Chondrozyten (Wakitani *et al.*, 1994), Adipozyten (Sekiya *et al.*, 2004, Bennet *et al.*, 1991, Beresford *et al.*, 1992), Tenozyten, Myozyten, dermalen Fibroblasten und Stromazellen (Pittenger *et al.*, 1999, Caplan *et al.*, 2001, Bobis *et al.*, 2006, Ferrari *et al.*, 1998) (**Abb. 2**).

1. Einleitung

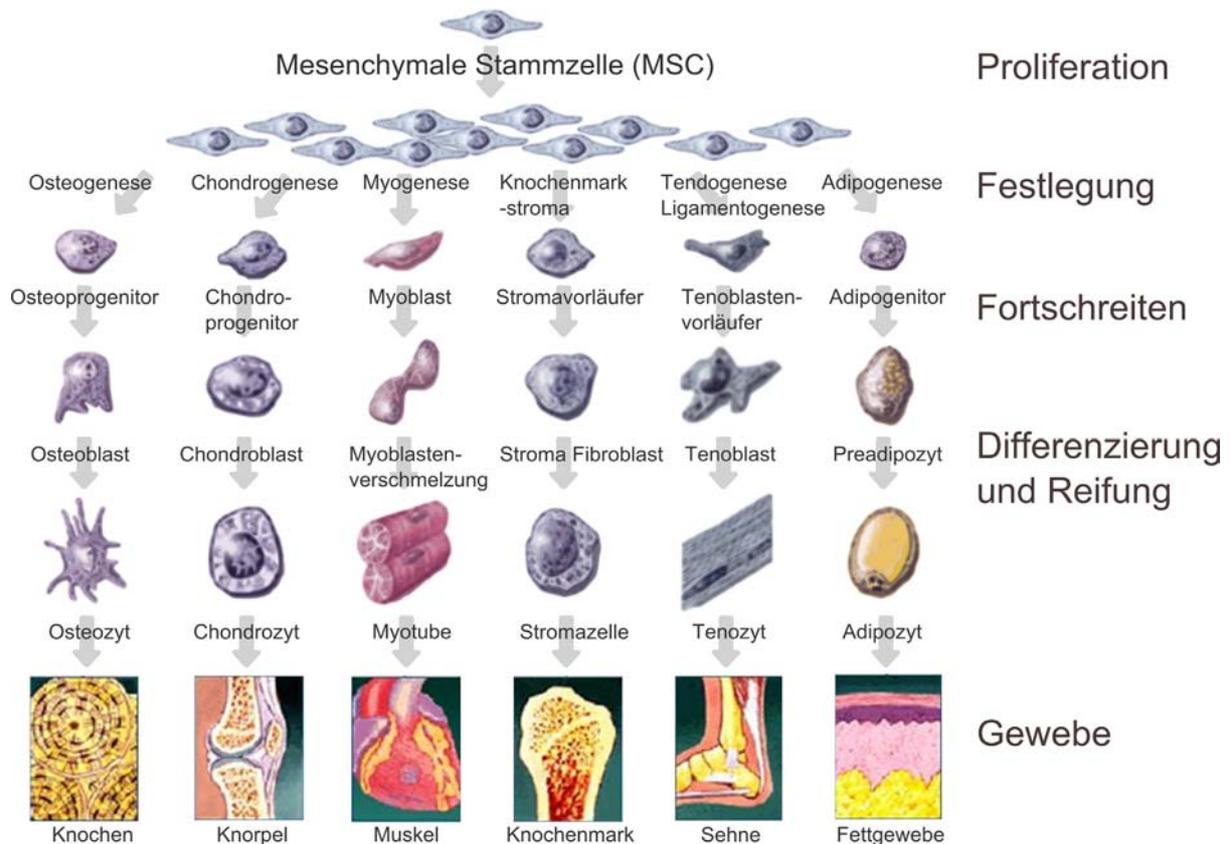


Abb. 2: Humane MSCs können multipotent in mesenchymale Gewebe differenzieren. Das Diagramm zeigt die Stadien der Differenzierung verschiedener mesenchymaler Phänotypen bis zur reifen Zelle (nach Caplan *et al.*, 2001).

Des Weiteren belegen verschiedene Forschungsergebnisse eine Differenzierung in Herzmuskelzellen (Fukuda *et al.*, 2005, Gojo *et al.*, 2003) oder indizieren zumindest eine supportive Funktion bei regenerativen Prozessen des Myokards. *In vitro* wurde die Ausbildung muskelfaserähnlicher Strukturen beobachtet, die synchron kontrahierten und die typischen kardialen Aktionspotentiale generierten (Makino *et al.*, 1999). Des Weiteren wurde in einer Vielzahl von Tierexperimenten gezeigt, dass lokal applizierte MSCs die Fähigkeit besitzen nekrotisches und infarktgeschädigtes Myokardgewebe zu regenerieren (Orlic *et al.*, 2001, Kocher *et al.*, 2001). Und auch in klinischen Studien wurden Stammzelltransplantationen zur Behandlung von Herzinfarkten bereits erfolgreich durchgeführt (Strauer *et al.*, 2002). Weiterhin wurde eine Differenzierung der MSCs in nicht mesenchymale Zelltypen des Endothels, wie z.B. Perizyten (Oswald *et al.*, 2004), oder in Hepatozyten (Petersen *et al.*, 1999) und in neuronale Zellen gezeigt (Kopen *et al.*, 1999, Woodbury *et al.*, 2000, Sanchez-Ramos *et al.*, 2000, Choong *et al.*, 2007, Bobis *et al.*, 2006). Dies lässt zwar vermuten, dass die Plastizität von MSCs größer ist als bisher angenommen, aber zu dem tatsächlichen Differenzierungspotential besteht kein Konsens in der Stammzellforschung.

Neben ihrem Proliferations- und Differenzierungspotential werden MSCs über ihre spindelförmige, fibroblastoide Morphologie und durch die Präsenz der Oberflächenmarker CD105, CD73, CD90 und CD44 charakterisiert. Wobei die Zellen negativ für die hämatopoetischen Marker CD45, CD34, CD14 und HLA-II sein sollen (Satija *et al.*, 2007).

Des Weiteren werden eine Expression von CD271 (Bühring *et al.*, 2007) und CD117 mit einem hohen osteogenen Potential assoziiert (Huss *et Moosmann*, 2002).

Trotz der Definition dieser Minimalkriterien für MSCs besteht das allgemeine Problem der Heterogenität der Zellpopulation bezüglich des Differenzierungs- und Replikationspotentials (Kruznetsov *et al.*, 1997, Castro-Malaspina *et al.*, 1980, Satumura *et al.*, 1998). Zahlreiche Publikationen beschreiben MSCs als eine heterogene Mischpopulation aus Stamm- und Progenitorzellen unterschiedlicher Entwicklungsstadien (D'Ippolito *et al.*, 1999), wobei einige Forscher soweit gehen den tatsächlichen Stammzellanteil auf 1 Zelle pro 10^6 Zellen zu schätzen (Heng *et al.*, 2004). Solche definitiven Aussagen sind allerdings kritisch zu betrachten, da selbst bei wiederholter Isolation aus dem gleichen Spendergewebe Variationen der MSC-Chargen belegt sind (Bobis *et al.*, 2006). Zudem ist das Potential der MSCs aus dem Knochenmark stark von dem Alter des Donors abhängig (Wagner *et al.*, 2009, Stenderup *et al.*, 2003, Baxter *et al.*, 2004, D'Ippolito *et al.*, 1999). So werden pro 10^6 Zellen bei einem Neugeborenen noch 100 MSCs identifiziert und bei einem 50-jährigen nur noch 2 Zellen (Caplan, 1994). Neben dem Alter des Spenders sind ebenfalls dessen gesundheitlicher Zustand und die Entnahmestelle relevant (DiGirolamo *et al.*, 1999). Es wird postuliert, dass die Abnahme von Stamm- oder osteogenen Progenitorzellen in direkter Korrelation mit einem altersbedingten Schwund an Knochenmasse und einer verschlechterten Frakturheilung stehen (D'Ippolito, 1999, Quarto *et al.*, 1995). Ein direkter Antagonismus zwischen osteochondralen Erkrankungen, z.B. Arthritis oder Osteoporose, und einem verminderten osteogenen Potential *in vitro* der isolierten MSCs wurde belegt (Mohanty *et al.*, 2010, Lacey *et al.*, 2009). Ein weiteres Problem stellen Seneszenzen (Alterungsprozesse) infolge einer Expansion *in vitro* dar (Banfi *et al.*, 2002). Die Telomere verkürzen sich (Baxter *et al.*, 2004) und die Zellen zeigen eine breite, flächige Morphologie verbunden mit einem reduzierten Differenzierungspotential (Bruder *et al.*, 1997, Prockop *et al.*, 2001, Colter *et al.*, 2000, DiGirolamo *et al.*, 1999, Katsube *et al.*, 2008).

Die Problematik der Donorabhängigkeit, der Seneszenzentwicklung sowie die invasive Isolation der MSCs aus dem Knochenmark verbunden mit postoperativen Risiken (Romanov *et al.*, 2003) verstärkte die Forschung nach alternativen adulten Stammzellpopulationen. Dabei wurden in vielen unterschiedlichen Geweben MSC-ähnliche Stammzellpopulationen identifiziert, wie z.B. im Fettgewebe (Zuk *et al.*, 2001), im Nabelschnurblut (Chang *et al.*, 2006, Kang *et al.*, 2006) und Nabelschnurgewebe (Romanov *et al.*, 2003, Can *et Karahuseyinoglu*, 2006, Lu *et al.*, 2006) sowie in den Blutgefäßen und *Wharton's jelly* (Kadivar *et al.*, 2005, Covas *et al.*, 2005, Panepucci *et al.*, 2004), in der Plazenta (Li *et al.*, 2005, Fukuchi *et al.*, 2004), im Fruchtwasser (Coppi *et al.*, 2007), den Testikeln (Guan *et al.*, 2006), im Menstruationsblut (Meng *et al.*, 2007), im Skelettmuskel (Barry *et Murphy*, 2004), der Zahnwurzel (Bobis *et al.*, 2006), im Pankreas (Kruse *et al.*, 2006), in der Lunge und der Leber (Anker *et al.*, 2004). Dabei sind Nabelschnurblut und Fettgewebe bereits als gebräuchliche MSC-Ressourcen in der adulten Stammzellforschung konsolidiert.

Bei einem Erwachsenen macht das Knochenmark ca. 5% des Körpergewichtes aus, während bei einem normalgewichtigen Menschen 15 - 25% Depotfettgewebe an Bauch, Gesäß und Oberschenkel leicht zugänglich sind. Im Vergleich zu Knochenmarksbiopsien oder Aspiraten ist eine Liposuktion nur minimal invasiv. Zudem besteht eine große Bereitschaft der Bevölkerung zu diesem kosmetisch motivierten Eingriff, so dass *adipose tissue-derived* MSCs (AT-MSCs) die quantitativ größte Ressource darstellen (Zuk *et al.*,

2002). Demgegenüber ist die quantitative Menge von isolierten Stammzellen aus dem Nabelschnurblut (CB-MSCs, *cord blood-derived* MSCs) deutlich geringer (Bieback *et al.*, 2004, Kern *et al.*, 2006, Wexler *et al.*, 2003), erfolgt aber aus einem medizinischen Abfallgewebe und stellt eine einzigartige Alterssituation des Donors dar. Aufgrund der geringen Immunogenität nach Transplantationen (Barker *et al.*, 2001, Rocha *et al.*, 2004) ist Nabelschnurblut als Ressource für hämatopoetische Stammzellen konsolidiert und wird auch als MSC-Quelle bei allogenen Transplantationen diskutiert (Weiss *et al.* 2008). Fakt ist aber, dass alle MSCs immunsuppressive Eigenschaften zeigen (Nauta *et al.* 2007).

Genau wie BM-MSCs sind AT-MSCs und CB-MSCs befähigt in Osteoblasten, Chondroblasten, Adipozyten und weitere mesenchymale und nicht mesenchymale Zellen zu differenzieren (Kern *et al.*, 2006, Bieback *et al.*, 2004, Lee *et al.*, 2004, Kögler *et al.*, 2008, Goodwin *et al.*, 2001, Zuk *et al.*, 2002, Zuk *et al.*, 2001). Aber zum gegenwärtigen Stand der Forschung wird das finale Potential bezogen auf Isolationsquote, Differenzierungspotential und proliferative Kapazität dieser Stammzellquellen noch diskutiert.

1.1.3 *In vitro* Modelle für die osteogene Differenzierung

Die konventionelle Kultivierung adhärenter Zellen erfolgt in 2D-Zellverbänden. Da aber der Einfluss der zellulären Umgebung (*microenvironment*) auf zellbiologische Prozesse bekannt ist, gewinnen in den letzten Jahren 3D-Kulturtechniken zunehmend an Bedeutung. Bei einer 2D-Kultivierung ist die ventrale Zelloberfläche auf einer rigiden Oberfläche exponiert. Infolge der unterschiedlichen Oberflächenspannungen der ventralen und dorsalen Zellseite wird eine selektive Zellpolarität induziert, die die fokale Zelladhäsion, Zellmorphologie und die Expression extrazellulärer Matrix (ECM) beeinflusst. In 3D-Zellverbänden hingegen liegt eine gewebeähnliche Zellgeometrie vor. Es werden integrinvermittelte 3D-Zell-Zell- oder Zell-ECM-Interaktionen ermöglicht, die regulativ auf zelluläre Prozesse wie Adhäsion, Migration, Proliferation, Apoptose und Differenzierung wirken (Berrier *et al.* Yamada, 2007). Da 3D-Kultursysteme die komplexen physiologischen Verhältnisse besser repräsentieren als 2D-Zellkulturen, konzentriert sich die zellbasierte Forschung auf die Etablierung von 3D *in vitro* Modellsystemen für spezifische Gewebe. Wobei als prominentes Beispiel tumorzellbasierte Aggregate für pharmazeutische *screenings* zu nennen sind (Müller-Klieser, 1997).

In Hinblick auf die Generierung von Knochen für die rekonstruktive Medizin ist eine Kultivierung der MSCs auf stabilisierenden 3D-Trägermatrices ein vielversprechender Ansatz (**Abb. 3**). Dabei werden zumeist Trägermaterialien verwendet, die den physiologischen Bestandteilen des Knochens entsprechen und somit eine gute Gewebeintegration nach Implantation ermöglichen. So finden beispielsweise demineralisierte Knochensubstrate (Mauney *et al.*, 2004), Kollagen (Müller *et al.* Glowacki, 2001), verschiedene poröse Kalziumphosphatverbindungen oder Hydroxylapatit (HA) (Niemeyer *et al.*, 2004, Ohgushi *et al.*, 1990), aber auch keramische Substrate aus CaO, P₂O₅ oder SiO₂ Verwendung (Ohgushi *et al.*, 2003). Des Weiteren wurde eine verbesserte Biokompatibilität durch HA-Beschichtung von Titansubstraten erreicht (Thomas *et al.*, 1987). Zahlreiche knochenähnliche Substrate zeigen zudem osteoinduktive Eigenschaften, d.h. dass durch die Interaktion der MSCs mit dem Substrat eine sog. Bindungsosteogenese (*bonding osteogenesis*) induziert wird (Mauney *et al.*, 2004, Ohgushi *et al.* Caplan, 1999). Diese Zell-Substrat-Interaktion wird ebenfalls durch Integrine vermittelt. Sie wirken regulativ auf die Zelladhäsion, Ausbreitung, Migration und Proliferation auf dem Trägermaterial, wobei insbesondere eine

1.1 Stammzellen

Rezeptorbindung an RGD-Peptide (Arg-Gly-Asp Motiv) diskutiert wird (Saywer *et al.*, 2005, Ohgushi *et Caplan*, 1999).

Der bedeutende Einfluss der zellulären *microenvironments* auf zellbiologische Prozesse wird ebenfalls in trägerfreien Kultursystemen demonstriert. Betrachtet man osteogene Differenzierungsprozesse von MSCs in konventionellen 2D-Zellkulturen, kommt es zur Ausbildung von 3D-Strukturen, *bone noddels*, in denen die terminale Knochenformation, der Kalzifizierungsprozess, stattfindet (Beresford *et al.*, 2005). Des Weiteren wurde durch eine Kultivierung der MSCs in stark kondensierten Aggregaten die spontane Differenzierung in Chondrozyten induziert (Johnstone *et al.*, 1998). Die Differenzierung in Osteoblasten wurde ebenfalls demonstriert, allerdings erst nach zusätzlicher Stimulation durch lösliche Differenzierungsfaktoren (Muraglia *et al.*, 2003, Wang *et al.*, 2009). Dabei ist die Beteiligung von Integrinen bei der Regulation der Sphäroidaggregation, der Zellorganisation und Mineralisierung in knochenzellbasierten Aggregaten bereits belegt (Kale *et al.*, 2000).

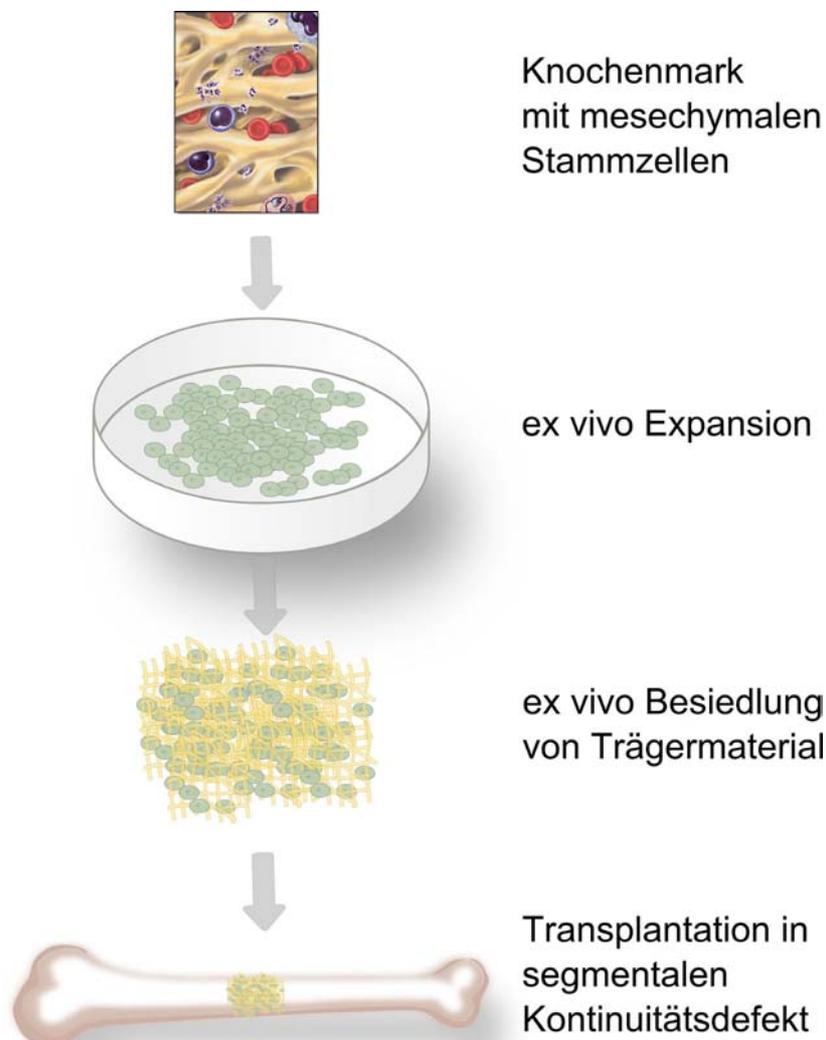


Abb. 3: Prinzip des *tissue engineering* von autologem Knochenersatz. Nach Isolation und Expansion *in vitro* werden die MSCs auf einem Trägersubstrat differenziert. Dieses Konstrukt wird in den Knochendefekt implantiert.

1.1.4 Potential der MSCs in der regenerativen Medizin

Bei der Geweberegeneration *in vivo* unterscheidet man prinzipiell zwischen zwei therapeutischen Konzepten, dem *tissue engineering* und der Zelltherapie. Bei dem *tissue engineering* wird eine direkte Differenzierung der MSCs in funktionale Gewebe induziert. Dieses erfolgt zumeist auf gewebeähnlichen Trägersubstraten, welche zur Rekonstruktion der geschädigten Gewebe transplantiert werden. Demgegenüber werden in der Zelltherapie sekundäre und supportive Eigenschaften der MSCs genutzt. So wurde nach direkter Injektion in das geschädigte Organ oder nach intravenöser Injektion eine Migration und Integration der Stammzellen in dem geschädigten Gewebe festgestellt. Darüber hinaus wurde bei *in vivo* Experimenten im Tiermodell sowie in klinischen Patientenstudien eine verbesserte Geweberegeneration unterschiedlicher Organe beobachtet. Da keine direkte Differenzierung der MSCs erfolgt, wird diese Wirkung der Sekretion von anti-inflammatorischen Proteinen, Angiogenen und weiteren immunregulierenden und anti-fibrösen Faktoren zugeschrieben. Diese trophogene Aktivität wurde in zahlreichen *in vitro* Studien dokumentiert (Caplan, 2007).

Die Immunsuppressivität der MSCs ist für therapeutische Applikationen eine grundlegende Eigenschaft. Durch eine Inhibition der TNF- α - und Interferon- γ -Produktion wurde infolge einer MSC-Transplantation die T-Zell-Erkennung und Expansion des Empfängerorganismus inhibiert. Dieses ermöglicht zum einen eine allogene Verwendung, in Anbetracht der extremen Zellzahlen von 1 - 10x 10⁶ Zellen/kg Körpergewicht bei intravenöser Injektion beispielsweise wäre eine zeitkontinuierliche Verfügbarkeit autologer MSCs ohnehin nicht zu gewährleisten, zum anderen indiziert diese Eigenschaft MSCs als therapeutisches Mittel bei Erkrankungen des Immunsystems. So wurden MSCs bei dem *graft versus host disease*, einem Syndrom bei dem Zellen des transplantierten Organs das Empfängergewebe angreifen, eingesetzt und wirkten auch immunregulierend bei Morbus Crohn und Leukodystrophy (Giordano *et al.*, 2007).

Applikationsbeispiele von MSCs in der Zelltherapie sind vielfältig und wurden bereits umfassend in zahlreichen Publikationen zusammengestellt (Giordano *et al.*, 2007, Bobis *et al.*, 2006, Caplan, 2007). Zum gegenwärtigen Zeitpunkt werden einige spezifische klinische Applikationen bereits von kommerziellen Instituten, wie z.B. Osiris Therapeutics, Pluristem oder dem deutschen XCell-center, angeboten. Diese Institute sind ebenfalls an der Entwicklung von weiteren Zelltherapieformen und der Realisierung klinischer Patientenstudien beteiligt (www.osiristx.com, www.pluristem.com, www.xcell-center.de). Informationen zu aktuellen Studien sind ebenfalls unter www.clinicaltrials.gov erhältlich. Die wohl prominentesten Beispiele neben der klassischen Knochenmarktransplantation hämatopoetischer Stammzellen bei Leukämie sind MSC-Transplantationen bei Osteogenesis Imperfecta (Horwitz *et al.*, 1999, 2001) oder bei Koronarfarkten. Strauer *et al.*, demonstrierte 2002 nach Zellinjektion in das Koronargewebe von 10 Patienten mit Herzinfarkt eine verbesserte Regeneration im Vergleich zu konventionell behandelten Patienten. Ein positiver Effekt bezüglich der Kontraktivität oder der Größe der Gewebeschädigung nach einer Zellinjektion in das Infarktgewebe wurden in weiteren klinischen Patientenstudien untermauert (Chen *et al.*, 2004, Wollert *et al.*, 2004, Katritsis *et al.*, 2005). Auch wenn Stammzellinjektionen, teilweise sogar basierend auf embryonalen Stammzellen (www.emcell.com), von einigen Kliniken angeboten werden, diskutieren andere

Forscher den therapeutischen Nutzen der MSCs und reduzieren die Heilungserfolge auf Gewebeangiogenese durch die frisch gesetzte Verletzung infolge der Injektion.

Im Bereich des *tissue engineering* wurden MSC-basierte Transplantate im Tiermodell erfolgreich zur Substitution großer Knochendefekte (Ohgushi *et al.*, 1999, Kon *et al.*, 2000, Petite *et al.*, 2000, Cancedda *et al.*, 2003) verwendet. Und es existieren bereits klinische Patientenstudien mit vielversprechenden Resultaten (Marcacci *et al.*, 2007, Granchi *et al.*, 2010, Gouin *et al.*, 1995, Quarto *et al.*, 2001, Ohgushi *et al.*, 2003, Cancedda *et al.*, 2003), insbesondere auf dem Gebiet der Oralplastik (Lendeckel *et al.*, 2004, Hibi *et al.*, 2006 Scheller *et al.*, 2009). Weitere klinische Studien zur Verwendung von MSCs für orthopädische Applikationen werden zurzeit durchgeführt (Shenaq *et al.*, 2010). Aber funktionale MSC-basierte Knochen- und Knorpeltransplantate (Mobasheri *et al.*, 2009, Cancedda *et al.*, 2003) oder andere Gewebesubstitute, wie z.B. Herzklappen und Luftröhren (Macchiarini *et al.*, 2008), sind noch weit entfernt von einer konventionellen Therapieform.

1.2 Aufbau des Knochengewebes

Das Skelett der Wirbeltiere besteht aus Knochengewebe, welches von den Osteoblasten und den Chondroblasten generiert wird. Die hohe mechanische Stabilität basiert dabei auf nicht zellulären Strukturen, der organischen extrazellulären Knochenmatrix, in die anorganische Kalziumphosphatverbindungen eingelagert werden. Histologisch unterscheidet man Knochen nach der inneren Organisation der extrazellulären Matrix in Lamellenknochen (trabekulärer Knochen) mit gleichartiger Orientierung der Kollagenfibrillen innerhalb einer Lamellenschicht und dem orientierungslosen Geflechtknochen. Prinzipiell werden diese Knochen zwar über verschiedene Mechanismen gebildet, aber der Hauptteil des gebildeten Lamellenknochens wird im adulten Organismus zu dem mechanisch stabileren trabekulären Knochen umorganisiert. Knochen ist ein Gewebe mit einer hohen biologischen Plastizität und unterliegt einem permanenten Auf- und Abbauprozess (*bone remodeling*), um die strukturelle Integrität dieses starren Gewebes zu gewährleisten. Diese Umorganisation des Skeletts ist aber nicht nur wichtig zur Regeneration und Erhaltung der Stützfunktion bei wechselnder mechanischer Belastung, sondern auch zur Regulation des Kalziumhaushaltes des Organismus. Die Knochenneubildung wird hierbei von den Osteoblasten angeregt, die sich aus den mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks und des Periosts (Knochenhaut) entwickeln. Die Osteoblasten sezernieren die organische Knochenmatrix und werden nach Mineralisierung des Gewebes in Osteozyten oder in *lining cells*, die sich in der Peripherie des bereits mineralisierten Gewebes befinden und die Migration von Osteoklasten regulieren, umgewandelt oder unterliegen der Apoptose (Raisz, 1999, Bilezikian *et al.*, 1996).

Als Osteoklasten bezeichnet man die Zellen, die für den Knochenabbau verantwortlich sind. Anders als die Osteoblasten leiten sie sich von den hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks ab. Die Entwicklung von reifen Osteoklasten wird von dem Parathormon (PTH) der Nebenschilddrüse vermittelt. Nach Bindung an einen spezifischen Rezeptor auf der Osteoblastenmembran wird die Sekretion von RANKL (*receptor for activation of nuclear factor kappa B ligand*) induziert, woraufhin über den osteoklasten-/osteoklastenprogenitor-assoziierten Membranrezeptor RANK (*receptor for activation of nuclear factor kappa B*) die Osteoklastenreife aktiviert wird. Dieser Prozess ist essentiell für die Kalziumhomöostase des Organismus. Die Regulation der PTH-Sekretion erfolgt über den extrazellulären

1. Einleitung

Kalziumspiegel, wobei eine niedrige Ca^{2+} -Konzentration aktivierend und eine hohe Konzentration inhibierend wirken (Stryer *et al.*, 2003, Detjeen *et al.*, 2005).

Während der Embryogenese wird zwischen zwei unabhängigen Wegen zum Aufbau von Knochengewebe unterschieden, die desmale Ossifikation und die endochondrale Ossifikation. Während die desmale Ossifikation eine direkte Differenzierung von kondensierten MSCs zu Osteoblasten bezeichnet, beschreibt die endochondrale Ossifikation zuerst die Ausbildung eines knorpeligen Primordialskeletts. Nach Migration von benachbarten Osteoblasten oder der Differenzierung hypertropher Chondroblasten in Osteoblasten wird dieses Primordialskelett im Rahmen der Osteogenese von den Osteoklasten resorbiert und durch die eigentliche Knochenmatrix ersetzt. Außer dem Schädelknochen und Teile der Gesichtsknochen (kortikale Knochen) werden die weiteren Knochenstrukturen (traberkuläre Knochen) durch den Prozess der endochondralen Ossifikation aufgebaut, der ebenfalls das Längenwachstum und Heilungsprozesse im adulten Organismus vermittelt (Leonhardt, 1981).

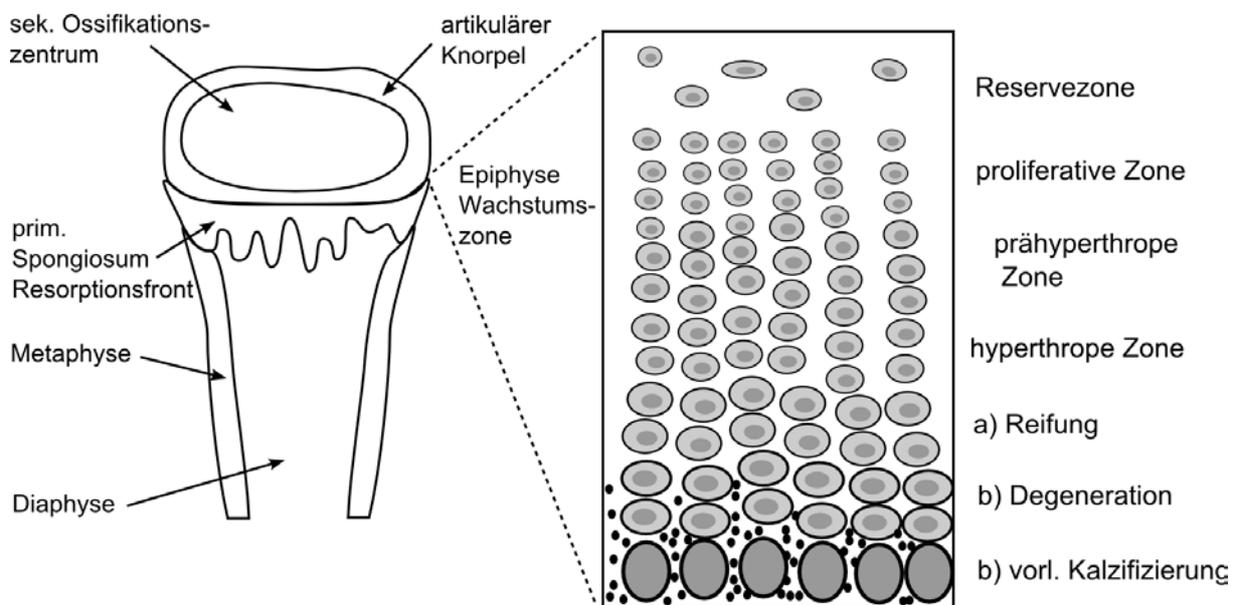


Abb. 4: Prozess der Knochenbildung bei der endochondralen Ossifikation (nach Stevens *et al.*, 1999).

Der Prozess der endochondralen Ossifikation während des Längenwachstums erfolgt bidirektoral ausgehend von der Wachstumszone, genannt Epiphyse (**Abb. 4**). Histologisch gliedert sich die Wachstumszone in die Reservezone, die proliferative Zone, die prähypertrophe und die hypertrophe Zone. Die ruhenden Zellen der Reservezone haben nur eine geringe Teilungsaktivität, während in der proliferativen Zone die Zellkondensation und Expression der chondrogenen Matrix erfolgt. In der prähypertrophen Zone ist die Knorpelmatrix voll ausgebildet und nach Differenzierung in hypertrophe Chondrozyten erfolgt die Kalzifizierung der Knorpelmatrix (Erlebacher *et al.*, 1995). Dieser Prozess endet mit der Apoptose der Chondrozyten und es folgt eine Differenzierung benachbarter MSCs zu Osteoblasten. Die Osteoblasten sezernieren die organische Knochenmatrix und unterliegen nach Mineralisierung des Gewebes der Apoptose oder werden in Osteozyten und in *lining cells* transformiert. Die Knorpelmatrix wird resorbiert und der eigentliche traberkuläre

Knochen gebildet, wobei die Osteozyten mit ihren langen Zellfortsätzen den Stoffaustausch mit peripheren Blutgefäßen durch kleine Knochenkanäle vermitteln. Des Weiteren wird postuliert, dass dieser Flüssigkeitstransfer ein Signal für mechanische Belastung darstellt und die Knochenbildung induziert (Raisz, 1999).

1.2.1 Extrazelluläre Knochenmatrix

Im Wesentlichen setzt sich Knochengewebe aus 50% anorganischen Mineralsalzen (Kalziumhydroxylapatit und Kalziumcarbonatapatit), 25% Wasser und 25% organischer Komponenten zusammen. Die organischen Bestandteile bestehen dabei aus der von den Osteoblasten sezernierten extrazellulären Matrix. Die extrazelluläre Knochenmatrix bildet ein strukturfestes Gerüst, den sogenannten Osteoid, aus dem nach Kalzifizierung der eigentliche Knochen entsteht. Über 90% der organischen Bestandteile der Matrix bestehen aus Kollagen, welches im Verlauf der Osteoblastenreifung schon frühzeitig sezerniert wird. Die mechanische Belastbarkeit des Knochens beruht maßgeblich auf der zu Fibrillen assoziierten und quervernetzten tripelhelikalen Struktur von Kollagen. Das fibrilläre Kollagen-1 ist das häufigste Kollagen im Knochen, aber auch Kollagen-3 und Kollagen-5 sowie die nicht fibrillären Kollagene Kollagen-6 und Kollagen-10 wurden nachgewiesen. Die Kollagenfasern bilden das Strukturelement für die Kalzifizierung. Die Osteoblasten sezernieren die für die Kalzifizierung essentiellen mineralischen Bestandteile mittels Matrixvesikel. Diese Matrixvesikel lagern sich auf den Kollagenfasern an und bilden den Kristallisationskeim (Wiesmann *et al.*, 2004).

Neben Kollagen zählen die Strukturproteine Dekorin und Biglykan, beides Chondroitinsulfat-Glykoproteine die ebenfalls im Knorpelgewebe präsentiert werden, sowie Sialo-Glykoproteine (*bone sialoprotein*, BSP), Fibronectin, Osteopontin, Osteocalcin und Osteonektin zu den wichtigsten Komponenten der extrazellulären Matrix. Sie besitzen Bindestellen für andere Matrixmoleküle, Zellen und Hydroxylapatit, so dass ihnen integrative Aufgaben zugeschrieben werden. Es wird postuliert, dass insbesondere BSPs essentiell für die Regulation des Knochenauf- und Knochenumbaus sind. Neben einem RGD-Motiv, einem regulatorischen Element zur Zell- und Substratinteraktion (Adhäsion, Zellausbreitung, Integrinbindung), wurden Gruppen zur Phosphatbindung und eine α -helikale Polyglutaminsäuresequenz identifiziert. Diese ist mit einer γ -Carboxylgruppe zur Ca^{2+} -Bindung assoziiert, welche als Mediator des Kristallisationsprozesses durch Bindung freier Kalziumionen fungiert, aber auch zur Wechselwirkung mit bereits formierten Hydroxylapatitkristallen befähigt. Durch diese Dualität fungieren BSPs einerseits als Induktoren der Mineralisation der ECM, aber andererseits ebenfalls als Inhibitoren (Ganss *et al.*, 1999).

Mit dem Einsetzen der Mineralisierungsphase wird Osteonektin exprimiert. Dieses Strukturprotein ist neben der Kalziumbindung in besonderem Maße zur Assoziation mit Kollagen-1 befähigt. So zeigen Osteonektin-*knockout* Mäuse eine eingeschränkte Fähigkeit zur Knochenneu- und Umbildung (Delany *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu scheint das strukturverwandte Osteopontin keine Funktion bei der Kalzifizierung der Matrix zu haben. So zeigen Osteopontin-*knockout* Mäuse keine strukturellen Unterschiede im Knochenaufbau, vielmehr ist Osteopontin mit der Präosteoklastenbindung assoziiert (Rittling *et al.*, 1998). Osteocalcin gilt als später Marker für osteoblastäre Zellen, da es erst nach Einsetzen der Mineralisierung der Matrix exprimiert wird. Osteocalcin weist zwar Bindestellen für Kalzium

auf, ist aber nicht essentiell für den Knochenaufbau. Tatsächlich scheint es diesen sogar zu inhibieren, da in Osteocalcin-*knockout* Mäusen eine vermehrte Knochenbildungsrate beobachtet wurde (Boskey *et al.*, 1998, Ducy *et al.*, 1996).

Aber nicht nur Strukturproteine tragen zur Mineralisierung der organischen Knochenmatrix bei, auch Enzyme wie die Alkalische Phosphatase sind beteiligt. Die Alkalische Phosphatase wird schon sehr früh, bereits vor der Mineralisierungsphase, von den Osteoprogenitorzellen exprimiert. Dieses Enzym ist mit der Zellmembran assoziiert und vermittelt die Hydrolyse von organischem Pyrophosphat zu anorganischem Phosphat, welches für die Matrix-mineralisation essentiell ist.

1.2.2 Osteoblastäre Differenzierungskaskade

Die osteoblastäre Differenzierung verläuft über mehrere Zellstadien, wobei eine fortschreitende Differenzierung mit einer Abnahme der Proliferationskapazität einhergeht. Ausgehend von der mesenchymalen Stammzelle verläuft die osteogene Entwicklung über Osteoprogenitorzellen zu Präosteoblasten, Osteoblasten und schließlich zu Osteozyten und *lining cells* (Abb. 5).

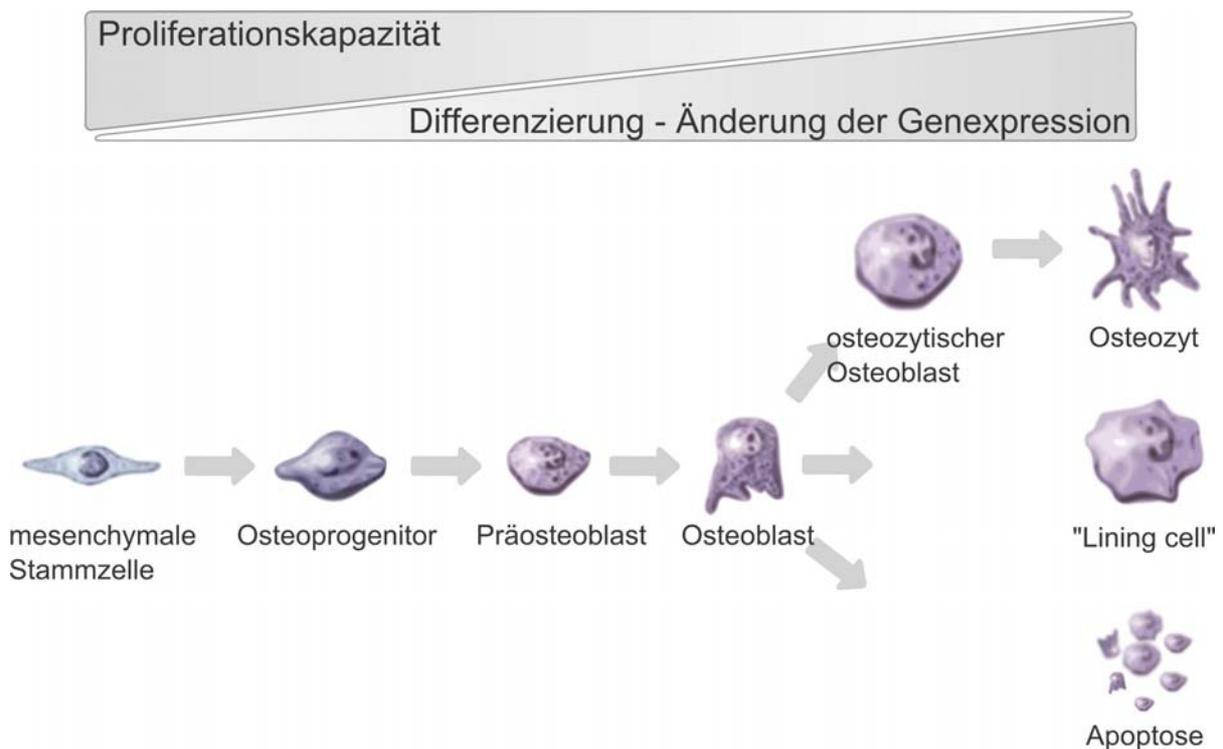


Abb. 5: Schematische Darstellung der osteogenen Differenzierung (nach Heng *et al.*, 2004, Raisz, 1999).

Die osteoblastäre Differenzierung der MSCs ist aber nicht als lineare Abfolge von Osteoblasten verschiedener Reifungsstufen zu begreifen, sondern vielmehr als komplexer Differenzierungsprozess, der die Ausbildung verschiedener mesenchymaler Phänotypen verknüpft (Heng *et al.*, 2004, Bruder *et al.*, 1998). Der Differenzierungsprozess von Osteoprogenitorzellen bis hin zu reifen Osteoblasten lässt sich durch die Expression

bestimmter Marker, wie die Alkalische Phosphatase und die Strukturproteine der extrazellulären Matrix (vgl. **Abschnitt 1.2.1**), in drei Stadien gliedern: 1. Proliferation, 2. Reifung und Entwicklung der extrazellulären Matrix und 3. Mineralisierung. Neben der Induktion osteoblastenassoziierter Marker sind diese Stadien mit charakteristischen Änderungen der Expression zellzyklusassoziierter Gene verbunden. Zu Beginn der Osteogenese entwickeln sich die MSCs zu Osteoprogenitorzellen, die noch über eine hohe Proliferationskapazität verfügen. Entsprechend sind Gene der Zellzykluskontrolle, wie z.B. Histone und Protooncogene (c-fos, c-myc), aktiv. Die Differenzierung zum Präosteoblasten, der noch die Fähigkeit zur Zellteilung besitzt, markiert den Anfang der Osteoblastenreifung. Es werden frühe Marker wie die Alkalische Phosphatase und mit zunehmender Differenzierung Matrixproteine wie Kollagen-1 und BSPs exprimiert. Der reife Osteoblast ist nur vermindert teilungsfähig, er sezerniert alle für die organische Knochenmatrix typischen Strukturproteine, wobei die Expression von Osteocalcin mit der Mineralisierung der extrazellulären Matrix korreliert (Stein *et al.*, 1996).

1.2.3 Induktion der osteogenen Differenzierung

Konventionell wird die osteogene Differenzierung der MSCs *in vitro* durch die Kultivierung mit löslichen Differenzierungsfaktoren induziert. Das in der Literatur beschriebene Standardprotokoll besteht aus den Komponenten Dexamethason, β -Glycerolphosphat und L-Ascorbinsäure-2-Phosphat. Des Weiteren wird der Zusatz weiterer Faktoren als verstärkende Stimuli beschrieben, wie z.B. BMP-2, welches der Gruppe der TGF- β -Faktoren (*transforming growth factor* β) zugeordnet wird, Calcitriol (Vitamin D₃), welches *in vivo* den Knochenaufbau stimuliert, oder Kalziumchlorid (Heng *et al.*, 2004).

β -Glycerolphosphat fungiert als Phosphatquelle für den Kristallisationsprozess von Hydroxylapatit in der extrazellulären Matrix der Zellen und L-Ascorbinsäure-2-Phosphat ist ein essentieller Kofaktor bei der Hydroxylierung von Prolin, einem basalen Prozess zur Ausbildung der tripelhelikalen Struktur von Kollagen. Während die Funktionen von β -Glycerolphosphat und L-Ascorbinsäure-2-Phosphat bei der Osteogenese definitiv bekannt sind, ist die Wirkung des synthetischen Glycokortikoids Dexamethason unklar. Der Wirkmechanismus von Dexamethason wird über den intrazellulären Glycokortikoidrezeptor vermittelt. Es besteht zwar ein Konsens, dass Dexamethason die osteogene Differenzierung *in vitro* fördert (Heng *et al.*, 2004), demgegenüber steht aber die Tatsache, dass Glucocortikoide *in vivo* nachteilig auf die Knochenformation wirken und Osteoporose induzieren (Sivagurunathan *et al.*, 2005). Einerseits wird postuliert, dass Dexamethason anti-proliferativ wirkt, andererseits beschreiben zahlreiche Veröffentlichungen einen stimulierenden Effekt auf die Proliferation der MSCs (Jørgensen *et al.*, 2004). Des Weiteren wurde belegt, dass Dexamethason in konfluenten MSC-Kulturen bzw. rodenten Osteoprogenitorzellen die Proliferation stimuliert, während in Zellkulturen geringer Dichte ein anti-poliferativer Effekt beobachtet wurde. Diese Aufhebung der Kontaktinhibition der Zellproliferation wird auch in humanen MSC-Populationen beobachtet. In MSC-Zellkulturen hoher Dichte tritt verstärkter der allgemein bekannte Prozess der kontaktinduzierten Apoptose auf (Platzmangel). Infolge von Dexamethasongaben wurde die Apoptoserate in stark konfluenten Zellkulturen vermindert oder sogar eliminiert (Song *et al.*, 2009).

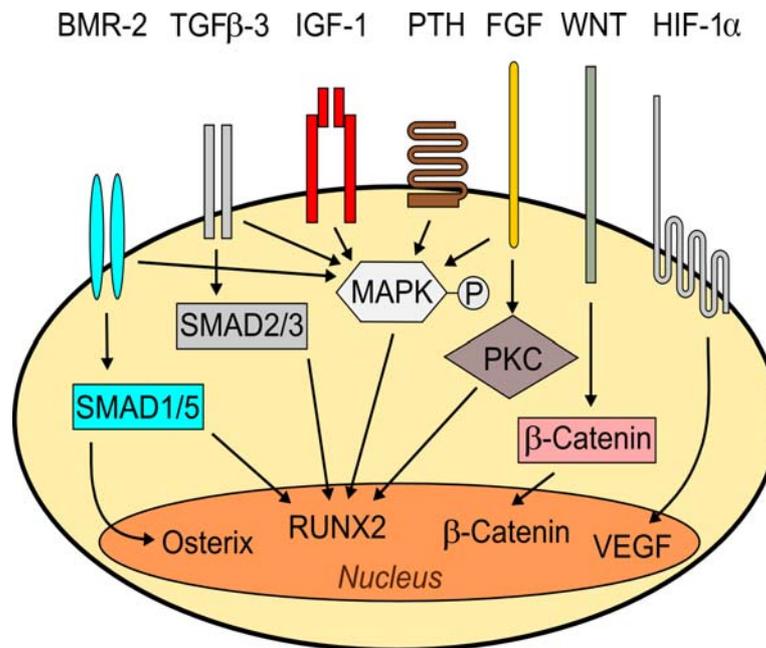


Abb. 6: Transkriptionelle Schaltstellen der osteogenen Differenzierung (nach Panetta, 2009, Logothetis et Lin, 2005).

Die transkriptionelle Regulation der Osteogenese ist nicht vollständig aufgeklärt. Als die wichtigsten Schlüsselfaktoren wurden die Transkriptionsfaktoren RUNX2 (*runt-related transcription factor 2*), Osterix und β -Catenin identifiziert. Die Regulation erfolgt multifaktoriell über verschiedene Signalkaskaden (**Abb. 6**). Einer dieser Signalwege ist der BMP-2- bzw. TGF- β -Signalweg, der auch bei der Chondrogenese aktiviert wird. Während RUNX2 sowohl bei der Chondrogenese als auch bei der Osteogenese eine wichtige regulative Funktion hat, scheint der Transkriptionsfaktor Osterix in der hierarchischen Organisation der Signalkaskaden unterhalb von RUNX2 zu liegen. Es wird diskutiert, dass Osterix für die Initiation der osteogenen Differenzierung in bipotenten chondrogenen/osteogenen Progenitorzellen eine Schlüsselrolle spielt. So zeigen Osterix-*knockout* Mäuse die Entwicklung normaler Knorpelstrukturen, aber keine Mineralisierung des Skelettes, während in RUNX2-*knockout* Mäusen keine Knochenformation erfolgt und das Knorpelskelett ebenfalls nicht normal ausgebildet ist. Bei der Regulation osteogener Prozesse sind aber noch weitere Signalwege involviert. Wie beispielsweise der MAP-Kinase-Signalweg (*mitogen-activated protein kinase*), der durch IGF-1 (*insulin-like growth faktor*), bFGF (*basic fibroblast growth factor*), dem körpereigenen *parathyroid hormone* (PTH), den *parathyroid hormone-related peptides* (PTHrP) und mechanischen Stress aktiviert wird, sowie der Hedgehog-Signalweg, der ebenfalls mit einer RUNX2-Induktion assoziiert wird. Des Weiteren wird über den Wnt-Signalweg die Expression von β -Catenin induziert, welches ebenfalls mit osteogenen Prozessen assoziiert ist. Die Aktivierung von HIF-1 α (*hypoxia-inducible factor 1*) führt zur Expression von VEGF (*vascular endothelial growth factor*), welches die Vaskularisierung des Knochens fördert (Panetta, 2009).

Mesenchymale Stammzellen entwickeln sich bei der Embryogenese aus den embryonalen Stammzellen. Die Differenzierung embryonaler Stammzellen in gewebespezifische Zellen kann *in vitro* durch verschiedene Differenzierungsfaktoren induziert werden, vergleichbar mit der multipotenten Differenzierung der MSCs (**Abb. 7**). Die Verwendung der teilweise

1.3 Knorpel und chondrogene Differenzierung

identischen Faktoren bei der Osteoblasten- und Chondroblastendifferenzierung, wie beispielsweise BMP-2 und BMP-4, verdeutlicht die enge Korrelation dieser Prozesse. Die funktionale Vernetzung dieser Prozesse wird insbesondere bei der Transdifferenzierung hypertropher Chondrozyten in Osteoblasten bei der endochondralen Ossifikation *in vivo* demonstriert (vgl. Abschnitt 1.2).

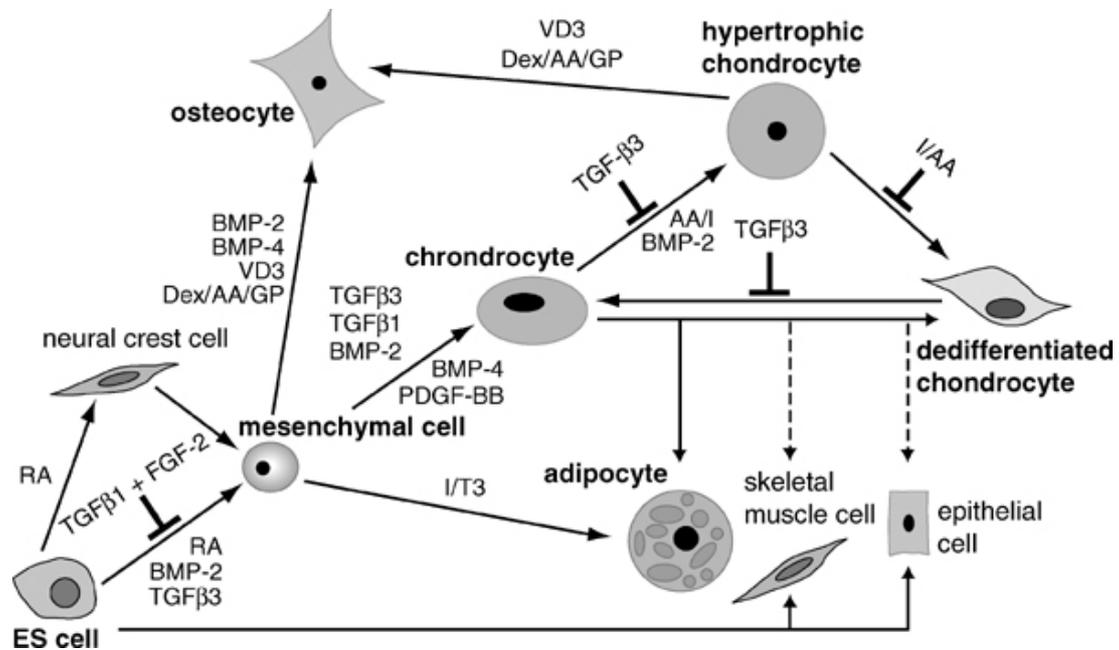


Abb. 7: Differenzierung von embryonalen Stammzellen und ihre Stimuli. Die Abkürzungen sind entsprechend der gängigen Nomenklatur in englisch aufgeführt: RA = *retinoic acid*, BMP-2/4/6 = *bone morphogenic protein 2/4/6*, TGFβ-1/3 = *transformic growth factor 1/3*, FGF-2 = *fibroblast growth factor 2*, VD3 = *Vitamin D₃*, Dex = *dexamethasone*, AA = *L-ascorbic acid*, GP = *β-glycerophosphate*, I = *insulin*, PDGF-BB = *paleded-derived growth factor* (Kramer et al., 2007).

1.3 Knorpel und chondrogene Differenzierung

Knorpelgewebe besteht aus Chondrozyten und der Interzellulärsubstanz, welche aus Kollagen, Proteoglykan und Wasser besteht. Die Proteoglykane werden aus Gykosaminoglykanketten (Chondroitinsulfat, Keratinsulfat, Heparinsulfat) gebildet, die über ein zentrales Kernproteine an ein Hyaluronsäuremolekül gebunden sind (Abb. 8). Dieses Kernprotein vermittelt auch die Bindung an die Kollagenmatrix. Histologisch liegen die Chondroblasten als Einzelzellen oder Zellcluster vor, eingekapselt in einer basophilen Interzellulärsubstanz. Diese Einheit wird als Chondron bezeichnet und wird hauptsächlich aus Aggrekan, einem Proteoglykan mit einem hohen Anteil an Chondroitinsulfat, gebildet. Je nach Zusammensetzung der Interzellulärsubstanz wird zwischen dem hyalinen (Gelenknorpel), dem elastischen und dem Faserknorpel unterschieden, wobei im hyalinen und elastischen Knorpel Kollagen-2 und im Faserknorpel Kollagen-1 dominant exprimiert werden. Perizellulär (in direkter Zellumgebung) dominiert hingegen Kollagen-5.

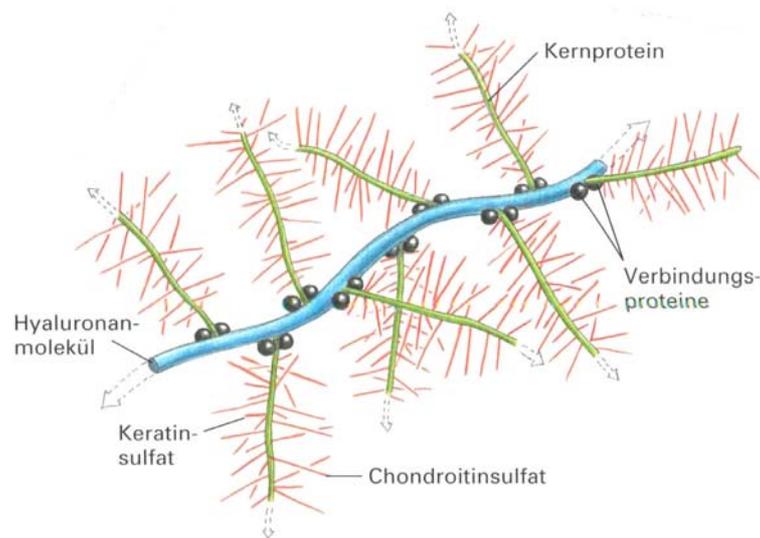


Abb. 8: Struktur eines Proteoglykans (Alberts *et al.*, 2004).

Zur Induktion der chondrogenen Differenzierung wurde in dieser Arbeit ein Standardmedium verwendet, basierend auf den Faktoren Dexamethason, L-Ascorbinsäure-2-Phosphat, L-Prolin und TGF- β 3. Dabei fungiert L-Prolin als Substrat für die Kollagensynthese, welches zu ca. 30% aus Hydroxyprolin besteht. Die Funktion von Dexamethason, L-Ascorbinsäure-2-Phosphat und TGF- β 3 wurde bereits im **Abschnitt 1.2.3** diskutiert.

1.4 Fettgewebe und adipogene Differenzierung

In vivo unterscheidet man zwischen braunem Fettgewebe mit einem hohen Anteil an Mitochondrien zur Wärmeerzeugung und dem weißen Fettgewebe zur Energiespeicherung. Die Fettzellen, Adipozyten, entstammen der mesenchymalen Entwicklungslinie und speichern Lipide in intrazellulären Membranvesikeln. Des Weiteren sezernieren Adipozyten verschiedene Faktoren, die an der Appetitregulation sowie der Immunantwort und der Entstehung von Gefäßkrankheiten beteiligt sind. *In vitro* wird die adipogene Differenzierung der MSCs durch ein Kulturmedium mit einer hohen Glucosekonzentration und den Zusätzen Insulin bzw. IGF-1 (*insulin-like growth factor 1*), Dexamethason, Indomethacin und Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) induziert (Sekiya *et al.*, 2004). Die hohe Glucosekonzentration gewährleistet ein Überangebot an energiereichem Substrat für die verschiedenen Biosynthesewege.

Die Regulationsmechanismen der adipogenen Faktoren leitet sich aus dem Fettstoffwechsel ab, welcher in zahlreichen Standardwerken detailliert beschrieben ist (z.B. Stryer *et al.*, 2003, Deetjen *et al.*, 2005). Die wichtigsten Mediatoren sind in **Abbildung 9** zusammengestellt. Insulin bzw. IGF-1 induzieren den Glucosetransporter GLUT-4, worin eine vermehrte Glucoseaufnahme der Zellen resultiert. Zudem werden die Verstoffwechslung von Glucose zu Acetyl-CoA, aus dem die Fettsäureketten gebildet werden, stimuliert sowie die Speicherung von Fett. Dexamethason induziert die Expression des Transkriptionsfaktors PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor γ*) und induziert somit die Adipogenese. Zudem wird die Verstoffwechslung zu Signalmolekülen der Gruppe der Eicosanoide, z.B. Prostaglandin, durch Hemmung der Phospholipase A inhibiert. Auch Indomethacin inhibiert

die Bildung von Prostaglandinen aus der Vorstufe Arachidonsäure über eine Hemmung der Cyclooxygenase. IBMX inhibiert die Phosphodiesterase, was zu einer Erhöhung des zellulären cAMP-Spiegels führt. Dadurch werden Transkriptionsfaktoren induziert, wie z.B. PPAR γ , die proliferative Prozesse negativ regulieren und die Adipogenese induzieren (Hamm *et al.*, 1999, Laneuville *et al.*, 1994, Schoojans *et Auwerx*, 2000).

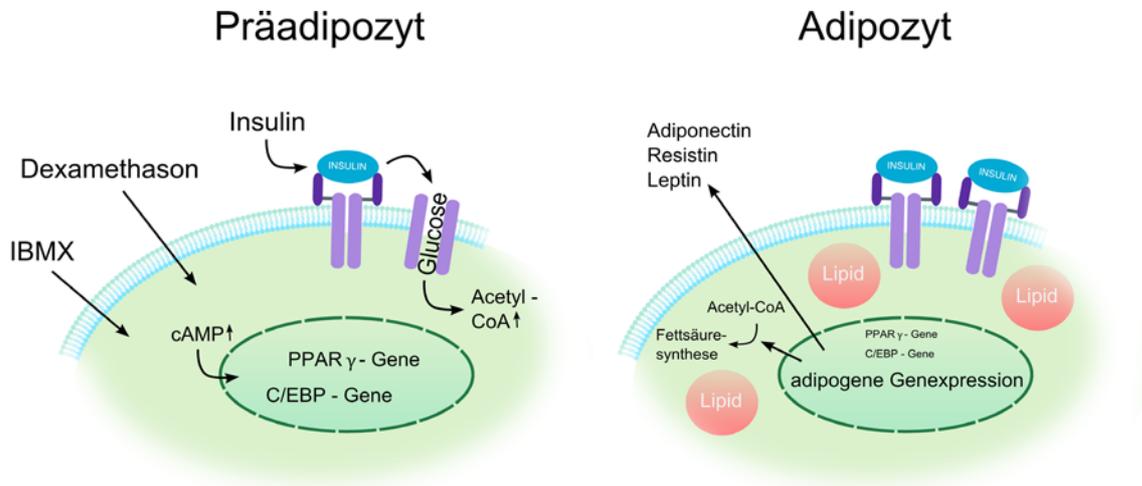


Abb. 9: Transkriptionelle Regulation der Adipogenese von MSCs und ihre Induktoren (nach *Adipogenesis Assay*, Chemicon, 2004).

1.5 Impedanzspektroskopie

Impedanzspektroskopische Verfahren werden traditionell im Bereich der Materialprüfung eingesetzt, finden aber auch Verwendung bei der Messung der spezifischen dielektrischen Eigenschaften von biologischen Zellen und Geweben. Die passiven elektrischen Eigenschaften werden durch die Permittivität ϵ (Dielektrizitätskonstante) und die elektrische Leitfähigkeit κ beschrieben. Unter Einwirkung eines äußeren elektrischen Feldes mit variierender Frequenz wird ein Impedanzspektrum mit charakteristischen Dispersionen für verschiedene Gewebe gemessen (**Abb. 10**). Die Dispersionsgebiete werden dabei durch Relaxationsprozesse und dem resultierenden Ausbleiben von Polarisationsmechanismen erzeugt. In biologischen Geweben werden Relaxationsprozesse von den unterschiedlichen Leitfähigkeiten der intrazellulären und extrazellulären Flüssigkeitsräume, membranassoziierter Strukturen und den kapazitiven Eigenschaften der Zellmembran bestimmt. Nach Induktion eines elektrischen Feldes richten sich diese Strukturen (Ionen, molekulare Dipole, Proteine und Zellorganellen) fest aus und tragen nicht mehr zur Polarisierung des Gewebes bei. Infolge dessen verringern sich die Permittivität und die resultierende Kapazität, was zu einer erhöhten Leitfähigkeit des Gewebes mit zunehmender Frequenz führt. Dieser Effekt wird in den grundlegenden Arbeiten von Foster und Schwan (Grimnes *et Martinsen*, 2008, Foster, 1995, Foster *et Schwan* 1989, Schwan, 1993, Schwan, 1957) diskutiert. In biologischen Zellen und Geweben unterscheidet man drei charakteristische Dispersionsgebiete (α -, β -, γ -Dispersion) in Abhängigkeit der Frequenz.

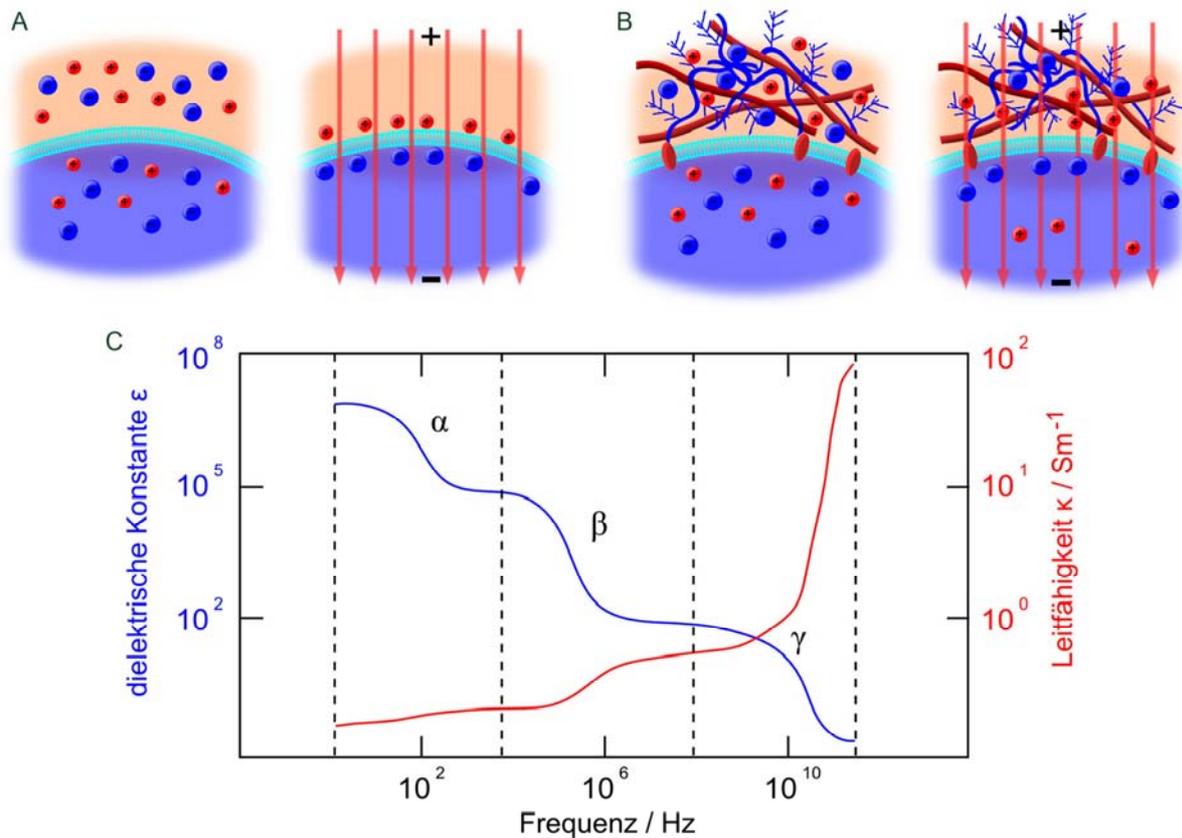


Abb. 10: Ausrichtung der Ladungsträger in Anwesenheit eines elektrischen Feldes. A) Polarisation an der Zellmembran und B) Ausrichtung der Ladungsträger in Zellen mit komplexer ECM. C) Frequenzspektrum von biologischer Zellen und Geweben. Dargestellt ist der Verlauf der Permittivität ϵ mit den drei charakteristischen Dispersionsgebieten (α , β und γ) und der Leitfähigkeit κ (nach Schwan, 1993).

Die α -Dispersion tritt bei niedrigen Frequenzen bis zu einigen kHz auf. Sie wird im Wesentlichen von der extrazellulären Elektrolytkonzentration der Zellen oder Gewebe bestimmt. Daraus folgert eine Abhängigkeit zwischen der Zusammensetzung der spezifischen extrazellulären Flüssigkeiten im Gewebe und ihrem relativen Volumen, d.h. der Gewebedichte. Teilweise wird sie auch als Dipol-Dispersion bezeichnet, die durch Anlagerung von Ladungsträgern (ionische Diffusion) auf beiden Seiten der Zellmembran entsteht. Des Weiteren wird der Verlauf der α -Dispersion durch Membrankanäle, sog. *gap junctions* (Gersing, 1998) oder der Polarisation membranassoziierter Strukturen (z.B. Kollagen, Proteoglykan, Sialinsäuren oder Zucker) verursacht.

Die β -Dispersion beschreibt die Relaxation der passiven Zellmembran. Dieser Prozess tritt im Frequenzbereich von 100 kHz - 10 MHz auf, wobei durch Ionenanlagerung aus dem intra- wie extrazellulären Raum die Polarisation der Zellmembran induziert wird. Oberhalb 10 MHz sind die Impedanzen der Zellmembran zu vernachlässigen. Sie werden durchlässig, so dass der Strom sowohl durch den intra- wie extrazellulären Raum fließt. Infolge von Polarisierungseffekten von Proteinen und Zellorganellen kommt es zur Veränderung der Permittivität. Dieser Effekt ist für die vorliegende Arbeit allerdings unerheblich, da keine Messungen in diesem Frequenzbereich erfolgten.

Die γ -Dispersion tritt oberhalb 1 GHz auf. Sie wird durch eine Orientierung von freien Wassermolekülen im Gewebe gemäß ihrer polaren Molekülstruktur induziert. Freies Wasser hat eine Relaxationsfrequenz von 25 GHz, da aber Wassermoleküle oftmals an Proteine gebunden sind, ergeben sich weitere Dispersionseffekte.

1.5.1 Physikalische Grundlagen der Impedanzspektroskopie

Die passiven elektrischen Eigenschaften von Materialien lassen sich durch die Dielektrizitätskonstante ε und die Leitfähigkeit κ beschreiben. Beide Parameter sind materialspezifisch und nicht von der Geometrie oder der Größe einer Probe abhängig. Die Leitfähigkeit κ eines Material beschreibt das Verhältnis von der Stromdichte j zu einem angelegten elektrischen Feld mit der Feldstärke E .

$$j = \kappa E \quad (\text{Gl. 1})$$

Das elektrische Feld und die resultierende Stromdichte sind vektorielle Größen, so dass die Leitfähigkeit durch einen Tensor der Stufe 2 beschrieben wird. Vereinfachend soll im Weiteren aber nur der eindimensionale Fall berücksichtigt werden. In diesem Fall ist die Leitfähigkeit κ ein Skalar. Zu beachten ist weiter, dass die Leitfähigkeit auch als Kehrwert des spezifischen Widerstandes aufgefasst werden kann. Dieser beschreibt dann den spezifischen Widerstand den ein Material einem Stromfluss entgegensetzt. Zusätzlich zu einem elektrischen Strom werden bei Beaufschlagung eines Materials mit einem elektrischen Feld Ladungen innerhalb dieses Materials induziert, verschoben und voneinander getrennt. Dabei entsteht ein inneres Feld, das durch die elektrische Flussdichte D beschrieben wird. Dieser Vorgang wird auch als Polarisation bezeichnet. Die dielektrische Konstante ε beschreibt dabei das Verhältnis von einem elektrischen Feld E zu der elektrischen Flussdichte D .

$$D = \varepsilon E \quad (\text{Gl. 2})$$

Für die Dimension der Dielektrizitätskonstante gilt das Gleiche wie für die Leitfähigkeit. Im Weiteren wird auch hier nur der eindimensionale Fall betrachtet. Zu beachten ist, dass in einem elektrisch leitfähigen Material im Allgemeinen keine Polarisation zu beobachten ist, da eine eventuelle Verschiebung von gebundenen Ladungen durch einen Stromfluss ausgeglichen wird. Eine Polarisation wird nur in Materialien beobachtet, die schwach- oder nichtleitend sind. Dabei ist die Beweglichkeit der Ladungsträger temperaturabhängig. Da dieser Vorgang nicht instant erfolgen kann, ist die Änderung der Polarisation gegenüber der Änderung des elektrischen Feldes zeitlich verschoben. Dadurch wird die Dielektrizitätskonstante eine komplexe, frequenzabhängige Größe, die im Folgenden als dielektrische Funktion bezeichnet wird, mit dem Realteil ε' und dem Imaginärteil ε'' .

$$\varepsilon(f) = \varepsilon'(f) - i\varepsilon''(f) \quad (\text{Gl. 3})$$

Die Abhängigkeit der Dielektrizitätskonstante von der Frequenz wird als Dispersion bezeichnet. Aus experimentellen Studien ist bekannt, dass Gewebe eine starke Dispersion im Frequenzbereich zwischen 1 Hz - 10 MHz zeigen und dass diese Dispersion von der Art und Struktur des Gewebes abhängt. Über die Messung der Frequenzabhängigkeit der Dielektrizitätskonstante lassen sich Aussagen über die Gewebeart schließen. Eine Möglichkeit zur Bestimmung der dielektrischen Funktion eines Materials in diesem

1. Einleitung

Frequenzbereich besteht darin, eine Probe des Materials in einen Kondensator (**vgl. Gl. 11**), also zwischen zwei metallische Platten, einzubringen und dann die komplexe Impedanz $Z(f)$ dieses Kondensators zu messen. Dieses Messverfahren wird allgemein als Impedanzspektroskopie bezeichnet. Als Impedanz wird der Wechselstromwiderstand eines Bauelements bezeichnet. Dieser beschreibt das zeitunabhängige Verhältnis von der angelegten Wechselspannung

$$u(t, f) = a_u(f) \cos(2\pi ft) \quad (\text{Gl. 4})$$

mit der Frequenz f zu dem resultierenden Stromfluss.

$$i(t, f) = a_i(f) \cos(2\pi ft + \varphi(f)) \quad (\text{Gl. 5})$$

Wobei gilt:

$$Z(f) = \frac{u(t, f)}{i(t, f)} \quad (\text{Gl. 6})$$

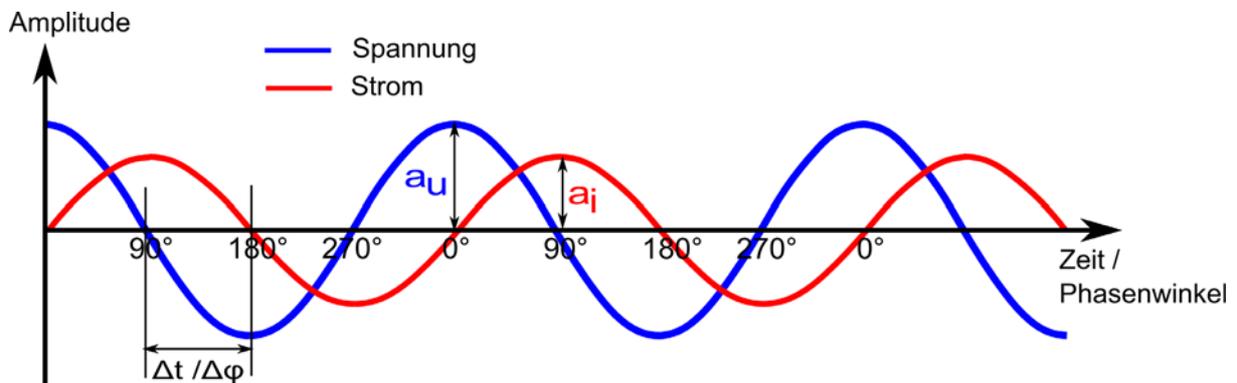


Abb. 11: Strom- und Spannungsverlauf eines idealen Kondensators. Der Strom ist gegenüber der Spannung zeitlich um 90° verschoben.

Damit die **Gleichung 6** erfüllt ist, muss sich das Bauelement im linearen Bereich befinden. Nur dann ist $Z(f)$ zeitunabhängig und das Verhältnis von Strom und Spannung konstant. Dabei sind im allgemeinen Strom- und Spannungsverlauf zwar gleichartig sinusförmig, aber zeitlich gegeneinander verschoben (**Abb. 11**). Diese zeitliche Verschiebung wird durch den Phasenwinkel φ beschrieben und kann durch eine komplexe Schreibweise der Impedanz in der Euler-Darstellung ausgedrückt werden.

$$Z(f) = |Z(f)| e^{i\varphi(f)} \quad (\text{Gl. 7})$$

Der Betrag der Impedanz gibt das Verhältnis der Effektivwerte von Strom zu Spannung an.

$$|Z(f)| = \frac{a_u(f)}{a_i(f)} \quad (\text{Gl. 8})$$

Die Umrechnung in die algebraische Form erfolgt nach:

$$Z = |Z| e^{i\varphi} = |Z| \cos(\varphi) + i |Z| \sin(\varphi) \quad (\text{Gl. 9})$$

Die Messung der dielektrischen Funktion einer Probe kann so auf die Impedanz, also dem Verhältnis von Wechselstrom zu Spannung, zurückgeführt werden. Die Beziehung zwischen Impedanz und dielektrischer Funktion ergibt sich dann aus den Formeln für die Impedanz eines Plattenkondensators. Die Kapazität C eines Plattenkondensators berechnet sich aus der Fläche der Platten A und der Abstand der Platten d mit der dielektrischen Funktion des Mediums zwischen den Platten.

$$C(f) = \frac{\varepsilon(f)A}{d} = \frac{A}{d}(\varepsilon'(f) + i\varepsilon''(f)) \quad (\text{Gl. 10})$$

Für eine komplexe dielektrische Funktion wird auch die Kapazität eines Kondensators frequenzabhängig. Die Impedanz eines Kondensators kann aus der Kapazität des Kondensators berechnet werden.

$$\frac{1}{Z(f)} = i2\pi fC = \frac{A}{d}2\pi f\varepsilon'(f) + i\frac{A}{d}2\pi f\varepsilon''(f) \quad (\text{Gl. 11})$$

Man sieht jetzt, dass eine komplexe dielektrische Funktion zu einer realen Leitfähigkeit des Kondensators führt. Gemeinhin wird die dielektrische Funktion nicht aus der gemessenen Impedanzkurve berechnet, sondern direkt analysiert. Zu beachten ist auch, dass die Impedanz keine materialspezifische Eigenschaft mehr ist, sondern von der Geometrie der Probe abhängt. Im einfachsten Fall handelt es sich hier um eine Konstante, die sich aus der Geometrie des verwendeten Kondensators ergibt. In den meisten Fällen, wie auch hier, ist die Probenkammergeometrie komplex. Insbesondere da auch der Einfluss der Probenkammer frequenzabhängig sein kann. Hier muss zum einen eine Messung der leeren Probenkammer erfolgen, eine sogenannte Nullmessung, zum anderen muss diese Abhängigkeit bei der Auswertung berücksichtigt werden.

1.5.2 Aufbau eines Impedanzmesssystems

Ein Impedanzmesssystem besteht im Prinzip aus einer Probenkammer und einem Impedanzmessgerät (**Abb. 12A**). Ein Signalgenerator mit einstellbarer Frequenz erzeugt eine sinusförmige Wechselspannung. Die Wechselspannung wird über zwei Messleitungen und einem Widerstand an die Probenkammer geleitet. Die Erfassung des Stroms erfolgt indirekt. Über dem Messwiderstand fällt eine zum Strom proportionale Spannung an, die mit einem integrierten Spannungsmesser gemessen wird. Über zwei weitere Messleitungen und einem weiteren Spannungsmesser wird der Spannungsabfall an der Probe gemessen. Die Spannungsmesser erfassen den Effektivwert der Wechselspannung. Damit ergibt sich aus den beiden gemessenen Spannungen, wie in **Gleichung 8** beschrieben, der Betrag der Impedanz. Um auch den Phasenwinkel zu bestimmen, wird ein Phasendetektor benutzt. Dieser vergleicht das Signal am Messwiderstand mit dem Signal an der Probe. Durch Variation der Frequenz erhält man den Impedanzverlauf in Polarkoordinaten. Durch Variation der Ausgangsleistung des Signalgenerators in Abhängigkeit der Impedanz der Probe kann eine Messung zusätzlich bei konstanter Spannung oder konstantem Strom erfolgen.

In Realität kann die Probenkammer nur in den seltensten Fällen (Festkörper mit aufgedampften Elektroden) als idealer Kondensator dargestellt werden. Des Weiteren muss die Messung von biologischen Proben in einem Zellkulturmedium erfolgen, dass die Vitalität der Probe während der Messung gewährleistet. Dies führt dazu, dass auch das Messsystem

1. Einleitung

eine frequenzabhängige Impedanz zeigt, die den Impedanzverlauf der Probe überlagert. Hier müssen bei der Auswertung und Interpretation, soweit wie möglich, diese beiden Effekte voneinander getrennt werden. Dieses kann durch ein äquivalentes elektrisches Modell (Ersatzschaltbild) erfolgen, das das Impedanzverhalten der Probe und des Messsystems anhand verschiedener Parameter beschreibt.

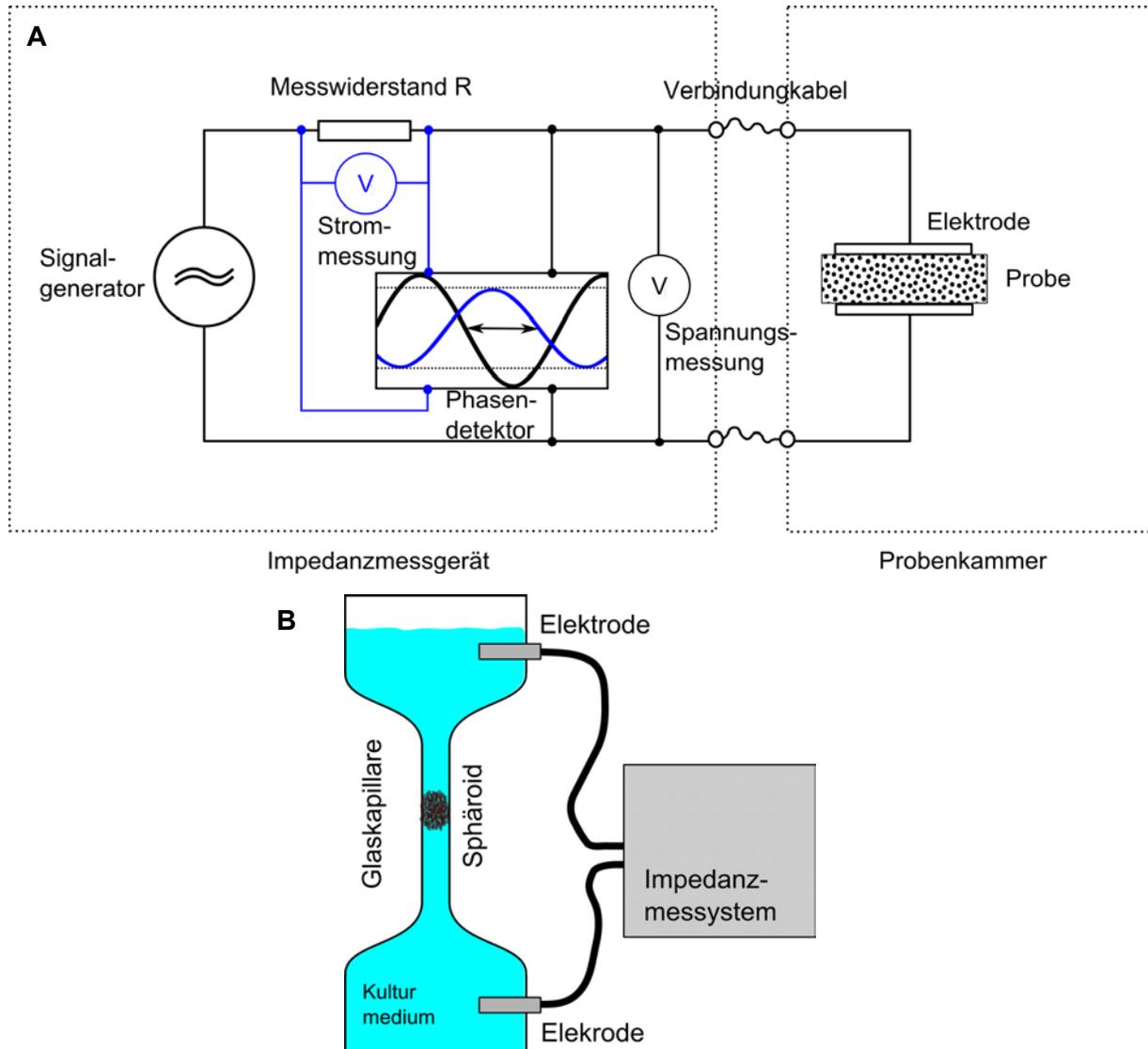


Abb. 12: A) Ersatzschaltbild eines Impedanzmesssystems. B) Darstellung der experimentellen Probenkammer mit angeschlossenem Impedanzmesssystem.

Das Konzept einer kapillarbasierten Probenkammer wurde im Rahmen der Dissertation von H. Thielecke (2002) entwickelt (**Abb. 12B**). Das System besteht aus einer Glaskapillare, die einen inneren Durchmesser von $300\ \mu\text{m}$ hat und deren Enden konisch erweitert sind. In dieser Kapillare befinden sich jeweils Platinelektroden, die über Koaxialkabel mit dem Impedanzmessgerät verbunden sind. Die gesamte Kapillare ist mit Kulturmedium gefüllt, wobei das untere Ende mit einer Pumpe verbunden und das obere Ende offen ist. Die Sphäroide werden in die obere Kapillaröffnung eingebracht und vorsichtig mit der Pumpe in die Kapillare gesaugt. Dabei sollen die Sphäroide größer sein als der innere Durchmesser

der Kapillare, um die Probenkammer abzudichten. Damit wird sichergestellt, dass der gesamte Strom durch die Probe fließt.

1.5.3 Modellbildung

Impedanzspektren werden auf zwei verschiedene Arten dargestellt (**Abb. 13**). Im Bode-Diagramm erfolgt eine getrennte Auftragung des Betrags der Impedanz $|Z|$ und des Phasenwinkels φ gegen die Frequenz f . Im Argand-Diagramm wird die komplexe Impedanz Z als Vektor im kartesischen Koordinatensystem dargestellt. Dieses erfolgt durch Auftragung des Imaginärteils Z'' gegen den Realteil Z' . Beide Darstellungsweisen sind mathematisch äquivalent, sie ergeben sich aus:

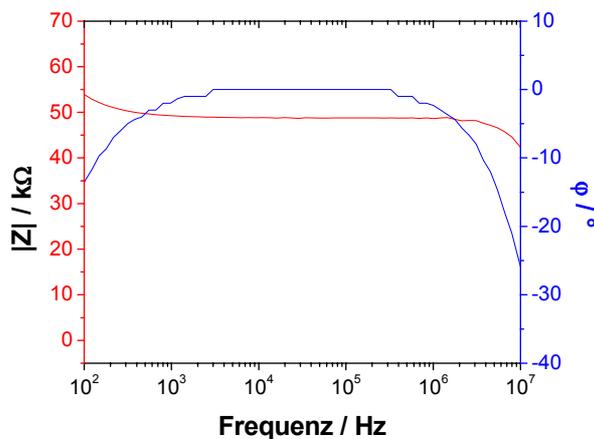
$$Z = |Z|e^{i\varphi} = |Z|\cos(\varphi) + i|Z|\sin(\varphi) \quad (\text{Gl. 12})$$

$$Z = Z' + iZ'' \quad (\text{Gl. 13})$$

$$Z' = |Z|\cos(\varphi) \quad (\text{Gl. 14})$$

$$Z'' = |Z|\sin(\varphi) \quad (\text{Gl. 15})$$

Bode-Diagramm



Argand-Diagramm

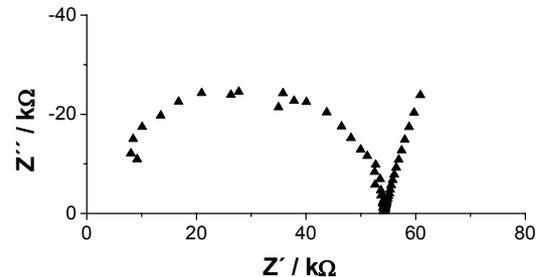


Abb. 13: Äquivalente der Impedanz des MSC-Kulturmediums (Messmedium) im Bode-Diagramm und im Argand-Diagramm.

Auf diese Weise können zwar die definierenden Impedanzspektren einer Probe abgebildet werden, aber der Informationsgehalt beschränkt sich auf eine Ableitung der Probendichte aus dem Betrag der Impedanz $|Z|$ und der Homogenität der Probe aus dem Phasenwinkel φ bzw. aus der Darstellung verschiedener Dispersionsgebiete in der Ortskurve des Argand-Diagramms. Zur genaueren Interpretation dieser Spektren ist es notwendig ein äquivalentes elektrisches Modell für die gemessenen Impedanzen zu etablieren. Auf diese Weise wird der Einfluss der zugrundeliegenden Strukturparameter charakterisiert, wie z.B. die Zellmembran, die Beschaffenheit des extrazellulären Raums (ECM, Zell-Interaktionen) und des intrazellulären Raums (Zytoplasma und Zellorganellen). Dafür stehen zwei Verfahren zur

Verfügung. Zum einen kann eine Modellkurve analytisch aus der Relaxationstheorie berechnet werden. Dabei erfolgt eine Anpassung dieser analytischen Beschreibung an die gemessene Kurve durch freie Parameter. Zum anderen kann ein aus der Elektrotechnik bekanntes Verfahren benutzt werden, bei dem aus einfachen Elementen mit bekanntem Impedanzverlauf durch Zusammenschalten ein Ersatzschaltbild erstellt wird. Die einzelnen Elemente entsprechen bei der Modellbildung dann bestimmten Elementen des realen Gewebes. Der resultierende Impedanzverlauf kann nach der Kirchhoffschen Regel für Schaltkreise aus den einzelnen Elementen berechnet werden. Das zweite Verfahren bietet sich insbesondere bei komplexen Aufbauten an, bei denen auch das Messsystem berücksichtigt werden muss. Hier ist eine analytische Berechnung des zu erwartenden Impedanzverlaufs schwierig bis unmöglich. Für die Bildung eines Ersatzschaltbildes stehen verschiedene Grundelemente und Grundschaltungen zur Verfügung (**Abb. 14**).

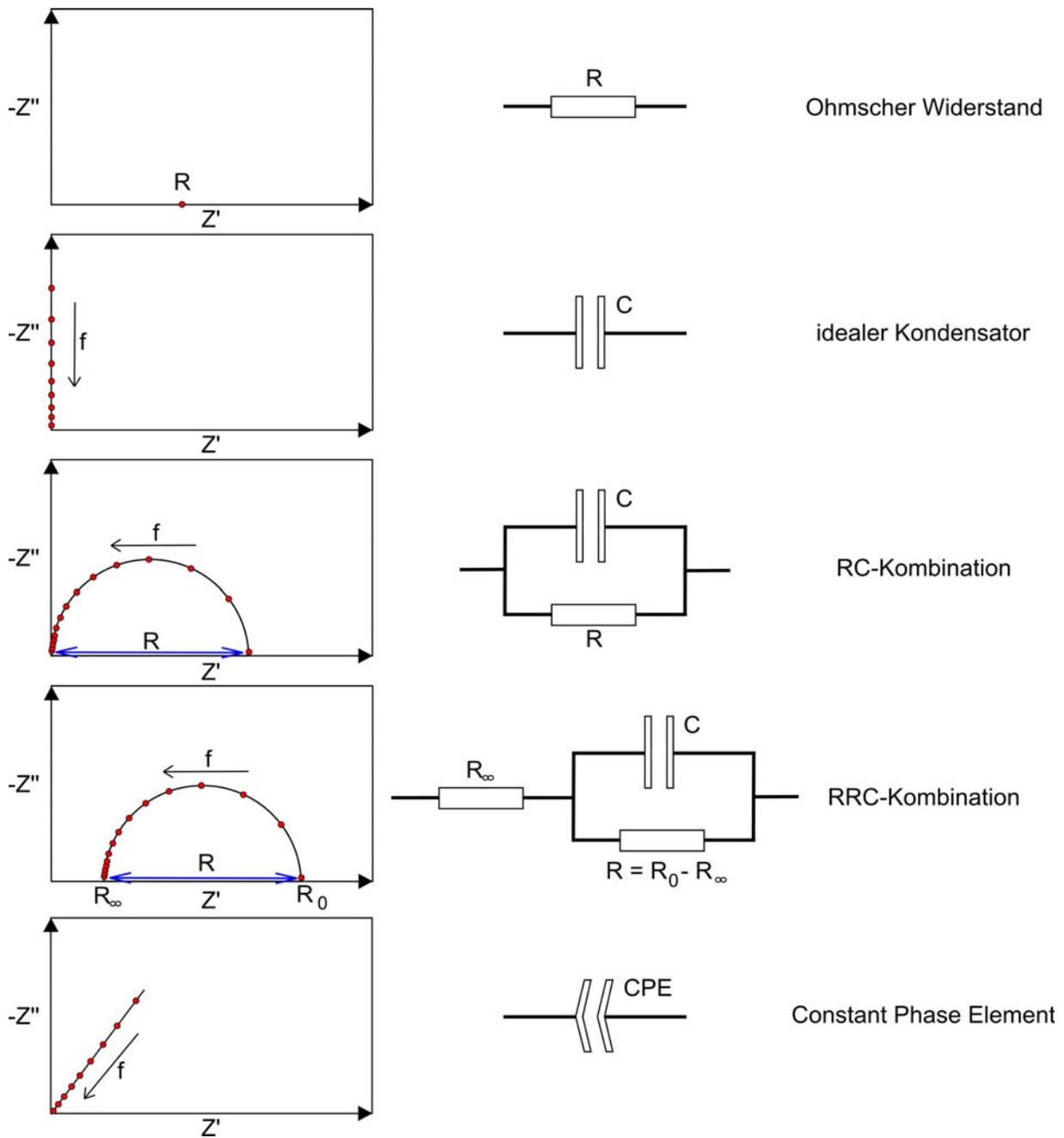


Abb. 14: Ortskurven der verschiedenen Ersatzschaltkreise. Mit: Z' = Realteil der Impedanz, Z'' = Imaginärteil der Impedanz und f = Frequenzverlauf.

In der Literatur wird ein grundlegendes Modell für Zellen und Gewebe beschrieben. Dieses elektrische Zellmodell demonstriert den Ursprung der passiven elektrischen Zell- und Gewebeeigenschaften. Die Zellmembran wird dabei durch einen Kondensator C und der intra- und extrazelluläre Raum durch die Widerstände R_i und R_e beschrieben. Da eine getrennte Betrachtung der intra- und extrazellulären Kompartimente erfolgt, ist es ein sog. *bi-domain* Modell. In **Abbildung 15A** und **15B** sind das elektrische Zellmodell und dessen Vereinfachung dargestellt. Beide Modelle sind analog und äquivalent, d.h. sie führen zu den gleichen Spektren im Bode-Diagramm und im Argand-Diagramm (Webster, 1989).

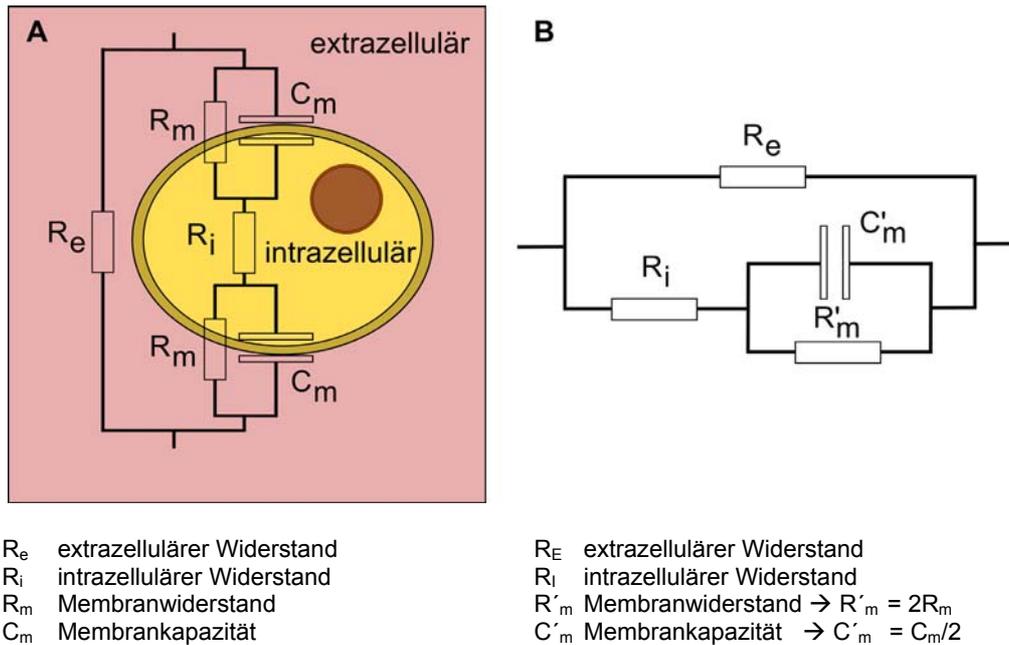


Abb. 15: A und B) Analoge elektrische Ersatzschaltbilder einer Zelle (nach Webster, 1989).

Unter der Annahme, dass die Zellmembran rein kapazitive Eigenschaften besitzt (Pauly *et al.*, 1958), kann dieses Modell weiter vereinfacht werden zu dem Ersatzschaltbild **16A**. Dieses Modell wird bereits vielfach zur Bestimmung unterschiedlicher Gewebe eingesetzt, wie z.B. zur Körperfettbestimmung (De Lorenzo *et al.*, 1997), für kanzerogene Gewebe (Jossinet, 1998) und für Ischämien (Gewebedurchblutung) (Kun *et al.*, 1999). Des Weiteren wird für die Beschreibung des Impedanzverlaufs von Zellen und Gewebeverbänden in der Literatur ein weiteres Modell beschrieben (Fricke *et al.*, 1925, McAdams *et al.*, 1995) (**16B**). Beide Ersatzschaltbilder sind äquivalent und modellieren demnach denselben Impedanzverlauf (Grimnes *et al.*, 2008).

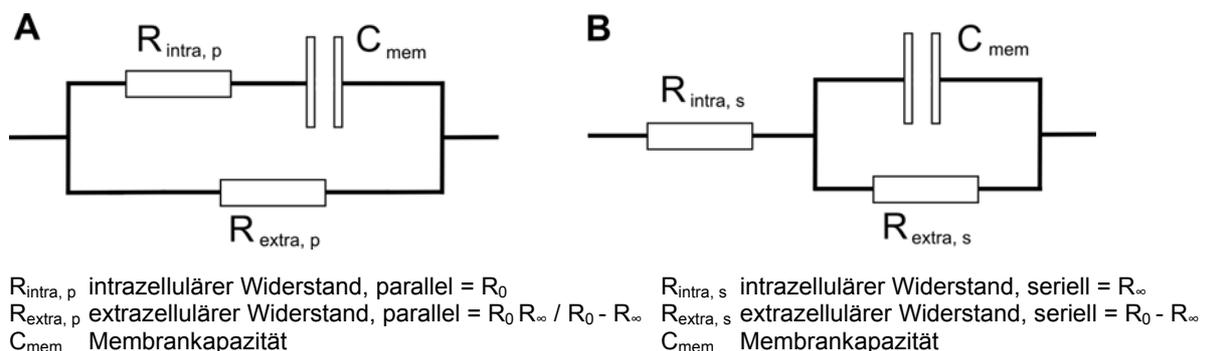


Abb. 16: Äquivalente Ersatzschaltbilder für Zellen und Gewebe (nach Grimnes *et al.*, 2008).

Der Vergleich mit realen Geweben zeigt jedoch, dass deren realer Impedanzverlauf von diesen idealen Modellen abweicht. Es reduziert die Polarisation eines Gewebes auf eine einzige Relaxationszeit, was einen homogenen Aufbau aus identischen Struktureinheiten impliziert. Reale Gewebe charakterisieren sich durch ihre Heterogenität. Die

1.5 Impedanzspektroskopie

Wechselwirkungen verschiedener fraktaler Struktureinheiten und deren Relaxationsprozesse beeinflussen die Gesamtantwort des Systems. Die Systemantwort setzt sich aus einer Vielzahl von Relaxationszeitkonstanten τ zusammen, die sich als verschiedene zirkuläre Bereiche in der Ortskurve der Impedanz darstellen (**Abb. 17A**). Die Zeitkonstante ist dabei indirekt proportional zur Winkel- oder Rotationsgeschwindigkeit ω (**vgl. Formelzeichen**). Auch ist der Verlauf nicht ideal zirkulär, sondern der Mittelpunkt befindet sich unterhalb der reellen Achse. Dabei wird der Verlauf der Ostkurve durch den Dispersionsparameter α bestimmt. Diese Eigenschaften werden in dem Modell von Cole berücksichtigt (**Abb. 17B**). Die ideale Kapazität C der Zellmembran wird in diesem Ersatzschaltbild durch ein Impedanz konstanter Phase Element (*Constant Phase Element*, CPE) ersetzt und simuliert die fraktale Geometrie realer biologischer Gewebe (**Abb. 17C**).

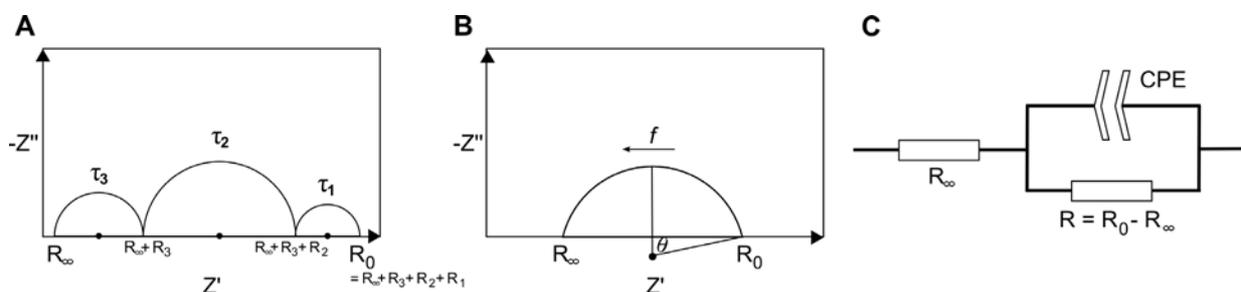


Abb. 17: Ortskurven der komplexen Impedanz in Geweben und Zellverbänden. A) Darstellung eines idealen Systems mit drei Relaxationszeitkonstanten τ_1 , τ_2 und τ_3 . Die Mittelpunkte der Halbkreise liegen auf der reellen Achse. B) Cole-Modell. Die Ortskurve der komplexen Impedanz stellt sich als nicht idealer Halbkreis da, dessen Mittelpunkt unterhalb der reellen Achse liegt. C) Korrespondierendes elektrisches Ersatzschaltbild mit einem CPE-Element (nach Grimnes *et* Martinsen, 2008).

Die dielektrischen Eigenschaften werden dabei nach Cole wie folgt beschrieben (Cole, 1940, Cole *et* Cole 1941, Grimnes *et* Martinsen, 2008):

$$Z(f) = R_\infty + \frac{R_0 - R_\infty}{1 + (i2\pi f\tau)^\alpha} \quad (\text{Gl. 16})$$

mit

R_0	Widerstand bei Nullfrequenz / Ω
R_∞	Widerstand bei unendlicher Frequenz / Ω
τ	Relaxationszeitkonstante
α	Dispersionsparameter, mit $0 \leq \alpha \leq 1$
f	Frequenz

Es folgt für das CPE-Element:

$$Z_{CPE}(f) = \frac{R_{(2\pi f\tau=1)}}{(i2\pi f\tau)^\alpha} \quad (\text{Gl. 17})$$

mit

$R_{(2\pi f\tau=1)}$ Widerstand bei $f\tau = 1/\Omega$
 $Z_{CPE}(f)$ modellierte Impedanz / Ω

Bei der Simulation der Impedanz eines CPE-Elements mit ZView2 wird diese Funktion gemäß **Gleichung 18** umgeformt. Das CPE-Element wird dabei durch die Parameter CPE-P und CPE-T definiert. CPE-P bezeichnet synonym den Dispersionsparameter α , der die Depression der Ortskurve beschreibt. Die elektrische Kapazität wird durch den Parameter CPE-T beschrieben.

$$Z_{CPE}(f) = \frac{1}{T(i2\pi f)^P}, \text{ mit } \tau^P = R_{(2\pi f\tau=1)}T \text{ und } \alpha = P \quad (\text{Gl. 18})$$

1.5.4 Impedanzbasierte Systeme zur Zell- und Gewebecharakterisierung

Über eine Messung der dielektrischen Eigenschaften werden strukturelle und physiologische Informationen von Zellen und Geweben erfasst. Da zelluläre Parameter, wie z.B. die Membranintegrität, Zusammensetzung des Zytoplasmas sowie die Beschaffenheit des extrazellulären Raums, direkt abgeleitet werden können, ermöglicht diese Technologie ein weites Applikationsspektrum in der biologischen Forschung und in der klinischen Diagnostik.

In der Literatur werden 2D-Systeme für Zelladhäsions-, Migrations- und Proliferationsstudien beschrieben (Giaver *et Keese*, 1993). Diese Systeme werden ebenfalls zur Untersuchung von pathologischen Prozessen und für toxikologische Substanztestungen eingesetzt (Asphahani *et Zhang*, 2007) und erste Arbeiten erforschen die Regulation von Ionenkanälen in MSCs als funktionalen Marker bei der Differenzierung in Herzmuskelzellen (Heubach *et al.*, 2003). Des Weiteren werden impedanzspektroskopische Verfahren zur Bestimmung von Volumenänderungen von Zellen sowie zur Sortierung (*cell and partikel sorting*) vitaler/nicht vitaler Zellen und anderer Biopartikel (Proteine, DNA, Bakterien) eingesetzt (Grimnes *et Martinsen*, 2008) und finden ebenfalls Verwendung bei der Charakterisierung von zellbasierten Gewebemodellen. Dabei sind toxikologische Substanztestungen an Tumorzellaggregaten (Thielecke *et al.*, 2001) oder die Bestimmung der Proliferation auf 3D-Trägersubstraten (Dziong *et al.*, 2007) typische Applikationsbeispiele.

Neben Partikelzählern zur Zellzahlbestimmung (z.B. Casy von Schärfe System oder Colter Counter von Beckman Coulter) werden bereits kommerzielle 2D-Systeme (z.B. cellZscope von nano analytics oder xCELLigence von Roche) für ein weites Spektrum für Zellkulturstudien angeboten. Des Weiteren finden impedanzbasierte Verfahren in der klinischen Diagnostik ein breites Anwendungsspektrum. Das wohl prominenteste Beispiel ist die Elektroenzephalographie (EEG) zur Messung von Gehirnströmen und Nervenzellimpulsen. Aber auch die *electrical impedance myography* (EIM) zur Diagnose von neuromuskulären Erkrankungen (Rutkove, 2009, Ogunnika *et al.*, 2008) und die Elektrogastrographie (EGG) zur Feststellung von Verdauungsaktivitäten zählen zu den diagnostischen Standardverfahren. Systeme zur Bestimmung der Zusammensetzung des Organismus hinsichtlich des Fettanteils, der Muskelmasse und des intrazellulären/extrazellulären Flüssigkeitsgehaltes werden nicht nur zur Überwachung von Dialysepatienten eingesetzt, sondern finden breite Verwendung zur Körperfettbestimmung (Grimnes *et Martinsen*, 2008).

1.6 Akustische Mikroskopie

Ultraschall wird als nicht invasives Verfahren in der klinischen Diagnostik sowie in der Materialprüfung eingesetzt. Bei diesem Verfahren werden Ultraschallwellen (hochfrequente Schallwellen) genutzt, um die lokalen mechanischen Eigenschaften der Gewebe oder Materialien abzubilden. Dabei sind die Durchdringungstiefe sowie die lokale Auflösung frequenzabhängig. Allgemein gilt, dass eine höhere Frequenz zu einer besseren Auflösung aber wesentlich geringeren Eindringtiefe führen. Die konventionelle Ultraschalldiagnostik arbeitet im Frequenzbereich zwischen 1 MHz - 20 MHz und ermöglicht die Diskriminierung von verschiedenen Geweben und Strukturen im Bereich von 0,1 mm. In der akustischen Mikroskopie werden Frequenzen von 100 MHz - 2 GHz eingesetzt. Bei einer Frequenz von 1 GHz ist die Darstellung der lokalen mechanischen Eigenschaften mit einer Auflösung von 1 μm möglich. Diese hohe lokale Auflösung bedingt eine Durchdringungstiefe von wenigen Mikrometern, so dass dieses Verfahren im Rahmen dieser Arbeit zur Charakterisierung von 2D-Zellkulturen angewendet wurde.

Historisch wurde akustische Mikroskopie bereits 1975 zur Darstellung von Zellen (Lemons *et al.*, 1975) und subzellulärer Strukturen (Johnston *et al.*, 1979) eingesetzt. Auf dem Niveau der Zellcharakterisierung wurde dieses Verfahren bereits zur Darstellung des Aktinskeletts vitaler Herzmuskelzellen (Weiss *et al.*, 2007), der Organisation der Chromosomen bei der Zellteilung (Weiss, 2007), regulatorischer Volumenänderungen in rodenten Hepatozyten (Plettenberg *et al.*, 2008) und dynamischer Änderungen des Zytoskeletts sowie der zellmechanischen Eigenschaften von Xenopod-Eizellen (Bereiter-Hahn *et al.*, 1995) etabliert. Des Weiteren wurden die elastischen Eigenschaften verschiedenster Gewebe anhand von Dünnschnitten untersucht (Draft *et al.*, 1989, Okawai *et al.*, 2001) und als diagnostisches Verfahren für pathologische Gewebeveränderungen eingesetzt, z.B. zur Erkennung von Fibrosen und Tumoren der Niere (Sasaki *et al.*, 1996). Dabei ist die Charakterisierung von Knochen- oder Knorpelgewebe und deren pathologischer Veränderungen eine der Hauptapplikationen von akustischer Mikroskopie (Leicht *et al.*, 2008, Raum *et al.*, 2004, Hoffmann *et al.*, 2006). Aber auch die Diagnose von Plaques in Gefäßen ist ein konventionelles Einsatzgebiet von hochfrequentem Ultraschall (Baldewising *et al.*, 2008, Gark *et al.*, 2010).

1.6.1 Physikalische Grundlagen der Akustik

Als Ultraschall werden Schallwellen oberhalb von 20 kHz bezeichnet. Sie breiten sich in longitudinalen Wellen aus, die mit einer lokalen periodisch auftretenden Änderung des Drucks, der Dichte und auch der Temperatur des jeweiligen Mediums (Gase oder Flüssigkeiten) verbunden sind. Dabei korreliert die lokale Druckänderung, der Schalldruck p , mit einer Änderung der momentanen Teilchenbewegung, der Schallschnelle v . Das Produkt der beiden Größen ist die Schallintensität I .

$$I = p v \quad \text{(Gl. 19)}$$

Die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Schallwellen, die Schallgeschwindigkeit c , innerhalb eines Medium ergibt sich aus dem Kompressionsmodul K , einer materialabhängigen Konstante, und der Dichte σ des Medium im nicht angeregtem Zustand.

$$c = \sqrt{\frac{K}{\sigma}} \quad \text{(Gl. 20)\#}$$

Die schalleitenden oder auch elastischen Eigenschaften eines Mediums werden durch die akustische Impedanz Z charakterisiert und beschreiben den Widerstand, der der Schallausbreitung entgegengesetzt wird. Dieser Parameter ist als das Verhältnis des Schalldrucks p , der die induzierte Änderung zum Normaldruck beschreibt, und der Schallschnelle v definiert. Er ist äquivalent zum Produkt der Schallgeschwindigkeit c und der Dichte σ . Bei der akustischen Impedanz handelt es sich um eine Materialkonstante, die sich direkt aus der Dichte und dem Kompressionsmodul des Mediums ergibt.

$$Z = \frac{p}{v} = \frac{I}{v^2} = \frac{p^2}{I} = \sigma c = \sqrt{K\sigma} \quad \text{(Gl. 21)}$$

Beim Auftreffen einer Schallwelle auf ein Objekt wird ein Teil des Schalls reflektiert. Der Reflexionskoeffizient R beim Übergang von einem Medium mit der akustischen Impedanz Z_1 in ein anderes Medium mit der akustischen Impedanz Z_2 ergibt sich zu:

$$R = \frac{Z_2 - Z_1}{Z_2 + Z_1} = \frac{p_r}{p_i} \quad \text{(Gl. 22)}$$

und gibt das Verhältnis des Schalldruckes der reflektierten Welle p_r und der einfallenden Welle p_i wieder. Der Teil des Schalls der nicht Reflektiert wird, tritt in das zweite Medium ein, er wird transmittiert. Der Transmissionskoeffizient lässt sich aus der Energieerhaltung bestimmen. Die Intensität des reflektierten Schalls I_r und des transmittierten Schalls I_t muss gleich der Intensität der einfallenden Welle I_i sein.

$$I_i = I_r + I_t \quad \text{(Gl. 23)}$$

Die oben genannten Formeln gelten nur für den Fall der senkrechten Schalleinstrahlung. Ist diese nicht gegeben, muss der Reflexionsfaktor noch mit einem winkelabhängigen Faktor korrigiert werden. Zusätzlich kommt es an den Grenzschichten noch zur Brechung der eingestrahnten Wellen. Die Welle pflanzt sich in dem zweiten Medium mit einem anderen Winkel und einer anderen Schallgeschwindigkeit fort.

$$\frac{\sin(\theta_1)}{\sin(\theta_2)} = \frac{c_1}{c_2} \quad \text{(Gl. 24)}$$

Dieser Effekt kann aber weitestgehend vermieden werden, wenn im Fernfeld, also mit leichter Defokussierung der Linse gemessen wird (Bereiter-Hahn *er al.*, 1995). Zusätzlich sind die Schallgeschwindigkeitsunterschiede im Gewebe sehr klein, so dass der Winkelunterschied nur gering ist. Bei der akustischen Mikroskopie wird die Amplitude der reflektierten Welle gemessen, aus der sich der Schalldruck und damit der Reflexionskoeffizient einer Probe berechnen lassen. Aus diesen Parametern wiederum lässt sich dann bei bekannter Impedanz des Koppelmediums auch die akustische Impedanz der Probe berechnen. Das lokale Auflösungsvermögen ist abhängig von der Wellenlänge der genutzten Schallwelle. Durch die starke Fokussierung der akustischen Wellen mittels der

1.6 Akustische Mikroskopie

akustischen Linse wird eine Auflösung nahe der Wellenlänge erreicht. Die Wellenlänge λ ergibt sich aus der Frequenz f und der Schallgeschwindigkeit c .

$$\lambda = \frac{c}{f} \qquad \text{(Gl. 25)}$$

1.7 Zielsetzung

Problemstellung:

Aufgrund der Fähigkeit zur Replikation und zur Differenzierung in spezialisierte Gewebezellen (Caplan, 1991) sind adulte Stammzellen von hohem Interesse für die regenerative Medizin und für die zellbasierte Forschung. Die am besten charakterisierten adulten Stammzellen sind die mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark, die bereits mit vielversprechenden Resultaten zur Rekonstruktion von Knochendefekten eingesetzt wurden (Quarto, *et al.*, 2001, Cancedda *et al.*, 2003). Neuere Forschungsergebnisse belegen die Existenz von mesenchymalen Stammzellpopulationen im Nabelschnurblut und dem Fettgewebe (Kern *et al.*, 2006). Diese Gewebe haben den Vorteil, dass sie für eine Zellisolation leichter zugänglich sind, aber das Potential dieser Stammzellpopulationen ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Eine weitere potentielle Ressource sind embryonale Stammzellen. Diese Zellen besitzen ein höheres Differenzierungs- und Replikationsvermögen (Thomson *et al.*, 1989), aber zum gegenwärtigen Zeitpunkt existieren keine standardisierten Kulturverfahren. So ist es notwendig, geeignete *in vitro* Bedingungen für die Kultivierung und gezielten Differenzierung zu etablieren. Die klassische *in vitro* Zellkultur basiert auf einer 2D-Kultivierung von Zellen. Dieses Kultursystem berücksichtigt aber nicht die im Gewebe vorliegenden 3D-Zell/Zell-Wechselwirkungen (**vgl. Abschnitt 1.1.3**), welche essentiell für eine Vielzahl von Zellinteraktionen sind, wie z.B. Proliferation, Differenzierung und Apoptose (Berrier *et al.*, Yamada, 2007). Da 3D-Zellverbände die physiologischen Verhältnisse besser widerspiegeln als 2D-Systeme, sind sie interessante Gewebemodelle für die *in vitro* Forschung. Eine 3D-Kultivierung und osteogene Differenzierung der MSCs erfolgt konventionell auf Trägermaterialien. Die Interaktion der Zellen mit diesen Trägermaterialien beeinflusst dabei die zelluläre Adhäsion und die Differenzierung (Sayer *et al.*, 2005, Mauney *et al.*, 2004, Ohgushi *et al.*, Caplan, 1999). Daher werden zur Untersuchung der osteogenen Differenzierung trägerfreie 3D-Kulturmodelle benötigt, um materialspezifische Einflüsse auszuschließen.

Der Einsatz von mesenchymalen Stammzellen in der regenerativen Medizin oder als *in vitro* Modelle für *screening*-Applikationen erfordert Verfahren zur kontinuierlichen Prozesskontrolle und Qualitätssicherung der Zellproben. Da die konventionellen Methoden zur Zellcharakterisierung und Untersuchung von Differenzierungsprozessen invasiv sind, werden zerstörungsfreie Verfahren benötigt. Impedanzspektroskopie ist ein nicht invasives Verfahren, welches die dielektrischen Eigenschaften von Zellen und Geweben untersucht. Dabei lassen sich zelluläre Parameter wie die Membranintegrität, Zusammensetzung des Zytoplasmas sowie die Beschaffenheit des extrazellulären Raums und die Wechselwirkungen von Zellen (Zell-Zell-Interaktionen) ableiten (Foster, 1995, Forster *et al.*, Schwan, 1989). Zahlreiche Forschungsergebnisse belegen, dass die dielektrischen Eigenschaften spezifisch für die verschiedenen Gewebe sind (Gabriel *et al.*, 1996). Daraus folgert die Hypothese, dass der Prozess der osteogenen Differenzierung mit spezifischen Änderungen der Impedanzspektren korreliert. Die Untersuchung der osteogenen Differenzierung in 3D-Zellverbänden mittels Impedanzspektroskopie ist ein innovativer Ansatz zur nicht invasiven Charakterisierung. Neben der Eignung des Verfahrens zur Messung von Impedanzänderungen infolge des Differenzierungsprozesses muss untersucht

werden, ob ein beschreibender Parameter für diesen Prozess anhand der Impedanzspektren bestimmt werden kann und welche zellulären Änderungen zugrunde liegen.

Die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen in reife Gewebezellen ist mit spezifischen morphologischen und zellphysiologischen Veränderungen verbunden. So unterscheiden sich reife Gewebezellen durch den relativen Wassergehalt der Zellen, die spezifischen Zellorganellen, z.B. die Lipidvesikel bei Fettzellen, das Zytoskelett aber auch durch die extrazelluläre Matrix. Diese Änderungen beeinflussen die zellmechanischen Eigenschaften (Boal, 2002), welche essentiell für die zelluläre Funktionalität *in vivo* sind, wie beispielsweise die Stützfunktion des Knochens und Knorpels oder die Lagerung der Organe in Fett- und Bindegewebe. Ultraschall ist ein nicht invasives, diagnostisches Verfahren zur Diskriminierung von Organen und Gewebestrukturen aufgrund ihrer lokalen mechanischen Eigenschaften und ermöglicht bei Frequenzen von 1 GHz eine ausreichend hohe Auflösung zur Darstellung von Zellen und subzellulären Strukturen. In einem Teilgebiet dieser Arbeit soll die Hypothese untersucht werden, ob die zellmechanischen Eigenschaften spezifisch sind für Differenzierungsprozesse der Stammzellen.

Zielsetzung und Eigener Ansatz:

Das Ziel der Dissertation ist die vergleichende Charakterisierung von humanen Stammzellen aus unterschiedlichen Quellen hinsichtlich der osteogenen Differenzierung in 2D und 3D *in vitro* Kulturmodellen. Um die Untersuchung der Zelldifferenzierung in einer 3D-Kultur zu ermöglichen, soll ein geeignetes *in vitro* Modell etabliert werden. Neben konventionellen Standardtechniken zur Zellcharakterisierung soll im Rahmen dieser Arbeit die Eignung von Impedanzspektroskopie und akustischer Mikroskopie zur nicht invasiven Überwachung und Charakterisierung von Differenzierungsprozessen evaluiert werden.

Arbeitsplan:

Die zur Realisierung der Aufgabenstellung durchgeführten Untersuchungen gliedern sich in folgende vier Teile:

Teil 1: Grundlegende Charakterisierungen der Stammzellkulturen

Mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark, dem Nabelschnurblut und dem Fettgewebe werden hinsichtlich ihres osteogenen Potentials und der proliferativen Kapazität charakterisiert und mit der humanen embryonalen Stammzelllinie hES H1 verglichen. Die basale Charakterisierung der Stammzellpopulationen erfolgt in einer 2D-Zellkultur mittels konventioneller zellbiologischer und histologischer Methoden. Dabei sollen geeignete Kulturmethoden, insbesondere für die osteogene Differenzierung der hES H1-Kulturen, etabliert werden und das Potential der Stammzellpopulationen hinsichtlich einer weiterführenden Verwendung festgestellt werden.

Teil 2: Etablierung eines trägerfreien 3D *in vitro* Modells für die osteogene Differenzierung

Basierend auf den adulten mesenchymalen Stammzellkulturen und hES H1 soll ein trägerfreies Modell (Sphäroide) für die osteogene Differenzierung etabliert werden. Zu diesem Zweck werden verschiedene 3D-Kulturmethoden und adaptierte Protokolle getestet. Als grundlegende Bewertungskriterien der Kulturmethoden sind die Vitalität, die Reproduzierbarkeit, die Kontrolle der Größe aber auch die Praktikabilität hinsichtlich einer Verwendung in einem *screening* relevanten Maßstab definiert.

Teil 3: Impedanzspektroskopische Charakterisierung der osteogenen Differenzierung in einem 3D *in vitro* Modell

Ein bereits vorhandenes Impedanzmesssystem wird für die Vermessung der stammzellbasierten Sphäroide optimiert. Um die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der verschiedenen Messreihen zu evaluieren, soll der Einfluss der Medienimpedanz sowie der Sphäroidgröße und der Positionierung innerhalb der Messkapillare untersucht werden. Zur Datenauswertung der gemessenen Impedanzspektren soll ein LabVIEW-basiertes Programm erstellt werden.

Die spezifischen Änderungen der Impedanzspektren infolge osteogener Prozesse in dem trägerfreien 3D *in vitro* Modell sollen kulturbegleitend untersucht und mit den Spektren nativer (unbehandelter) Sphäroide verglichen werden. Die osteogene Differenzierung der Sphäroide soll anhand der Expression von Kollagen-1, der Kalzifizierung der extrazellulären Matrix sowie der Aktivität der Alkalischen Phosphatase beurteilt werden. Basierend auf den gemessenen Impedanzspektren und den korrelierenden histologischen Ergebnissen soll ein elektrisches Modell erstellt werden, um die spezifischen zellulären Parameter für diesen Differenzierungsprozess zu identifizieren. Zur Untersuchung der Homogenität der Sphäroide soll eine Regressionsanalyse der Spektren des Phasenwinkels angewendet werden.

Teil 4: Charakterisierung der multipotenten Differenzierung mittels akustischer Mikroskopie

Die osteogene, chondrogene und adipogene Differenzierung der BM-MSCs wird mittels akustischer Mikroskopie untersucht. Dabei soll evaluiert werden, ob diskrete Einzelzellen und spezifische zelluläre Strukturen und Zellorganellen, wie z.B. Lipidvesikel in Fettzellen oder extrazelluläre Matrixkomponenten, dargestellt werden können (*imaging*). Des Weiteren werden die mit diesen Differenzierungsprozessen korrelierenden Änderungen der zellmechanischen Eigenschaften charakterisiert. Sind diese spezifisch, wäre akustische Mikroskopie ein geeignetes Verfahren zur Charakterisierung von Differenzierungsprozessen in Stammzellkulturen.

2. Material und Methoden

2.1 Allgemeine Angaben

Das Arbeiten mit den Zellkulturen erfolgte unter aseptischen Bedingungen, um Kontaminationen durch Bakterien, Pilze und sonstige Mikroorganismen zu vermeiden. Die benutzten Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien waren vom Hersteller steril verpackt oder wurden für 15 Minuten bei 121°C autoklaviert (550 EL, Tuttnauer, Breda). Bei Arbeiten mit RNA wurden RNase-freie Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen benutzt. Eine Kultivierung der Zellen erfolgte unter Standardbedingungen bei 37°C, 5% CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95%, um Verdunstungsprozesse des Zellkulturmediums zu minimieren. In regelmäßigen Abständen wurden die Zellkulturen auf eine Kontamination durch Mykoplasmen untersucht. Die Zusammensetzung der Zellkulturmedien und der verwendeten Lösungen und Chemikalien sind im **Anhang 7.1** aufgelistet.

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Verwendete Zellen

Die Isolation der humanen BM-MSCs erfolgte aus dem Oberschenkelhalskopf humaner Spender nach erfolgter Einwilligungserklärung. Die Oberschenkelhalsköpfe wurden bei einer totalen Hüftgelenkplastik den Spendern von Dr. Maue und Dr. Hassinger am evangelischen Krankenhaus Zweibrücken operativ entfernt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. In dieser Arbeit wurden fünf verschiedene Chargen BM-MSCs getestet. Das Alter der Spender lag zwischen 59 Jahren und 83 Jahren.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten AT-MSCs und CB-MSCs wurden freundlicherweise von Dr. Bieback, Transfusionsmedizin Mannheim, zur Verfügung gestellt. Es wurden insgesamt sieben Chargen CB-MSCs untersucht, die als kryokonservierte Proben bereitgestellt wurden und drei Chargen AT-MSCs. Die AT-MSCs der Charge 1 und 2 wurde als vitale Zellkulturen und die AT-MSCs der Charge 3 als kryokonservierte Probe bereitgestellt. Die verwendete embryonale Stammzelllinie hES H1 wurden von WiCell, NSCB (*National Stem Cell Bank*, Madison, USA) bezogen. Es lag eine Genehmigung des Robert Koch Instituts in Berlin vor (Aktenzeichen 1710-79-1-4-18, §6 StZG), um die osteogene Differenzierung dieser Zellen im Rahmen des EU-Projektes Osteocord (FP6) zu untersuchen (**siehe Anhang 7.5**). Die Kultivierung der hES H1-Zellen erfolgte nach den SOPs (*standard operationg protocols*) der NSCB (www.nationalstemcellbank.org). Die in dieser Arbeit verwendeten embryonalen Fibroblasten aus der Maus (MEF) wurden nach den Protokollen von WiCell (SOP-CC-006D, *NSCB-protocols*, siehe www.wicell.org) isoliert. Nach Expansion wurde das Wachstum durch γ -Bestrahlung inhibiert.

2.2.2 Präparation der mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark

Die Isolation der BM-MSCs erfolgte nach dem Prinzip der Zelladhärenz auf Plastiksubstraten (Friedenstein, 1968, Bruder *et al.*, 1997, Sekiya *et al.*, 2003). Nach dem Herausschaben von

trabekulären Knochenstücken und Knochenmark aus dem Oberschenkelhalskopf wurden das Knochen- und Knochenmarkmaterial mit einer Schere zerkleinert und dreimal mit Alpha-MEM gewaschen. Das zellhaltige Waschmedium wurde 5 min bei 450 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 5 ml frischem MSC-Kulturmedium aufgenommen und durch ein Zellsieb mit einer Porengröße von 100 µm gegeben. Die von Knochenfragmenten befreite Zellsuspension wurde auf 20 ml Sukrose pipettiert. Durch einen Zentrifugationsschritt bei 350 g für 30 min wurden die Zellen des peripheren Blutes (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) von den mesenchymalen Stammzellen getrennt. Mononukleäre Zellen sammelten sich während der Zentrifugation in der weißen Interphase, welche entnommen und mit PBS gewaschen wurde. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 450 g für 5 min wurden die sedimentierten Zellen in 10 ml Kulturmedium resuspendiert und in einer Kulturflasche mit einer Größe von 75 cm² unter Standardbedingungen kultiviert. Nach 3 - 4 Tagen erfolgte der erste Mediumwechsel, mit welchem nicht adhärenente Zellen (z.B. hämatopoetische Zellen) entfernt wurden. Die initiale Passage der humanen mesenchymalen Stammzellen erfolgte bei einer Konfluenz von ca. 80% und die weitere Subkultivierung mit einer Zelldichte von ca. 1.000 Zellen/cm². Der Mediumwechsel erfolgte zweimal pro Woche. Die erhaltenen Zellkulturen waren ein heterogenes Gemisch aus verschiedenen somatischen Zellen und mesenchymalen Stammzellen. Bevor die Zellen in Experimenten verwendet wurden, wurden die Zellkulturen dreimal subkultiviert, um eine Selektion somatischer, nur beschränkt teilungsfähiger Zellen zu gewährleisten.

2.2.3 Passage und Kultivierung der MSCs

Die Kultivierung der adulten Stammzellen erfolgte in MSC-Kulturmedium. Die Zellkulturen wurden bei einem Konfluenzgrad von ca. 80% - 90% passagiert. Dazu wurde das alte Zellkulturmedium aspiriert und der Zellrasen mit PBS gewaschen. Zur Solubilisierung der Zellkulturen wurden diese mit Trypsin/EDTA-Lösung für 3 min bei 37°C inkubiert, wobei der Zellrasen knapp mit der Solubilisierungslösung benetzt war (T25-Flasche: 0,5 ml; T75-Flasche: 2 ml). Nach dem Abklopfen der Zellen erfolgte eine visuelle Kontrolle des Solubilisierungsprozesses unter dem Mikroskop. Bei einer unvollständigen Ablösung der Zellen wurden diese nochmals abgeklopft und für 1 min bei 37°C inkubiert. Der Trypsinierungsprozess wurde durch Zugabe eines Überschusses an Zellkulturmedium beendet und die Zellsuspension in ein 15 ml Röhrchen überführt. Die Zellen wurden 5 min bei 200 g pelletiert, der Mediumüberstand aspiriert und in 2 ml Zellkulturmedium resuspendiert. 100 µl der resultierenden Zellsuspension wurde zur Zellzahlbestimmung verwendet. Zur Fortsetzung der Langzeitkultivierung wurden die BM-MSCs und AT-MSCs mit einer Dichte von 1.000 Zellen/cm² ausgesät, während die Zellzahl zur Subkultivierung der CB-MSCs 3.000 Zellen/cm² betrug. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 3 - 4 Tage.

2.2.4 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit einem Multiziter II Colter-Zähler (Beckman Coulter, Krefeld) nach Angaben des Herstellers. Die Zellsuspension wurde 1:100 mit Isoton II verdünnt und in einen speziellen Messbecher überführt. Die Messkapillare wurde gespült und eine Nullmessung mit Isoton II durchgeführt. Danach wurde die Messkapillare in dem

Messbecher mit der Zellsuspension positioniert und die Messung gestartet. Nach Eingabe der Verdünnung wurde die Zellzahl pro ml berechnet. Nach Beendigung der Messung wurde die Kapillare gespült und in Isoton II gelagert, um ein Austrocknen zu vermeiden. Zur Bestimmung der Populationsverdopplungen (PD) wurde bei jeder Passage die Zellzahl bestimmt. Der Quotient aus der aktuellen Zellzahl und der eingesetzten Zellzahl ergab die Vervielfachung (V) der Zellen. Die Berechnung erfolgte mit der Formel:

$$PD = \frac{\log(V)}{\log(2)} \quad (\text{Gl. 26})$$

2.2.5 Kryokonservierung

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen mit einer Zellzahl von ca. 1×10^6 Zellen pro ml in 10% DMSO, 90% MSC-Kulturmedium aufgenommen. Jeweils 1 ml dieser Zellsuspension wurde pro Kryoröhrchen appliziert. Die Kryoröhrchen wurden über Nacht in einem mit Isopropanol gefüllten Gefrierträger (*Mr. Frosty*, Nalgene, Roskilde, Dänemark) bei -80°C eingefroren und anschließend in einen Stickstofftank (35VHC, Tec Lab, Königstein) zur Langzeitaufbewahrung überführt.

Zum Auftauen der MSCs wurde ein Kryoröhrchen dem Stickstofftank entnommen und im Wasserbad bei 37°C kurz angetaut. Das Kryomedium wurde mit 1 ml Kulturmedium verdünnt und die resultierende Zellsuspension in ein 15 ml Reaktionsgefäß mit 10 ml kaltem Kulturmedium getropft, um osmotische Schockreaktionen zu vermeiden. Die Zellen wurden bei 200 g pelletiert, der DMSO-haltige Überstand aspiriert und das Zellpellet in 2 ml MSC-Kulturmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in T75-Zellkulturflaschen mit ca. 10 ml vorgelegtem Zellkulturmedium überführt und kultiviert.

2.2.6 Induktion der Differenzierung in 2D-Zellkulturen

Zur Differenzierung in 2D-Zellkulturen wurden die Zellen mit einer Dichte von 10.000 Zellen/cm² ausgesät. Am Tag 2 erfolgte die Umstellung auf das jeweilige Differenzierungsmedium. Für die histologischen Untersuchungen wurden Zellkulturgefäße von Greiner und für die Immunhistologie Zellkulturträger aus Glas (*Cultureslides*, BD) verwendet. Für die Applikation im akustischen Mikroskop kamen dünnwandige Zellkulturgefäße aus Glas (Lab Tec II, Nunc) zum Einsatz. Die Zellkulturgefäße wurden vor Verwendung mit FKS über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Differenzierung erfolgte durch ein spezielles Differenzierungsmedium mit löslichen Differenzierungsfaktoren. Die Zusammensetzung des jeweiligen Differenzierungsmediums für die osteogene, chondrogene und adipogene Entwicklungslinie ist im **Anhang 7.1** aufgelistet. Da die Faktoren nicht stabil waren, wurden die Differenzierungsmedien alle 7 Tage frisch angesetzt. Der Mediumwechsel erfolgte dreimal pro Woche. Die Kontrollen wurden mit MSC-Kulturmedium kultiviert.

2.2.7 Kultivierung und Wachstumsinhibierung der MEFs

Die Kultivierung, Passage und Kryokonservierung der MEFs erfolgte analog zu den MSCs beschriebenen Protokollen (**vgl. Abschnitt 2.2.3, 2.2.4 und 2.2.5**). Abweichend wurde das MEF-Kulturmedium verwendet. Die konfluenten MEF-Kulturen wurden in T75-

Zellkulturflaschen in die Bestrahlungseinheit Faxitron (43855D Faxitron, Rohde und Schwarz, Köln) überführt. Die Bestrahlung erfolgte 15 min bei 130 kVp, Einschubhöhe 8. Dies entsprach einer Energiedosis von 60 Gray. Unmittelbar danach wurden die Zellen passagiert, die Zellzahl bestimmt und in Aliquots mit $1,2 \times 10^6$ Zellen kryokonserviert. Die resultierende Zellsuspension eines Kryoröhrchens war ausreichend für die Besiedlung einer kompletten 6-well Platte. Vor Besiedlung der Zellkulturplatten wurden diese über Nacht mit Gelatinelösung beschichtet.

2.2.8 Kultivierung der hES H1, EB-Formation und Differenzierung

Die Kultivierung der hES H1 erfolgte in 6-well Platten in Kokultur mit wachstumsinhibierten MEFs als *feeder*-Zellen (**vgl. Abschnitt 2.2.7**) unter Verwendung der im **Anhang 7.1** aufgeführten Kulturmedien für hES H1. Der Mediumwechsel der hES H1-Kulturen erfolgte täglich. Alle 2 - 3 Tage wurden die Kolonien mikroskopisch auf unspezifisch differenzierte Bereiche untersucht. Diese differenzierten Kolonien wurden markiert (Punkt auf Unterseite des Zellkulturgefäßes). Unter optischer Kontrolle unter einem Binokular wurde der Zellrasen dieses Bereiches mit einem Dentschaber mechanisch entfernt. Anschließend erfolgte ein Mediumwechsel.

Zur Passage wurde das Zellkulturmedium aspiriert und die Kolonien 15 min mit 1 ml Kollagenaselösung inkubiert. Die nicht vollständig abgelösten Kolonien wurden mit der Spitze einer serologischen 5 ml Pipette abgekratzt und abgespült. Die abgelösten Kolonien wurden in 15 ml Röhrchen überführt und durch mehrfaches Repipettieren fragmentiert. Die Zellen wurden 8 min bei 200 g pelletiert, der Überstand aspiriert und mit hES H1-Kulturmedium gewaschen. Das Zellpellet wurde in hES H1-Kulturmedium aufgenommen und im Verhältnis von 1:3 in frisch vorbereitete 6-well Platten mit *feeder*-Zellen ausgesät.

Das Einfrieren und Auftauen der hES H1 erfolgte gemäß dem Kryokonservierungsprotokoll (**vgl. Abschnitt 2.2.5**) unter Verwendung des hES H1-Kryomediums. Es wurden jeweils die Kolonien einer 6-well Kavität pro Kryoröhrchen eingefroren. Das Auftauen eines Kryoröhrchens erfolgte ebenfalls in einer 6-well Kavität.

EB-Kultur

Die hES H1-Kolonien wurden mittels Kollagenase abgelöst und geerntet (s.o.). Abweichend von dem Passageprotokoll erfolgte keine mechanische Fragmentierung der Kolonien. Die suspendierten Kolonien wurden in nicht adhäsive Zellkulturflaschen überführt (jeweils drei individuelle 6-well Kavitäten pro T25-Flasche, 9 - 12 individuelle 6-well Kavitäten pro T75-Flasche) und bei 50 rpm auf einem Orbitalschüttler (Polymax 1040, Heidolph, Kelheim) kultiviert. Alle 2 - 3 Tage erfolgte ein Mediumwechsel. Die EBs wurden mitsamt dem alten Zellkulturmedium in ein 15 ml Röhrchen überführt, anschließend 2 min bei 200 g mittels Zentrifugation sedimentiert und der Zellkulturüberstand vorsichtig aspiriert. Die EB wurden in frischem Zellkulturmedium aufgenommen und wieder in nicht adhäsive Zellkulturflaschen überführt und auf einem Orbitalschüttler kultiviert. Das Mediumvolumen zur Kultivierung der EBs betrug 5 ml pro T25-Flasche und 12 ml pro T75-Flasche.

Differenzierung der hES H1 nach erfolgtem EB-Stadium

Die EBs wurden in ein 15 ml Röhrchen überführt, anschließend 2 min bei 200 g mittels Zentrifugation sedimentiert und der Zellkulturüberstand vorsichtig aspiriert. Dann wurden die EBs mit 10 ml PBS gewaschen, wobei abermals ein Zentrifugationsschritt erfolgte. Die EBs wurden mit 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung für 30 min bei 37°C inkubiert. Alle 5 - 7 min wurden die EBs zusätzlich durch mehrfaches Repipettieren mechanisch vereinzelt. Die Trypsinierung wurde durch Zugabe von 10 ml MSC-Kulturmedium beendet. Die Zellen wurden 5 min bei 200 g pelletiert und der Überstand aspiriert. Das Zellpellet wurde in 2 ml MSC-Kulturmedium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Für Differenzierungsexperimente in 2D-Zellkulturen wurden die Zellen mit einer Dichte von 10.000 Zellen/cm² in MSC-Kulturmedium ausgesät. Nach 2 Tagen erfolgte die Umstellung auf das osteogene Differenzierungsmedium. Zur Sphäroidaggregation wurde die resultierende Zellsuspension analog des beschriebenen Standardprotokolls (**vgl. Abschnitt 2.2.9**) mit einer Zellzahl von 20.000 Zellen/96-well eingesät. Zur Differenzierung der Stammzellen in 3D-Aggregaten wurde das osteogene Differenzierungsmedium verwendet.

Direkte Differenzierung der hES H1

Die hES H1-Kolonien wurden mittels Kollagenase passagiert (s.o). Abweichend von dem Protokoll wurden die Kolonien stärker vereinzelt und in hES H1-Kulturmedium/ MSC-Kulturmedium (1:1) ausgesät. Nach Erreichen eines Konfluenzgrades von ca. 80% wurden die Zellkulturen auf das osteogene Differenzierungsmedium umgestellt.

2.2.9 Zellaggregation und osteogene Differenzierung in 3D

Die zur Zellaggregation verwendeten Techniken sind nachfolgend beschrieben. Die Induktion der osteogenen Differenzierung erfolgte in dem jeweiligen Kulturformat durch Kultivierung mit osteogenem Differenzierungsmedium. In **Abbildung 18** sind die verschiedenen Techniken zur Zellaggregation zusammengefasst.

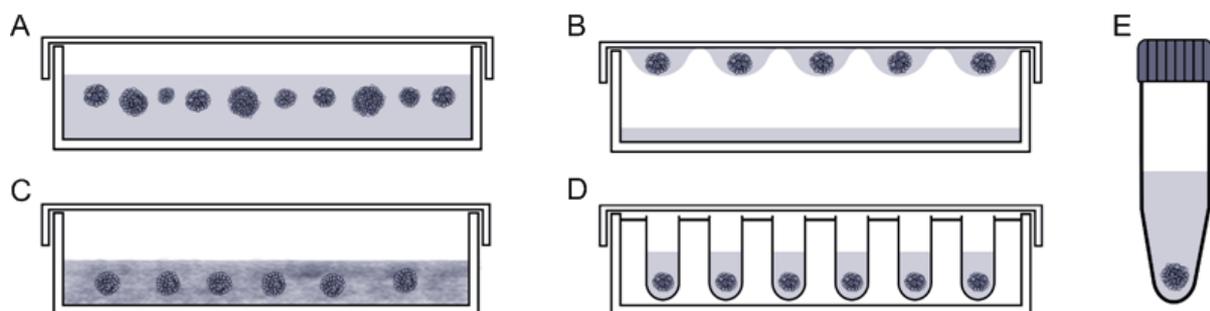


Abb. 18.: Verwendete Techniken zur Zellaggregation. A) Kultivierung einer Zellsuspension auf einer Rotationsplattform. B) Zellaggregation im hängenden Tropfen und C) nachfolgende Kultivierung der Aggregate in einer Gelkultur. Aggregation und Kultivierung in D) nicht adhäsiven 96-well Platten und E) Reaktionsgefäßen aus Polypropylen.

Rotationskultur

Zur Zellaggregation in einer Rotationskultur wurden 100.000 Zellen pro 2 ml MSC-Kulturmedium in Plastikpetrischalen (\varnothing 3 cm) ausgesät und auf einer Rotationsplattform (Rotimax 1040, Heidolph, Kelheim) bei 75 rpm kultiviert. Nach einer Aggregationsperiode von 2 Tagen wurde auf das osteogene Differenzierungsmedium umgestellt. Die Aggregate wurden durch kreisende Bewegungen in der Mitte der Petrischale zentriert und das alte Zellkulturmedium vorsichtig aspiriert. Nach Zugabe von frischem Kultur- bzw. Differenzierungsmedium wurden die Aggregate wieder auf einer Rotationsplattform unter standard Zellkulturbedingungen kultiviert.

Kultivierung im hängenden Tropfen

Zur Zellaggregation im hängenden Tropfen wurden Tropfen mit 2.500 - 5.000 Zellen pro 20 μ l in den Deckel eines Zellkulturgefäßes appliziert. Der Deckel wurde vorsichtig invertiert und auf dem Zellkulturgefäß platziert. Nach einer Aggregationsperiode von 2 Tagen wurden die Aggregate mit Zellkulturmedium abgespült und zur Langzeitkultivierung und Differenzierung in eine Rotationskultur oder in eine Gelkultur überführt.

Gelkultur

Die im hängenden Tropfen erzeugten Aggregate wurden 2 min bei 200 g sedimentiert und der Zellkulturüberstand aspiriert. Die Aggregate wurden in Zellkulturmedium (MSC-Kulturmedium oder Differenzierungsmedium) versetzt mit 1% Methylcellulose aufgenommen und in Plastikpetrischalen (\varnothing 3 cm) unter statischen Bedingungen kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte alle 2 - 3 Tage durch einen Zentrifugationsschritt des viskosen Zellkulturmediums (2 min, 200 g).

Kultivierung in Polypropylen-Reaktionsgefäßen

Individuelle Pelletkulturen wurden durch Kultivierung einer Zellsuspension in nicht adhäsiven Reaktionsgefäßen aus Polypropylen generiert. Dabei wurden 20.000 Zellen in einem finalen Volumen von 0,5 ml in 1,5 ml Reaktionsgefäßen und 200.000 Zellen in einem finalen Volumen von 2 ml in 15 ml Röhrchen 3 min bei 200 g sedimentiert und nachfolgend kultiviert. Nach 2 Tagen hatten sich kompakte, runde Aggregate gebildet und es erfolgte die Umstellung auf das osteogene Differenzierungsmedium. Der Mediumwechsel erfolgte alle 2 - 3 Tage durch Aspiration des alten Zellkulturmediums.

Kultivierung in nicht adhäsiven 96-well Platten

Vor Verwendung wurden die U-förmigen, nicht adhäsiven 96-well Zellkulturplatten 2 min mit Poly-HEMA (Poly-2-Hydroxyethylmethacrylate) beschichtet. Die Beschichtungslösung wurde entfernt und die Zellkulturplatten getrocknet. Anschließend wurden die Zellkulturplatten zweimal mit PBS gewaschen und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert. Zur Zellaggregation wurden 17.500 - 20.000 Zellen in 100 μ l Zellkulturmedium pro 96-well ausplattiert. Die Zellkulturplatten wurden 2 Tage auf einer Rotationsplattform (Rotimax 1040, Heidolph,

Kelheim) bei 75 rpm kultiviert. Danach erfolgte die Umstellung auf das osteogene Differenzierungsmedium. Zum Mediumwechsel wurden pro individueller 96-well Kavität jeweils 75 µl des alten Mediums vorsichtig aspiriert und durch frisches Zellkulturmedium ersetzt. Der Mediumwechsel erfolgte alle 2 - 3 Tage.

2.2.10 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht den quantifizierenden Nachweis immunzytochemischer Färbungen. Dabei werden die Zellen mit Antikörpern inkubiert, welche spezifisch an die zu untersuchenden Epitope binden. Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper waren direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Das Prinzip einer sog. indirekten Markierung wird im **Abschnitt 2.2.16** erläutert. Im Durchflusszytometer oder FACS-Analysator wird der gebundene Fluoreszenzfarbstoff mit einem Laser angeregt und sendet Licht einer bestimmten Wellenlänge aus. Die emittierte Fluoreszenz wird quantitativ in Bezug auf eine negative Kontrolle (Isotyp-Kontrolle) gesetzt.

Eine Vorbereitung der adulten Stammzellen erfolgte nach dem unter **Abschnitt 2.2.3** beschriebenen Passageprotokoll, die embryonalen Stammzellen wurden gemäß **Abschnitt 2.2.8** präpariert. Das jeweils resultierende Zellpellet (ca. 100.000 Zellen pro Ansatz) wurde in PBS aufgenommen, in gerätespezifische Analyseröhrchen (Becton Dickinson, Heidelberg) überführt und zweimal mit PBS gewaschen. Zum Nachweis oberflächenassoziierter Proteine wurden die Zellen mit 50 µl Antikörperlösung (1 µg Antikörper in PBS) 1 h bei 4°C inkubiert. Dann wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, um ungebundene Antikörperreste zu entfernen. Die Proben wurden in 500 µl FACS-Fix aufgenommen und bis zur Analyse im FACS-Calibur (Becton Dickinson, Heidelberg) bei 4°C gelagert. Die maximale Lagerungszeit betrug 24 h. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten 10 min bei 400 g und 4°C. Es wurden jeweils 10.000 Zellen gemessen. Zum Nachweis intrazellulärer Proteine wurde das Fixierungs- und Permeabilisierungskit von BD (Heidelberg) verwendet. Abweichend von dem beschriebenen Protokoll zur Markierung der oberflächenassozierten Proteine wurden die Zellen 20 min in 250 µl Fixierungs- und Permeabilisierungslösung inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit der Waschlösung erfolgte der Kopplungsschritt des fluoreszenzmarkierten Antikörpers an die Proteine.

2.2.11 WST-1-Test

Der WST-1-Test ermöglicht die Bestimmung der metabolischen Aktivität (Viabilität) eukaryotischer Zellen durch eine Bestimmung der Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen. Dabei katalysieren die Dehydrogenasen die Reduktion eines gelblichen Tetrazoliumsalzes 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-terazolium-bromid (WST-1) zu rotem Formazan, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 450 gegen 630 nm photometrisch bestimmt wird. Da die Aktivität der Enzyme vom physiologischen Status der Zellen abhängt, ist die Umwandlung des WST-1-Reagenz ein relatives Maß für die Viabilität (Gesamtaktivität) einer Zellkultur und kann damit indirekt als Maß für die Proliferation, aber auch für die Vitalität angesehen werden (Mosmann, 1983).

Die Sphäroide wurden in 10 µl Kulturmedium in separate Kavitäten einer 96-well Platte überführt. Pro Sphäroid wurden 100 µl WST-1-Arbeitslösung zugegeben und die Platte 24 h

unter Standardbedingungen inkubiert. Danach wurde die Extinktion photometrisch bei 405 nm im Spektrometer (SLZ *Rainbow*, Tecan, Crailsheim) bestimmt. Als Referenz wurden jeweils drei 96-well Kavitäten mit 100 µl Arbeitslösung mitgeführt.

2.2.12 FDA/Pi-Färbung

Mit einer Fluoreszeindiacetat/Propidiumjodid-Färbung (FDA/Pi-Färbung) können tote von lebenden Zellen diskriminiert werden. Die Färbung basiert auf der unterschiedlichen Membrangängigkeit der Farbstoffe. FDA ist ein membrangängiger Färbstoff der von vitalen Zellen zu dem grün fluoreszierenden Fluorescein umgesetzt wird. Der rote Farbstoff Pi ist nicht membrangängig, so dass nur tote Zellen gefärbt werden.

Die Sphäroide wurden mit PBS gewaschen und 1 min mit der FDA/Pi-Färbelösung inkubiert. Es folgten drei Waschschrte mit PBS. Die Sphäroide wurden in PBS aufgenommen und unmittelbar fluoreszenzmikroskopisch (Apotom, Zeiss, Jena) untersucht.

2.2.13 DiOC-Membranfärbung

Die Färbung der Zellmembranen vitaler Zellen erfolgte mit dem lipophilen Fluoreszenzfarbstoff 3,3-dihexyloxacarbocyanine-iodid (DiOC₆(3)). In Lösung ist dieser Farbstoff nur schwach fluoreszierend, erst nach Inkorporation in die Zellmembran entfaltet er die volle Fluoreszenzintensität. Die DiOC-Färbelösung wurde in einer Verdünnung von 1:20 dem Zellkulturmedium zugesetzt und die Fluoreszenz im akustischen Mikroskop SASAM (kibero GmbH, Saarbrücken) untersucht.

2.2.14 Präparation der Gefrierschnitte

Von den 3D-Zellaggregaten wurden Gefrierschnitte angefertigt. Zur Entfernung des Zellkulturmediums wurden die Aggregate mit PBS gewaschen und in Kryogefäße überführt. Dann wurden die Aggregate für 30 min mit 4%igem Formalin fixiert und dreimal mit PBS gewaschen. Die Aggregate wurden in *tissue tec*-Einbettmedium aufgenommen und bei -80°C gelagert. Zum Schneiden der Proben wurden diese auf einen Probenträger gefroren und mit einem Gefriermikrotom (CM3050, Leica, Wetzlar) wurden 10 µm dicke Schnitte angefertigt und auf silanisierte Objektträger appliziert. Die Gefrierschnitte wurden bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.15 Probenvorbereitung für die Histologie

Adhärenente Zellkulturen wurden zweimal mit PBS gewaschen und 15 min mit 4%igem Formalin fixiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und bis zur jeweiligen Färbung in PBS bei 4°C gelagert.

Die Gefrierschnitte wurden bei -20°C gelagert. Vor Verwendung wurden die Objektträger 2 h bei 37°C getrocknet. Zur Entfernung des Einbettmediums wurden die Objektträger zweimal mit PBS gewaschen und entsprechend der jeweiligen Färbung weiterbehandelt.

2.2.16 Immunhistologische Färbungen

Zum Nachweis spezifischer Proteine wurden fluoreszenzmarkierte Antikörper verwendet. Dabei erkennen und binden Antikörper spezifisch an das Protein, das antigene Epitop, gegen das sie gerichtet sind. In der vorliegenden Arbeit wurde eine indirekte Immunfärbung durchgeführt, d.h. der primäre Antikörper der sich gegen das nachzuweisende Protein richtet, ist unmarkiert. Der markierte sekundäre Antikörper ist gegen die Tierspezies des primären Antikörpers gerichtet, und weist somit die Bindung des primären Antikörpers nach. Auf diese Weise wird zum einen eine Signalverstärkung erzeugt, zum anderen ist der markierte sekundäre Antikörper universell einsetzbar.

Die fixierten Zellkulturen oder die aufgetauten Gefrierschnitte wurden zweimal mit PBS gewaschen und 10 min mit 0,1% Triton X in PBS permeabilisiert. Die Proben wurden zweimal mit PBS gewaschen und für 30 min mit einer *blocking*-Lösung aus 10% Ziegen Serum, 3% BSA in PBS inkubiert. Danach erfolgte eine Inkubation mit dem Primäantikörper (1:100 in *blocking*-Lösung) für 1 h. Der primäre Antikörper wurde entfernt, die Proben dreimal mit PBS gewaschen und mit dem sekundären Antikörper (1:200 in *blocking*-Lösung) für 1 h bzw. über Nacht bei 4°C unter Lichtabschluss inkubiert. Die Proben wurden dreimal mit PBS und einmal mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend mit Vektashield (enthält DAPI bzw. Pi zur Zellkernmarkierung) eingedeckelt. Bis zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung (Axiophot, Zeiss, Jena) wurden die Proben bei 4°C gelagert.

2.2.17 Alkalische Phosphatase-Färbung

Der Nachweis der Alkalischen Phosphatase, einem frühen osteogenen Marker, beruht auf der enzymatischen Hydrolyse von p-Nitrophenylphosphat zu p-Nitrophenol. Diese Reaktion ist mit einem Farbumschlag verbunden.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Alkalische Phosphatase Aktivitäts Kit von Sigma-Aldrich (Deisenhofen) verwendet. Die fixierten Zellen oder Gefrierschnitte wurden zweimal mit PBS gewaschen und 20 min im Dunkeln mit dem Nachweisreagenz inkubiert. Dann wurden die Proben zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen. Bis zur mikroskopischen Dokumentation (IX81, Olympus, Hamburg) wurden adhärenente Zellkulturen in PBS bei 4°C gelagert. Kryoschnitte wurden mit Vektashield eingedeckelt und ebenfalls bei 4°C gelagert.

2.2.18 Histochemische Färbung nach von Kossa

Die histochemische Färbemethode nach von Kossa beruht auf einer Metallsubstitution in der extrazellulären Matrix. Die für Knochen typische Extrazellulärs substanz besteht im Wesentlichen aus Hydroxylapatit, Kalziumcarbonat und weiteren anorganischen Kalzium- und Magnesiumsalzen, wobei bei der von Kossa-Färbung das Kalzium durch einwertiges Silber ersetzt wird. Es präzipitieren helle Silberphosphat- und Silbercarbonatkristalle im Gewebe, die durch Reduktion zu schwarz-braunen elementaren Silber nachgewiesen werden (Chaplin *et* Grace, 1975).

Die fixierten Zellen oder Kryoschnitte wurden vorsichtig dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen und 1 h im Dunkeln mit Silbernitratlösung (5% in Wasser) bei RT inkubiert. Die

2. Material und Methoden

Zellen wurden dreimal 5 min mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend 2 min mit der Reduktionslösung behandelt. Die Proben wurden zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen. Bis zur mikroskopischen Dokumentation (IX81, Olympus, Hamburg) wurden adhärenente Zellkulturen in PBS bei 4°C gelagert. Kryoschnitte wurden mit Vektashield eingedeckelt und ebenfalls bei 4°C gelagert.

2.2.19 Aktin-Färbung mittels Phalloidin

Phalloidine binden selektiv an F-Aktin des Zytoskeletts. Durch Kopplung mit dem rot fluoreszierenden Alexa Fluor 568 erfolgte die Visualisierung. Das Zellkulturmedium wurde aspiriert und der Zellrasen 10 min mit eiskaltem Methanol/Aceton (7:3) fixiert und die Zellmembran permeabilisiert. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und 30 min mit einer *blocking*-Lösung (10% Ziegenserum, 3% BSA in PBS) inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit Phalloidin in *blocking*-Lösung (10 µl Stock/ml) für 1 h unter Lichtabschluss. Die Proben wurden dreimal mit PBS gewaschen und in PBS bis zur mikroskopischen Dokumentation (Axiophot, Zeiss, Jena) bei 4°C gelagert.

2.2.20 Alizarinrot-Färbung

Alizarin ist ein substituiertes Anthrachinon mit drei aromatischen Ringen. Diese Substanz wird zum Anfärben der Mineralisierungszone im Knochengewebe verwendet, da es mit dem Kalzium der extrazellulären Matrix rote Chelatkomplexe ausbildet.

Die fixierten Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und 15 min mit der gebrauchsfertigen Alizarinrot-Färbelösung (Millipore, Schwalbach) bei Raumtemperatur inkubiert. Es schlossen sich mehrere Waschschrirte an, um Farbreste vollständig zu entfernen. Die adhärenenten Zellkulturen wurden bis zur mikroskopischen Dokumentation (IX81, Olympus, Hamburg) in PBS bei 4°C gelagert. Zur Bestimmung des prozentualen Bedeckungsgrades der mineralisierten Bereiche im Vergleich zur Gesamtkulturfläche wurden eine RGB-Farbanalyse (rot, grün und blau Farbanalyse) mit der Software AnalySIS Pro 5.1 (Olympus, Hamburg) durchgeführt. Dabei erfolgte die Bestimmung der rot gefärbten Bereiche anhand von Rasteraufnahmen der Zellkulturen (19x25 Mikroskopbilder, 10-fach Objektiv).

2.2.21 Osteogenese-Assay

Der Osteogenese-Assay von Millipore (Schwalbach) basiert auf der Alizarinrot-Färbung (**vgl. Abschnitt 2.2.20**). Nach mikroskopischer Dokumentation wurde der Farbstoff basisch extrahiert und die Konzentration anhand einer Kalibrationsgeraden photometrisch bei 405 nm bestimmt. Zur Extraktion des Farbstoffes wurden 500 µl Ammoniumhydroxidlösung (10%) pro 12-well verwendet. Der Zellrasen wurde 10 min mit dieser basischen Lösung inkubiert und danach mit einer Pipettenspitze abgekratzt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die Suspension 10 min bei 85°C inkubiert, kurz abgekühlt und die Zellreste 15 min bei 8.000 g sedimentiert. 100 µl des farbstoffhaltigen Überstandes wurden in 96-well ELISA-Platten überführt und im Spektrometer (SLT Rainbaow, Tacan, Crailsheim) vermessen. Die Kalibrationsgerade wurde durch Verdünnung der Alizarinrot-Färbelösung (40 mM) mit destilliertem Wasser nach Angaben des Herstellers angesetzt.

2.2.22 Oil red O-Färbung

Oil red O ist ein fettlöslicher Farbstoff der zur Färbung der Lipidvakuolen in Adipozyten verwendet wird. Die fixierten Zellen wurden zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen, für 3 min mit 60% Isopropanol permeabilisiert und im Anschluss direkt mit der Färbelösung für 10 min inkubiert. Danach folgten mehrere Waschschrte mit destilliertem Wasser. Die Zellkerne wurden 5 min mit Hematoxylin (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) gefärbt und die Probe dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen. Bis zur mikroskopischen Dokumentation (IX81, Olympus, Hamburg) wurden die Zellen in PBS bei 4°C gelagert.

2.2.23 Safranin O-Färbung

Safranin O färbt Proteoglykane, wie z.B. Chondroitinsulfat und Keratinsulfat, in der extrazellulären Matrix von Chondroblasten. Die fixierten Zellproben wurden mit 92%igen Ethanol gespült und danach 30 min mit der Safranin O-Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Proben viermal mit 92%igem Ethanol gewaschen. Bis zur mikroskopischen Dokumentation (IX81, Olympus, Hamburg) wurden die Proben in PBS bei 4°C gelagert.

2.2.24 Alcianblau-Färbung

Mittels Alcianblau-Färbung werden Sulfat- und Carboxylgruppen in sauren Mukosubstanzen (Glykosaminoglykane) in der chondroblastenspezifischen Matrix nachgewiesen. Diese Gruppen sind negativ geladen, so dass sie den basischen Phtalozyaninfarbstoff binden. Da der Farbstoff kupferhaltig ist, erscheint die Färbung blau.

Die fixierten Zellen wurden zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen und 5 min mit 3%iger Essigsäure inkubiert. Diese wurde entfernt und der Zellrasen mit der Alcianblau-Färbelösung für 30 min gefärbt. Anschließend wurde mehrmals mit 70%igem Ethanol gewaschen und die Zellkerne 5 min mit *Nuclear Fast Red* (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) gefärbt. Die Probe wurde dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen und bis zur mikroskopischen Dokumentation (IX81, Olympus, Hamburg) in PBS bei 4°C gelagert.

2.2.25 *real time* PCR

Präparation der Gesamt-RNA

Die Präparation der Gesamt-RNA erfolgte mit Trizol (Invitrogen, Karlsruhe) und anschließender Aufreinigung mit dem RNeasy mini Kit (Qiagen, Hilden). Trizol enthält Phenol und Guanidinisothiocyanat und führt zu einer Lyse der Zellmembran, sowie zum Abbau von Zellkompartimenten und Dissoziation von Nukleoproteinkomplexen. Des Weiteren werden RNasen inhibiert und somit die RNA stabilisiert. Der RNeasy mini Kit basiert auf Säulen mit einer integrierten Siliciagel-Membran. Diese Membran hat eine spezifische RNA-Bindekapazität von max. 100 µg RNA.

Die Sphäroide (min. 24 Stück) wurden mit PBS gewaschen und nach Zugabe von 1 ml Trizol lysiert, indem die Suspension mehrfach durch eine Spritzenadel (22 gauge) aufgezogen wurde. Das resultierende Zellhomogenat wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Nach dem Auftauen wurde das Zellhomogenat resuspendiert, zur Entfernung von

2. Material und Methoden

Zelltrümmern 10 min bei 12.000 g und 4°C zentrifugiert und der Überstand in unbenutzte Reaktionsgefäße überführt. Je eingesetztem Milliliter Trizol wurden 200 µl Chloroform zugegeben, gründlich gemischt und die Lösung 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Mittels Zentrifugation (15 min, 12.000 g, 4°C) wurden die Phasen separiert. Die RNA war in der oberen wässrigen Phase, während die denaturierten Proteine und DNA in der Interphase zwischen Phenol und wässriger Phase ausfielen. Dabei wirkte Chloroform ebenso wie Phenol denaturierend auf die Proteine, hatte aber zusätzlich einen stabilisierenden Effekt auf die Phasengrenze. Die obere Phase wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die RNA mit 500 µl Isopropanol gefällt (15 min Inkubation bei Raumtemperatur). Die weitere Isolation erfolgte mit dem RNeasy mini Kit. Um genomische DNA zu entfernen, wurde die gefällte RNA auf eine spezielle gDNA-Säule gegeben und 1 min bei 8.000 g zentrifugiert. Anschließend wurde der Durchlauf auf eine RNeasy-Säule appliziert und 1 min bei 8.000 g zentrifugiert. Die gebundene RNA wurde in einem ersten Waschschrift mit 700 µl RW1-Waschpuffer und in einem zweiten und dritten Waschschrift mit je 500 µl RPE-Waschpuffer gewaschen. Nach Zugabe der Waschlösungen wurde die Säule jeweils bei 8.000 g zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Die Säule wurde anschließend in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und zum Evaporieren des Ethanol 1 min bei 8.000 g zentrifugiert. Zur Elution der RNA wurde die Säule erneut in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 30 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Silicagel-Membran appliziert und die Säule anschließend 1 min bei 8.000 g zentrifugiert. Die isolierte RNA wurde bei -70 C gelagert.

Konzentrationsbestimmung der Ribonukleinsäurelösung

Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte photometrisch (Bio, Eppendorf, Hamburg). Dazu wurde die Probe 1:50 mit TE-Puffer (10 mM) verdünnt und die Extinktion bei $\lambda=260$ nm für Nukleinsäuren und bei $\lambda = 280$ nm für Proteine gemessen. Der Quotient der beiden Messwerte (OD260/OD280) gibt die Reinheit der Lösung wieder. Eine reine RNA-Lösung hat einen Wert von 1,8 - 2,1.

Reverse Transkription

Das Umschreiben der mRNA in cDNA erfolgte mit dem Quanti Tec RT Kit (Qiagen, Hilden). Alle Pipettierschritte erfolgten auf Eis und es wurden eisgekühlte Lösungen verwendet. Pro Reaktionsansatz wurden 0,5 µg RNA eingesetzt. Es wurde 1 µl gDNA-*wipeout*-Puffer zugegeben und das Reaktionsvolumen mit Wasser auf 14 µl aufgefüllt. Zur Entfernung genomischer DNA wurden die Reaktionsansätze 5 min bei 42°C inkubiert. Dann wurden pro Reaktionsansatz 1 µl reverse Transkriptase (RT), 1 µl dNTP mix und 4 µl RT-*buffer* zugeben und jeder Ansatz homogen durchmischt. Anschließend wurde die cDNA für 5 min bei 95°C denaturiert und die reverse Transkription bei 42°C für 30 min (Temperaturoptimum der reversen Transkriptase) durchgeführt. Die cDNA wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert. In den Negativkontrollen wurde die RT durch Wasser ersetzt.

Amplifizierende *real time* PCR

Der amplifizierenden Polymerasekettenreaktion wurde der Zyaninfarbstoff SYBR-Green zugesetzt. Dieser Farbstoff bindet an die replizierte doppelsträngige DNA und bildet einen

fluoreszierenden Komplex, dessen Adsorption/Emission bei 494/521 nm nachgewiesen werden kann. Somit kann bei der *real time* PCR die amplifizierte DNA bei jedem Zyklus quantifiziert werden. Dabei gilt die Annahme, dass sich mit jedem Zyklus die DNA verdoppelt.

Die Durchführung der *real time* PCR erfolgte mit dem SYBR fast PCR Kit (Biorad, München) nach Angaben des Herstellers. Die Pipettierschritte erfolgten auf Eis und mit eisgekühlten Lösungen. Von jedem cDNA-Ansatz wurde ein *master mix* hergestellt, indem 12,5 µl der SYBR fast PCR-Lösung, 8 µl Wasser und 2,5 µl cDNA-*template* je PCR-Ansatz gemischt wurden. Jeweils 25 µl dieses Mastermixes wurden in individuelle Kavitäten einer 96-well PCR-Platte (Biorad, München) appliziert und 2,5 µl der entsprechenden Primerlösung (10x Primer-Assay, Qiagen, Hilden) zugegeben. Die Untersuchung jedes Primers erfolgte in Triplikaten. Die eingestellten Parameter der PCR sind in **Tabelle 1** dargestellt. Es wurden 40 Zyklen durchgeführt.

Tab. 1: *Real time* PCR.

Schritt	Zeit	Temperatur
1. Initiale Denaturierung	5 min	95°C
2. Denaturierung	30 sec	95°C
3. Annealing und Extension	30 sec	62°C
4. Finale Extension	5 min	72°C

Zur Überprüfung auf unspezifische Amplifikate wurde im Anschluss eine Schmelzkurve in 0,5°C Schritten durchgeführt. Die Auswertung der *real time* Daten erfolgte mit der $\Delta\Delta CT$ Methode (Chang *et al.*, 2008) und die Normierung der Daten erfolgte anhand der Expression von β -Tubulin. Das Prinzip wird im Folgenden erläutert. Von jeder Probe wird für jeden Primer der CT-Wert (*cycle threshold*), ein Parameter für die Fluoreszenzintensität der Probe, ermittelt. Der CT-Wert definiert die Anzahl der Amplifikationszyklen, bei der die Fluoreszenzintensität der amplifizierten DNA einen gerätespezifischen oder benutzerdefinierten Schwellenwert erreicht. Um die Genexpression zu quantifizieren, wird der CT-Wert des zu untersuchenden Gens (CT_{Zielgen}) gegen den CT-Wert eines anderen Gens ($CT_{\text{Normalisierungsgen}}$) normalisiert (**Gl. 27**). Dabei muss dieses Normalisierungsgen (*housekeeper*) in allen Zellen aktiv sein. Steigt die Fluoreszenzintensität der Probe früher an als die Fluoreszenzintensität des Normalisierungsgens, wird dieses Gen vergleichsweise stark exprimiert. Um die Expression eines Gens in zwei unterschiedlichen Proben zu vergleichen, z.B. in den differenzierten Sphäroiden ($\Delta CT_{\text{Differenzierung}}$) und in den nativen Sphäroiden ($\Delta CT_{\text{Kontrolle}}$), werden die normalisierten ΔCT -Werte subtrahiert (**Gl. 28**). Da die amplifizierende PCR-Reaktion jeweils eine Verdoppelung der DNA pro Zyklus provoziert, wird die n-Fache Induktion durch eine exponentielle Funktion zur Basis 2 ermittelt (**Gl. 29**).

$$\Delta CT = CT_{\text{Zielgen}} - CT_{\text{Normalisierungsgen}} \quad (\text{Gl. 27})$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{Differenzierung}} - \Delta CT_{\text{Kontrolle}} \quad (\text{Gl. 28})$$

$$2^{\Delta\Delta CT} = \text{n-Fache Induktion} \quad (\text{Gl. 29})$$

2.3 Impedanzspektroskopie

Experimenteller Messaufbau:

Die impedanzspektroskopische Charakterisierung der Sphäroide erfolgte in einem mikropipettenbasierten Messaufbau. Das prinzipielle Konstruktionsprinzip der Messkapillare wurde im Rahmen der Dissertation von H. Thielecke (2002) entwickelt und beschreibt eine Messkapillare mit vier Elektroden. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgten eine Anpassung der Dimension der Messkapillare, die Integration in einen Kapillaradapter und der experimentelle Aufbau der Peripheriegeräte. Diese Änderungen der Messkapillare und der experimentelle Versuchsaufbau werden im Folgenden beschrieben (**Abb. 19**). Die ableitende Messkapillare aus Borosilikat hatte einen Durchmesser von 300 μm und eine Länge von 15 mm. An den ausführenden Enden war die Kapillare konisch erweitert, um die Applikation der Sphäroide zu erleichtern. In die Kapillarwand waren gemäß der zugrunde liegenden Konstruktion vier Elektroden aus Platin integriert. Je nach Verschaltung der Elektroden ergab sich die Möglichkeit einer 4-Elektrodenmessung oder einer 2-Elektrodenmessung. Die Messungen erfolgten in einer 2-Elektrodenkonfiguration, da diese zur Erfassung hochfrequenter Impedanzen geeigneter ist (Thielecke, 2002). Die Messkapillare war über einen Plexiglasadapter in ein Messinggehäuse integriert und direkt mit dem Impedanz Analysator (4294A, Agilent, Böblingen) verbunden, um parasitäre Kapazitäten zu reduzieren.

Zur Vermessung der Sphäroide mussten diese in der Kapillarmitte positioniert werden. Zur Realisierung der vertikalen Positionierung wurde ein hydrostatischer Druck appliziert. Dazu wurde die Unterseite der Messkapillare über einen elektronisch umschaltbaren 2-Wege-Hahn mit einer Öl-gefüllten Präzisionskolbenpumpe (CellTram Oil, Eppendorf, Hamburg) und einer mit Messmedium befüllten Kolbenpumpe (CellTram vario, Eppendorf) über Perfusorschläuche (Original-Perfusor, Braun, Melsungen) verbunden. Je nach Bedarf konnte die Kapillare mit frischem MSC-Kulturmedium (Messmedium) gefüllt und die Sphäroide mittels eines starken Volumenstroms (Kolbenpumpe) oder eines präzise zu regulierenden Vakuums (Präzisionskolbenpumpe) vertikal positioniert werden.

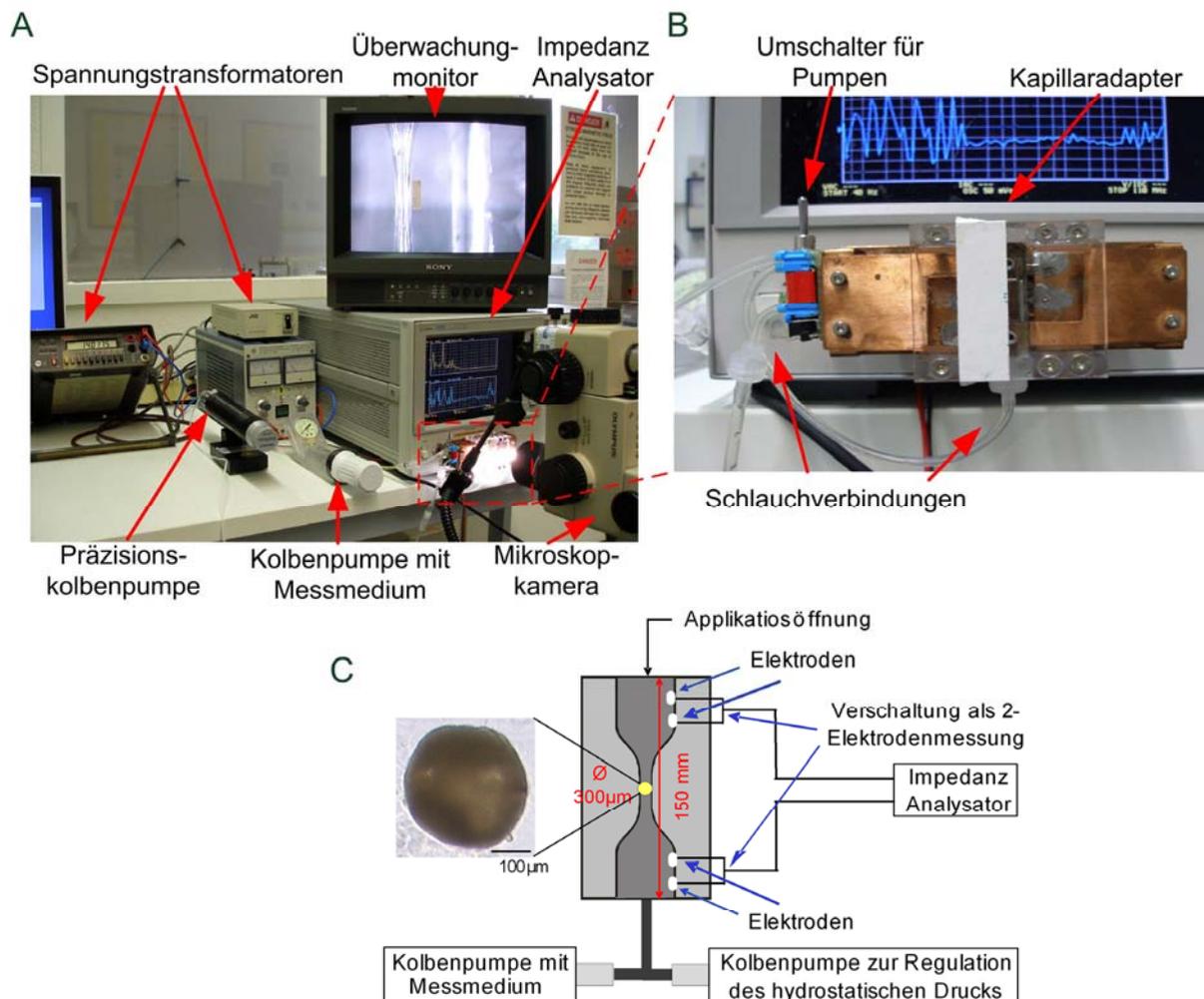


Abb. 19: Impedanzmessaufbau. A) Fotografische Übersichtsaufnahme mit den Peripheriegeräten und B) der Kapillaradapter. C) Schematische Darstellung der Messkapillare.

Experimentelle Versuchsdurchführung der Impedanzmessung:

Die Impedanzmessungen vitaler Sphäroide erfolgten bei einer konstanten Spannung von 50 mV in einem Frequenzbereich von 100 Hz - 10^7 Hz. Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur unter atmosphärischer Sauerstoffexposition. Da die osteogene Induktion der Sphäroide mittels der löslichen Faktoren L-Ascorbinsäure und β -Glycerolphosphat erfolgte, waren keine vergleichbaren Bedingungen hinsichtlich der Ionenkonzentration und des pH-Wertes zwischen dem MSC-Kulturmedium der Kontrollen und dem osteogenen Kulturmediums gegeben. Als Konsequenz erfolgten alle Messungen in dem MSC-Kulturmedium unter vergleichbaren Ausgangsbedingungen hinsichtlich der Medientemperatur und Dauer der Sauerstoffexposition vor Versuchsbeginn.

Vor jeder Messung wurde die Impedanz des MSC-Kulturmediums (Messmedium) bestimmt. Sofern Abweichungen von 3% detektiert wurden, erfolgte eine Befüllung der Kapillare mit frischem Messmedium. Aufgrund von Reaktionen mit dem Luftsauerstoff (z.B. Änderung des pH-Wertes) oder dem Einbringen von Luftblasen bei der Applikation der Sphäroide war die Erneuerung des Messmediums alle 3 - 4 Messungen angezeigt.

2. Material und Methoden

Vor Messbeginn wurden alle Sphäroide mikroskopisch begutachtet, dokumentiert und die Größe bestimmt. Sphäroide mit unspezifischen Einschlüssen (z.B. Fasern aus den gestopften Zellkulturpipetten) wurden von der Messung ausgeschlossen. Die Applikation der individuellen Sphäroide erfolgte durch Pipettieren in einem Volumen von max. 20 μl des zur Kultivierung verwendeten Kulturmediums. Danach wurden die Sphäroide unter optischer Kontrolle mit einer Mikroskopkamera (SZ-STU2, Olympus, Hamburg) durch die Applikation eines hydrostatischen Druckes vertikal in der Kapillare positioniert. Dabei war zu beachten, dass die Sphäroide abschließenden mechanischen Kontakt mit der Messkapillare hatten. Die Messungen erfolgten im sog. Positionierungsbereich der Kapillare (**vgl. Abb. 20, gelbe Markierung**). Dieser war an den ausführenden Enden konisch erweitert, um eine Messung unterschiedlich großer Sphäroide zu ermöglichen und hatte einen minimalen Durchmesser von 300 μm in der Kapillarmitte (**vgl. Abb. 20B**). Um eine identische Positionierung bei der Vermessung von mehreren Sphäroiden eines Kulturzeitpunktes zu gewährleisten, konnte die jeweilige Messposition auf der gelben Markierung festgehalten werden. Eine vergleichbare Positionierung der Sphäroide an unterschiedlichen Kulturzeitpunkten war nicht möglich, da die Sphäroide im Kulturverlauf kleiner wurden. Zudem wurden die osteogenen Sphäroide mit zunehmendem Differenzierungsgrad steifer und waren somit nicht mehr in der Kapillare komprimierbar. Die Sphäroide wurden möglichst nah an der Kapillarmitte positioniert, wobei die osteogenen und nativen Sphäroide eines Kulturzeitpunktes an einer identischen Position gemessen wurden.

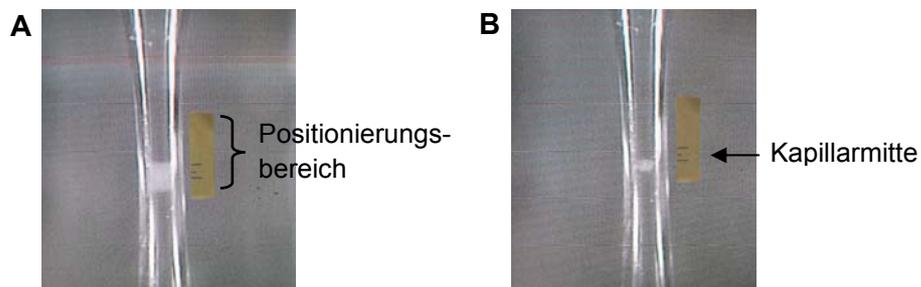


Abb. 20: Positionierung der Sphäroide in der Messkapillare. Dargestellt ist eine fotografische Abbildung des Überwachungsmonitors der Mikroskopkamera. A) Exemplarische Darstellung eines Sphäroides mit einem Durchmesser von 457 μm . Es bestand mechanischen Kontakt mit der Kapillarwand und der Sphäroid war stark komprimiert. B) Darstellung der Positionierung eines Sphäroides mit einem Durchmesser von 330 μm in der Kapillarmitte.

2.3.1 Erstellung eines Programms zur Auswertung der Impedanzspektren

Die Messung der Impedanzspektren individueller Sphäroide erfolgte mit einer Steuerungssoftware, die im Rahmen der Dissertation von Impidjati (Impidjati, 2006) erstellt wurde. Um die gemessenen Rohdaten im Bode-Diagramm und im Argand-Diagramm darzustellen und auszuwerten, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Software in der Programmiersprache LabVIEW, einer graphischen Programmierumgebung der Firma National Instruments (LabVIEW, 2004), erstellt. Mit dieser Software wurden die Rohdaten verschiedener Sphäroide mit gleichen Randbedingungen, also eines Experiments, zu einer Gruppe zusammengefasst und konnten bezüglich ihrer Mittelwerte und Abweichungen untersucht und mit anderen Experimenten verglichen werden.

Die Impedanzspektren der individuellen Sphäroide wurden in separaten Textdateien abgespeichert. Für jede gemessene Frequenz war ein Wert für den Betrag der Impedanz und die Phase der Impedanz in dieser Datei hinterlegt. In einem Auswahldialog war es möglich unterschiedliche Messungen auszuwählen. Diese ausgewählten Dateien wurden geladen und in einer Datenstruktur im Programmspeicher abgelegt. Zusätzlich wurden die eingelesenen Daten noch aus der Polardarstellung $z = re^{i\varphi}$ mit dem Betrag r und der Phase φ in die algebraische Darstellung $z = x + iy$ mit dem Realteil x und Imaginärteil y konvertiert.

$$x = Z' = r \cos \varphi \quad (\text{Gl. 30})$$

$$y = Z'' = r \sin \varphi \quad (\text{Gl. 31})$$

Innerhalb einer Gruppe von Impedanzspektren $Z_n(f)$, mit der Anzahl von N Spektren innerhalb der Gruppe, berechnete das Programm für jede Frequenz den komplexen Mittelwert $\mu(f)$ und komplexe Standardabweichung $\sigma(f)$ wie folgt:

$$\mu(f) = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N Z_n(f) = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N Z'_n(f) + i \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N Z''_n(f) \quad (\text{Gl. 32})$$

$$\sigma(f) = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{n=1}^N (Z'_n(f) - \mu'(f))^2} + i \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{n=1}^N (Z''_n(f) - \mu''(f))^2} \quad (\text{Gl. 33})$$

Die Daten wurden von dem Programm als Bode- oder Argand-Diagramm dargestellt. Um aus den Daten Graphen für die Darstellung und weiterführende Auswertung der Impedanzverläufe zu erstellen, wurde eine Schnittstelle mit dem freien Visualisierungsprogramm *gnuplot* (www.gnuplot.com) implementiert. Des Weiteren konnten die Graphen auch im ASCII-Format exportiert und in andere Analyseprogramme importiert werden, um beispielsweise die Modellbildung mit *ZView2* (*Scribner Associates, Inc*) zu ermöglichen. Die Dokumentation der einzelnen Programmfunktionen ist dem **Anhang 7.2** zu entnehmen.

2.3.2 Elektrische Modellbildung

Um die spezifischen Gewebeparameter der Sphäroide zu bestimmen, wurde ein elektrisches Modell erstellt. Dieses elektrische Ersatzschaltbild sollte den Verlauf der experimentellen Impedanzspektren der stammzellbasierten Sphäroide durch wenige konstante und frequenzunabhängige Parameter motivieren, um die Variabilität (Fehler) der einzelnen Parameter minimal zu halten. Die Modellierung erfolgte mit der Software ZView2 (*Scribner Associates, Inc.*) basierend auf den Levenberg Marquardt Algorithmus. Untersucht wurde der Frequenzbereich von 1 kHz - 10 MHz. Dieser Frequenzbereich umfasste die auszuwertende Dispersionsregion.

Die untersuchten Ersatzschaltbilder basierten auf den in **Abschnitt 1.5.3** beschriebenen Gewebemodellen (Grimnes *et Matinsen*, 2008), die als Gewebeparameter den Widerstand des extrazellulären Raums (R_{extra}) sowie des intrazellulären Raums (R_{intra}) und die Kapazität der Zellmembran beschreiben. Die Kapazität der Zellmembran wurde gemäß des Cole-Modells (Cole *et Cole* 1941, Grimnes *et Marinsen*, 2005, 2008) durch ein CPE-Element (CPE_{mem}) dargestellt, um die fraktale Geometrie der multizellulären Sphäroide zu berücksichtigen. Da nicht alle MSCs zu Osteoblasten differenzierten, wurde diese Heterogenität innerhalb der Sphäroide durch ein Modell mit zwei Bereichen dargestellt.

Die theoretische Betrachtung der zellulären Ereignisse der osteogenen Differenzierung bezogen auf diese Gewebeparameter führt zu folgender Einteilung: Die osteogene Differenzierung wird durch die Expression extrazellulärer Matrix und der Mineralisierung charakterisiert (Heng *et al.*, 2004). Dieses Ereignis betrifft den extrazellulären Raum und sollte demnach in einer Änderung des extrazellulären Widerstandes resultieren. Des Weiteren wird die Expression der intrazellulären Alkalischen Phosphatase (Jørgensen *et al.*, 2004) sowie die Regulation von Signaltransduktionswegen (Panetta, 2009) und ein verminderter Fettmetabolismus (Foster *et al.*, 2005) beschrieben. Diese Ereignisse betreffen den intrazellulären Raum und somit potentiell den intrazellulären Widerstand. Die ALP ist ebenso wie die extrazelluläre Matrix mit der Zellmembran verankert und es werden zahlreiche weitere membranassoziierte und integrale Membranproteine bei der osteogenen Differenzierung reguliert (Foster *et al.*, 2005). Ein weiteres Ereignis, welches mit der Zellmembran in Verbindung steht, ist die vesikelvermittelte Sekretion von Kalzium- und Phosphatverbindungen für den Mineralisierungsprozess (Anderson *et al.*, 1995, 2003). Diese Prozesse könnten potentiell zu einer Änderung der Membrankapazität führen.

Des Weiteren wurden bei der Modellbildung folgende Elemente des Messaufbaus berücksichtigt: der Widerstand des mit MSC-Kulturmedium befüllten Messsystems (R_1) und parasitäre Streukapazitäten des Messaufbaus (C_{streu}), z.B. verursacht durch Kabelverbindungen. Die Kapazität der Messelektroden wurde ebenfalls durch ein CPE-Element ($CPE_{\text{elektrode}}$) modelliert, da diese Kapazität nicht nur von den Elektroden selbst, die im Idealfall einen Kondensator darstellen, sondern ebenfalls von Phasengrenzimpedanzen mit dem organischen MSC-Kulturmedium beeinflusst wurde.

Die untersuchten Ersatzschaltbilder sind in **Abbildung 21** dargestellt. Der Einfluss des Messsystems wurde anhand des Impedanzspektrums des Messmediums berechnet. Danach wurden die Geräteparameter als feststehend betrachtet und es erfolgte die Untersuchung der Gewebeparameter anhand der Impedanzspektren der Sphäroide.

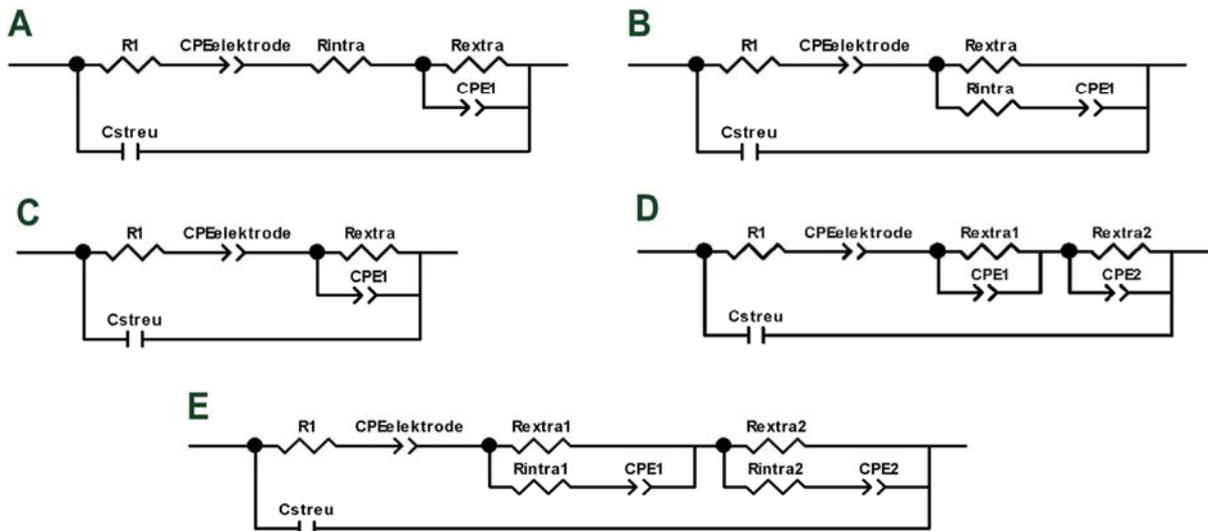


Abb. 21: Elektrische Ersatzschaltbilder zur Modellierung der gemessenen Impedanzspektren mittels ZView2. In A), B), und C) wurden die Gewebestrukturparameter extrazellulärer Widerstand (R_{extra}), intrazellulärer Widerstand (R_{intra}) und Membrankapazität (CPE_{mem}) in unterschiedlicher Verschaltung untersucht. D und E) Heterogene Gewebemodelle mit zwei Bereichen innerhalb des Sphäroids. Die Bereiche wurden jeweils mit einem intrazellulären Widerstand (R_{intra1}/R_{intra2}), einem extrazellulären Widerstand (R_{extra1}/R_{extra2}) und einer Membrankapazität (CPE_1/CPE_2) in unterschiedlicher Verschaltung modelliert.

2.3.3 Regressionsanalyse des Phasengangs

Die Impedanzspektren der osteogen differenzierten Sphäroide demonstrierten im Phasengang eine charakteristische Dispersion. Um dieses Dispersionsverhalten zu untersuchen, wurde eine Regressionsanalyse (Excel, Microsoft) zur Beschreibung des Kurvenverlaufs durchgeführt. Das Dispersionsgebiet der MSC-basierten Sphäroide wurde anhand der Impedanzverläufe des Phasengangs bestimmt. Im Frequenzbereich von 20 kHz bis 500 kHz wurde in den nativen Sphäroiden ein Abfall des Phasengangs beobachtet, der in der halblogarithmischen Darstellung eine Gerade beschrieb. Die osteogen differenzierten Sphäroide demonstrierten in diesem Frequenzbereich einen gekrümmten Verlauf. Der Kurvenverlauf des Phasengangs ließ sich durch eine logarithmische Regression zur Basis e beschreiben:

$$Y = a \ln(x) + b \tag{Gl. 34}$$

Die Abweichung von dem Kurvenverlauf der Regressionsanalyse, das Bestimmtheitsmaß R^2 (statistischer Fehler einer abhängigen Variablen), beschreibt das Dispersionsverhalten der Sphäroide. Ein Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 1$ definiert eine ideale Konvergenz der experimentellen Daten mit der Kurvenfunktion der Regressionsanalyse.

2.4 Akustische Mikroskopie

Experimenteller Messaufbau

Die Ultraschallanalyse 2D-Zellkulturen erfolgte mit einem akustischen Mikroskop des Typs SASAM (*Saarland Scanning Acoustic Microscope*) (**Abb. 22**). Dieses wurde am Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik auf der Basis eines inversen optischen Mikroskops (IX 81, Olympus, Hamburg) entwickelt (Weiss, 2007).

Zur Messung der Stammzellkulturen wurde eine akustische Linse mit einer Mittenfrequenz von 1 GHz in das System integriert. Die akustische Linse bestand aus einer piezoelektrischen Dünnschicht, aufgedampft auf einem Saphirzylinder, und einer eingeschliffenen Halbkugel an der gegenüberliegenden Seite des Saphirzylinders. Die piezoelektrische Schicht wurde mit einem Puls (1 ns) angeregt und erzeugte in dem Saphir eine akustische Welle, die sich in dem Saphir ausbreitete und anschließend von der Halbkugel auf die Probe fokussiert wurde. Der Fokussfleck erreichte eine minimale Ausdehnung von etwa 1 μm , was der Auflösung des Systems entsprach. Der von der Probe reflektierte Schall wurde auf die piezoelektrische Schicht geleitet und von dieser in ein elektrisches Signal gewandelt. Dieses Signal wurde verstärkt und von einem Transientenrekorder mit 8 GHz abgetastet. Da bei diesem Verfahren jeweils nur ein Punkt der Probe erfasst wurde, musste die akustische Linse mechanisch über die Probe bewegt werden, um ein komplettes Bild aufzunehmen. Dieses erfolgte mit einem Piezoscanner (PXY D12, PiezoJena, Jena). Die Linse wurde Zeile für Zeile über die Probe bewegt und an jeder Bildposition der Verlauf der Echosignale aufgezeichnet. Zur Fokussierung der Linse in z-Richtung diente eine motorisierte Lineareinheit (PiezoWalk, Physik Instrumente, Karlsruhe). Die maximale Bildgröße betrug 100 μm x 100 μm .

Das System verfügte über eine rotierbare Säule, die durch Drehung um 180° den Wechsel der optischen und akustischen Komponenten ermöglichte. Dadurch bestand die Möglichkeit die Zellkulturen vor der Messung im Phasenkontrast zu dokumentieren und parallel zu den akustischen Aufnahmen mittels Fluoreszenzmikroskopie darzustellen. Die jeweiligen optischen und akustischen Aufnahmen hatten einen Versatz von ca. 5 μm - 10 μm . Gelagert wurde das Mikroskop auf einem schwingungsgedämpften Tisch (IsoStation, Newport Spectra Physics, Darmstadt). Um Messungen an vitalen Zellkulturen zu realisieren, war das Mikroskop in eine Klimakammer (solent Scientific, Segensworth, UK) integriert, die auf 37°C temperiert wurde. Um die automatische Ansteuerung unterschiedlicher Positionen in den Zellkulturen zu ermöglichen, verfügte das System zusätzlich über einen motorisierten Mikroskoptisch (Merzhäuser, Wetzlar).

Die Zellkulturen für die Ultraschallmessungen wurden in Glaskulturgefäßen (Lab Tec II, Nunc GmbH, Langenselbold) kultiviert. Nach DiOC-Membranfärbung (**vgl. Abschnitt 2.2.13**) wurde eine Zellkultur auf dem Mikroskoptisch platziert und eine optische Übersichtsaufnahme aufgenommen. Anhand dieser Übersichtsbilder wurden repräsentative Bereiche ausgewählt. Von diesen Bereichen wurden Fluoreszenzaufnahmen der DiOC-Färbung aufgenommen. Die xy-Koordinaten dieser Positionen wurden in der Steuerungssoftware *Acoustic Investigator* (kibero GmbH, Saarbrücken) abgespeichert, so dass sie bei der nachfolgenden akustischen Messung automatisch angesteuert wurden. Für die akustischen Messungen wurde die akustische Linse eingeschwenkt und in der z-Ebene fokussiert. Dazu wurde der Arbeitsabstand der Linse zu dem Zelllayer so variiert, dass das

2.4 Akustische Mikroskopie

resultierende Substratecho maximal war. Dabei tauchte die Linse in das Zellkulturmedium ein, ohne direkten Kontakt zur Probe zu haben (ca. 60 μm Arbeitsabstand).

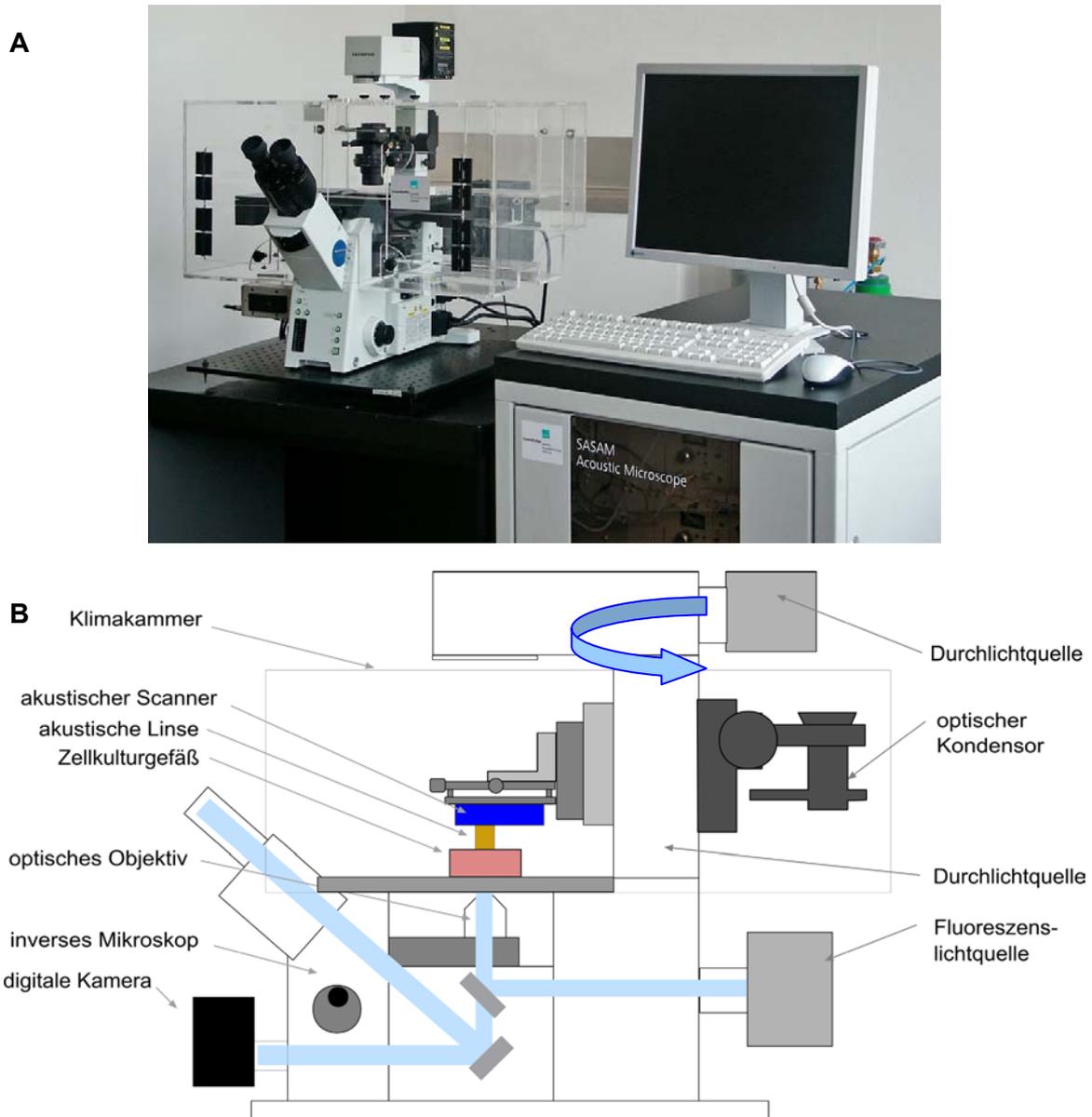


Abb. 22: Akustisches Mikroskop SASAM. A) Fotografische Abbildung des Systems und B) schematische Darstellung der Konstruktion.

Datenverarbeitung

Die Auswertung der akustischen Daten erfolgte mit dem Softwarepaket *Acoustic Researcher* der Firma (kibero GmbH, Saarbrücken). Die lokalen Reflexionen der Echos wurden als optische Bilder dargestellt. Diese Darstellungsweise des akustischen Signals als horizontale Schnittbilder wird als C-Projektion bezeichnet, während die gemessenen lokalen Echoamplituden als A-Projektion (Amplituden-Projektion) und eine Darstellung des akustischen Signals als vertikale Schnittbilder als B-Projektion bezeichnet wird. Zur Bestimmung der mechanischen Zelleigenschaften wurden die Signalamplituden des Substratecho und Frontecho der jeweiligen Differenzierungsrichtungen quantitativ ausgewertet.

Bei der Auswertung der Daten mussten drei Zustände der Zellkulturen unterschieden werden. Direkt nach der Aussaat lagen die Zellen vereinzelt vor (**Abb. 23A**). In diesem Zustand kann ein einfaches Verfahren zur Bestimmung der akustischen Eigenschaften herangezogen werden (Briggs *et al.*, 1993, Weiss, 2007). Durch den Vergleich einer Messung der Zelle und des Glassubstrates ohne Zelle lassen sich die lokale Dicke der Zellen, die Schallgeschwindigkeit, die Dichte, das Kompressionsmodul und die Schalldämpfung lokal mit einer Auflösung von 1 μm bestimmen. Da zu diesem Zeitpunkt die Zellen aber noch nicht differenziert waren, war dieses Stadium in dieser Arbeit nicht von Interesse.

Während der Kultivierung und Differenzierung bildeten die Zellen einen konfluenten Zelllayer aus (**Abb. 23B**). In konfluenten Zellkulturen konnte das oben beschriebene Verfahren nicht mehr angewendet werden, da kein Referenzecho vom Glassubstrat ohne Zelle aufgenommen werden konnte. Um diese Daten quantitativ auszuwerten, wurden die absoluten Signalamplituden der Echos (**Abb. 23D**) bestimmt. Prinzipiell wurden zwei Signale detektiert, das Frontecho an der Oberseite des Zelllayers und das Echo des Übergangs von den Zellen zum Glassubstrat (Substratecho). Da hier nur eine geringfügige Reflexion innerhalb den Zellen (unterhalb 3%) detektiert wurde, ließen sich die Zelllayer physikalisch als ein isotropes Gel modellieren. Die Amplitude der Schallreflexion an der Zelloberfläche war ein Maß für die akustische Impedanz und bildete die lokale Steifigkeit der Zellkulturen ab, während die Schalldämpfung näherungsweise direkt durch die Intensität des Substratechos bestimmt wurde (Weiss, 2007, Briggs, 1992, Bereiter-Hahn *et al.*, 1995). Mit fortschreitender Differenzierung bildeten die Zellen einen komplexen Multilayer aus mit einem hohen Anteil an extrazellulären Strukturproteinen (**Abb. 23C**). Hier war aufgrund der internen Echos und der komplexen Struktur das Modell eines isotropen Gels nicht mehr anwendbar. Es erfolgte eine qualitative Auswertung anhand der Darstellung horizontaler Schnittbilder (C-Projektionen) in unterschiedlichen Schichttiefen der Zellkultur.

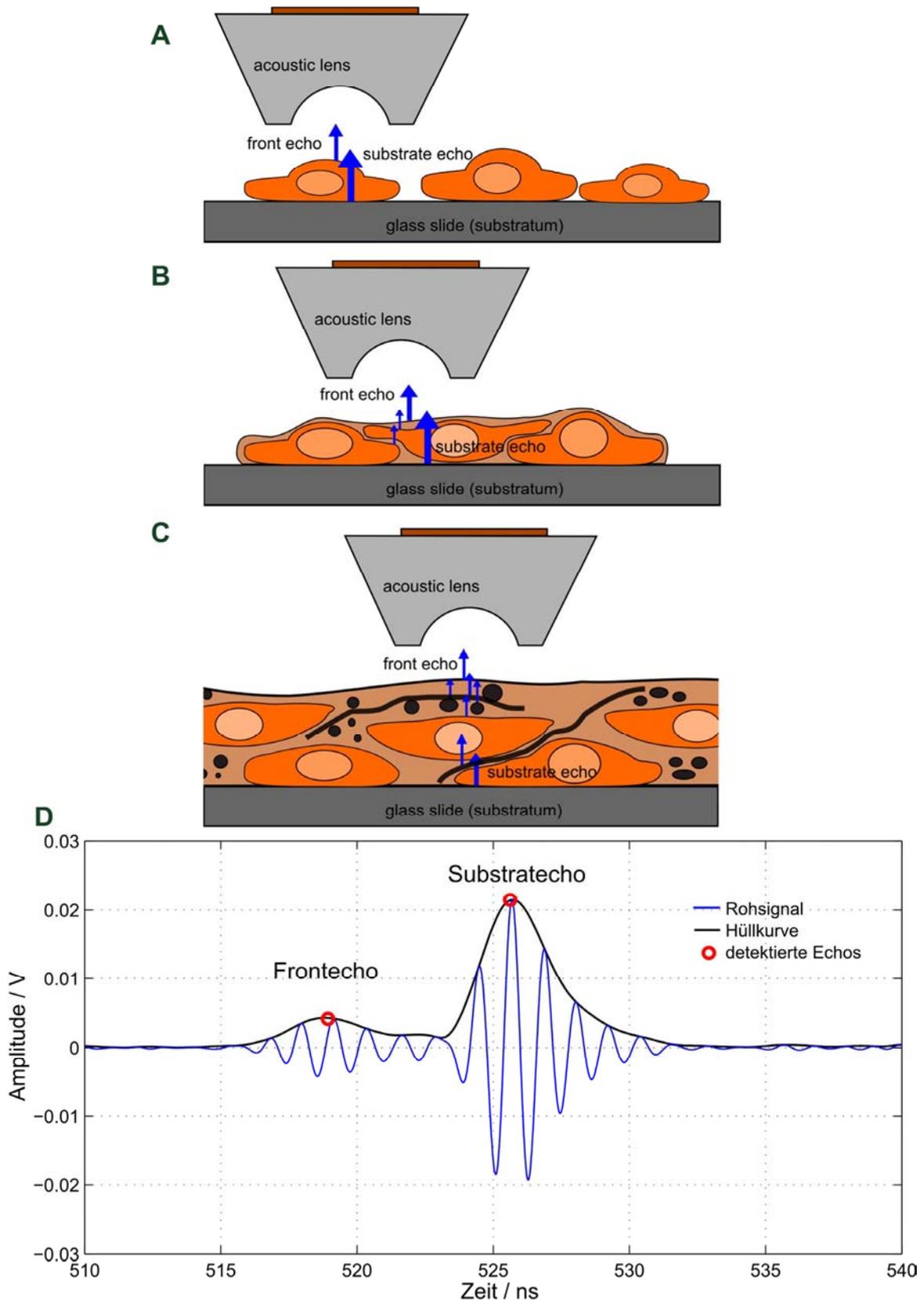


Abb. 23: Akustische Mikroskopie von Zellen. Dargestellt sind die charakteristischen Reflexionsmuster verschiedener Kultivierungs- und Differenzierungsstadien. A) Individuelle Zellen, B) konfluente Zellschicht und C) komplexer Multilayer mit extrazellulärer Matrix. D) Exemplarische Darstellung der detektierten Echos. Gezeigt werden die Signalamplituden der Echos in Abhängigkeit von der Zeit (A-Projektion). Der Verlauf der Rohdaten (blau) wird durch eine Hüllkurve (schwarz) beschrieben. Die Maxima der Echos sind rot markiert.

3. Ergebnisse

3.1 Grundlegende Charakterisierungen der Stammzellkulturen

3.1.1 Zellmorphologie adulter Stammzellen

Zur vergleichenden Charakterisierung der Zellmorphologie der unterschiedlichen MSC-Populationen wurden Zellkulturen der Passage 5 im Phasenkontrast untersucht. Die adulten MSCs präsentierten einen fibroblastoiden Phänotyp. Unabhängig vom Konfluenzgrad waren die BM-MSCs (**Abb. 24A**) und AT-MSCs (**Abb. 24B**) heterogen. Es wurden sowohl polare, spindelförmige Zellen als auch breite, flächige Zellen beobachtet. Im Vergleich zu diesen Zellpopulationen war die spindelförmige Morphologie in den CB-MSC-Kulturen stärker ausgeprägt (**Abb. 24C**). In diesen Kulturen wurde ein frühzeitiger Proliferationsstopp beobachtet, so dass keine konfluenten Zellkulturen ausgebildet wurden.

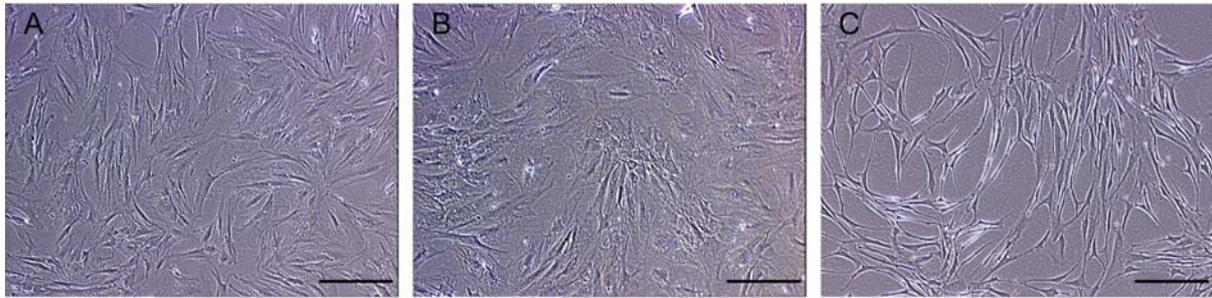


Abb. 24: Typische Morphologien der MSC-Populationen. A) BM-MSCs, B) AT-MSCs und C) CB-MSCs. Balken = 200 μm .

3.1.2 Proliferationspotential adulter Stammzellen

Das proliferative Potential der unterschiedlichen MSC-Populationen wurde anhand der Populationsverdopplungen im Kulturverlauf untersucht (**Abb. 25**). Passagiert wurden die Zellkulturen bei einem Konfluenzgrad von ca. 85% - 90%. Zur Fortsetzung der BM-MSC- und AT-MSC-Kulturen wurden jeweils 1.000 Zellen/cm² neu ausgesät, während die Zellzahl zur Expansion der CB-MSCs 2.000 Zellen/cm² betrug. Während in den vier untersuchten BM-MSC-Chargen eine Varianz der kumulativen Populationsverdopplungen (PD) von 12 - 25 PD am Tag 100 gezeigt wurde, demonstrierten die drei untersuchten AT-MSC-Chargen mit ca. 20 PD am Tag 90 ein homogenes proliferatives Potential. Die Proliferation der CB-MSCs war insgesamt gering, es wurden max. 8,2 PD nach 75 Tagen ermittelt. Des Weiteren wurde in vier von sieben Chargen CB-MSCs kurz nach dem Auftauen ein Proliferationsstopp beobachtet, so dass es nicht möglich war Wachstumskurven dieser Chargen zu erstellen.

3.1 Grundlegende Charakterisierungen der Stammzellkulturen

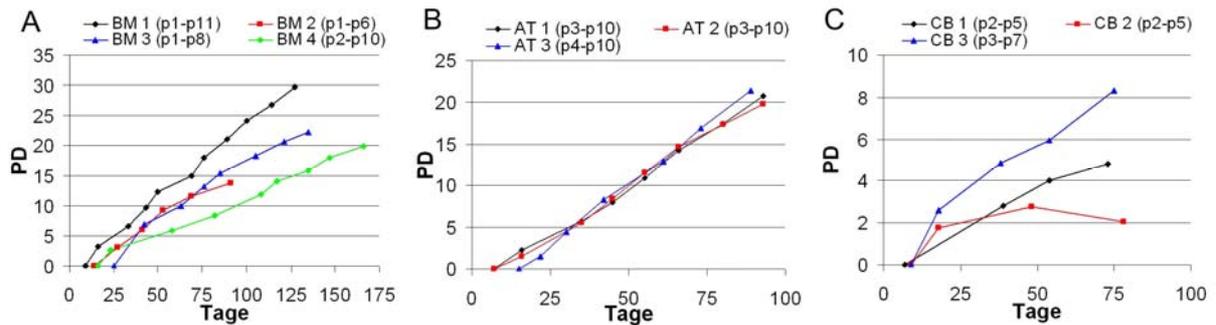


Abb. 25: Proliferation adulter MSCs im Kulturverlauf. Dargestellt sind die kumulativen Populationsverdopplungen (PD) der A) BM-MSCs, B) AT-MSCs und C) CB-MSCs. In den Klammern sind der Startpunkt sowie die finale Passagezahl (p) der jeweiligen Zellkultur aufgeführt.

3.1.3 Charakterisierung der embryonalen Stammzellen

Die embryonale Stammzelllinie hES H1 zeigte ein klonales Wachstum, welches zu der Ausbildung von bis zu \varnothing 2 mm großen Stammzellkolonien führte. Undifferenzierte hES H1-Kolonien waren klar von den *feeder*-Zellen (wachstumsinhibierte MEFs) zu diskriminieren (**Abb. 26A und B**). Des Weiteren wurde in den hES H1-Kolonien eine mit embryonalen Stammzellen assoziierte Expression der ALP nachgewiesen, während die *feeder*-Zellen keine erhöhte ALP-Aktivität demonstrierten (**Abb. 26C**).

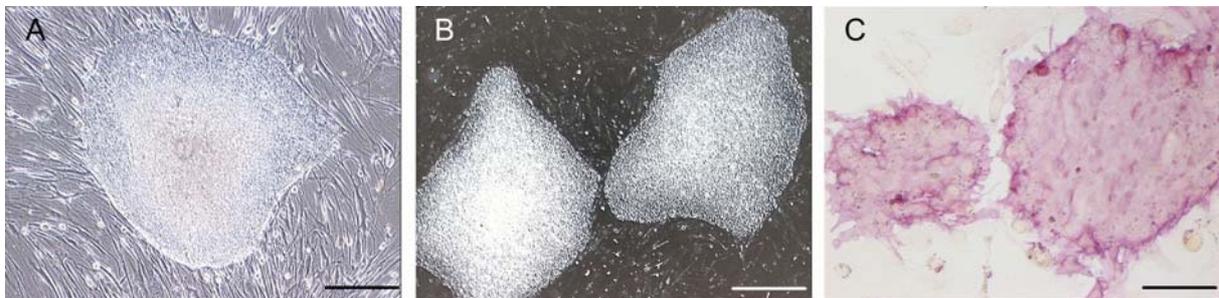


Abb. 26: Morphologische Beurteilung der hES H1-Kolonien. A) Darstellung im Phasenkontrast und B) im Dunkelfeld zur vereinfachten Diskriminierung von den *feeder*-Zellen. C) Expression der Alkalischen Phosphatase in hES H1-Kolonien (rote Zellen). A) und C): Balken = 200 μ m, B): Balken = 500 μ m.

Um zelluläre Strukturen darzustellen, wurden die hES H1-Kolonien im Rasterelektronenmikroskop (REM) untersucht (**Abb. 27**). Zur Darstellung der zellulären Topographie wurde der sekundäre Elektronenkontrast (SD) verwendet. Die Darstellung individueller Zellen erfolgte durch die Rückstreuielektronen (*backscattered electrons*, BSE). Bei geringer Vergrößerung erschienen die Kolonien solide, durch die relativ hohe Probendicke hatten sich bei der Präparation Risse gebildet. Es waren keine individuellen Zellen erkennbar, auch wenn die *feeder*-Zellen bereits dargestellt wurden (**Abb. 27**). Bei höherer Auflösung wurden individuelle hES H1-Zellen innerhalb eines Kolonieverbandes dargestellt. Die Zellgröße beträgt 10 μ m - 20 μ m (**Abb. 27B**) und auf der Zelloberfläche wurden Mikrovilli präsentiert (**Abb. 27C**).

3. Ergebnisse

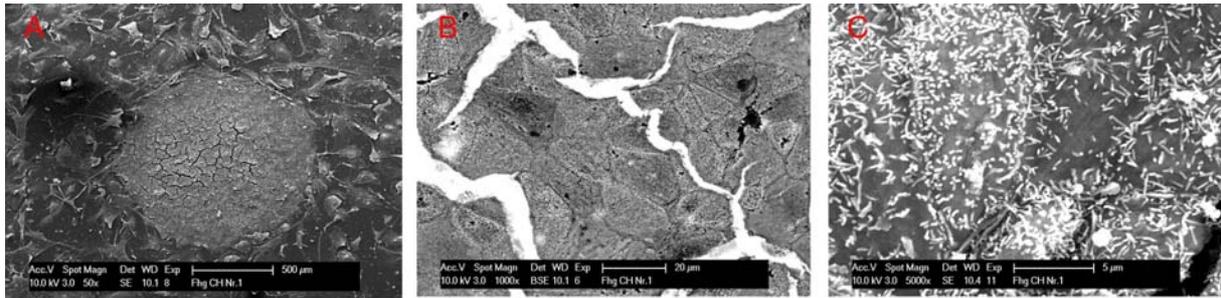


Abb. 27: Untersuchung der hES H1-Kolonien im REM. Dargestellt sind (A) eine Übersichtsaufnahme, (B) individuelle Zellen im Kolonieverband und (C) die Präsentation von Mikrovilli auf den Zellen.

Die Expression der pluripotenzassoziierten Gene SOX-2, Nanog und OCT-3/4 wurde mittels immunhistologischer Färbungen untersucht. **Abbildung 28** zeigt jeweils die mit DAPI markierten Zellkerne und die korrelierende Abbildung der spezifischen Genexpression. Zur Darstellung der Kolokalisation wurde das jeweilige *merge*-Bild abgebildet. Eine dominante Expression der Gene SOX-2, Nanog und OCT-3/4 wurde festgestellt. Nur in den Randbereichen der Kolonie wurden Zellkerne mit einer verminderten Expression dieser Gene festgestellt, wodurch der Farbanteil der DAPI-Färbung in den *merge*-Abbildungen überwog.

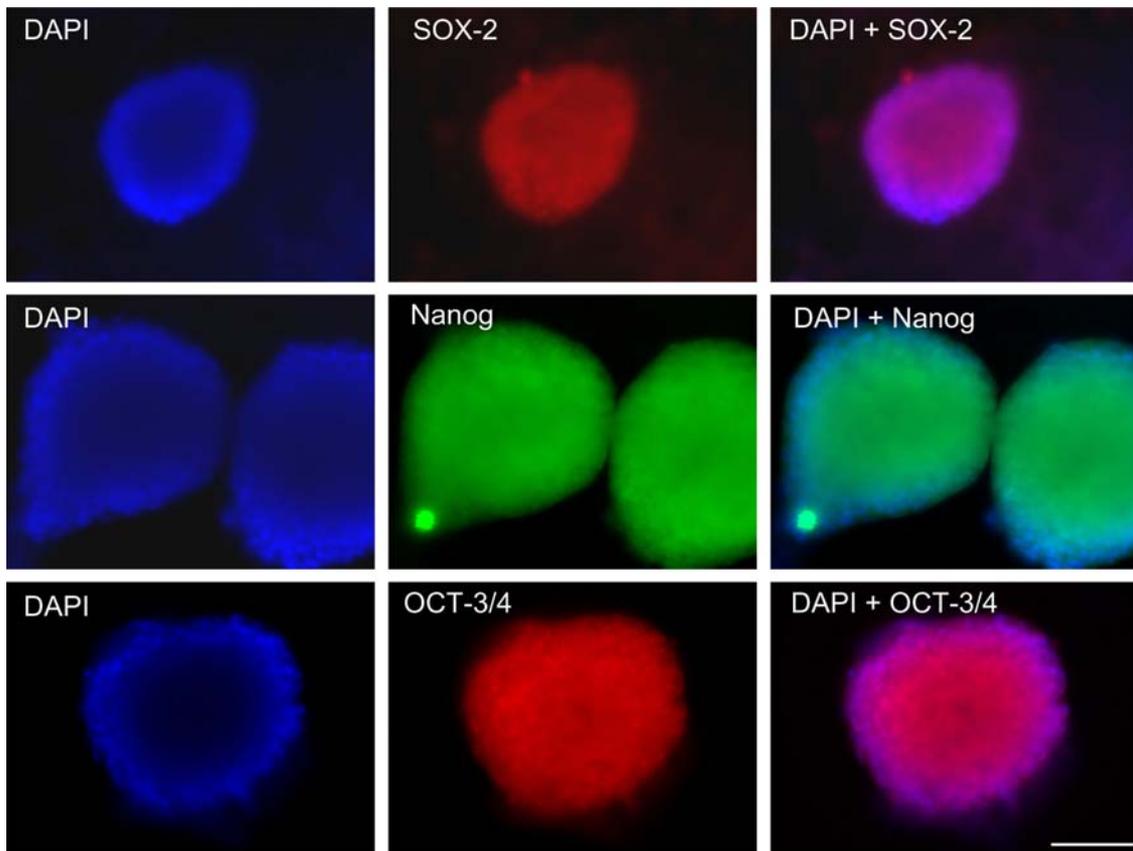


Abb. 28: Immunhistologische Untersuchung der pluripotenzassoziierten Marker SOX-2, Nanog und OCT-3/4 in hES H1-Kolonien. Von links nach rechts: Blaufärbung der Nuklei mittels DAPI, spezifische Markierung der Genexpression (SOX-2 bzw. OCT-3/4: rot, Nanog: grün) und die resultierende *merge*-Abbildung zur Darstellung der Kolokalisation. Balken = 100 µm.

3.1.4 Embryoid Bodies

Nach Überführung der hES H1-Kolonien in eine Suspensionskultur erfolgte innerhalb von 3 Tagen die Formation von hohlen Aggregaten, den sogenannten *embryoid bodies* (EBs). Dabei variierten die EBs in ihrer Größe und Dichte (**Abb. 29**).



Abb. 29: A, B und C) Exemplarische Abbildungen von *embryoid bodies* (EBs). Balken = 200 µm.

Nach Kultivierung im EB wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie auf die Expression hES-assoziiierter Pluripotenzmarker untersucht, um die erfolgte Differenzierung der hES H1 in Zellen der drei Keimblätter zu zeigen. Die untersuchten Marker OCT-3, SSEA-1 und TRA-81 wurden nach 5 Tagen bzw. 25 Tagen Kultivierung im EB nicht exprimiert (**Abb. 30**).

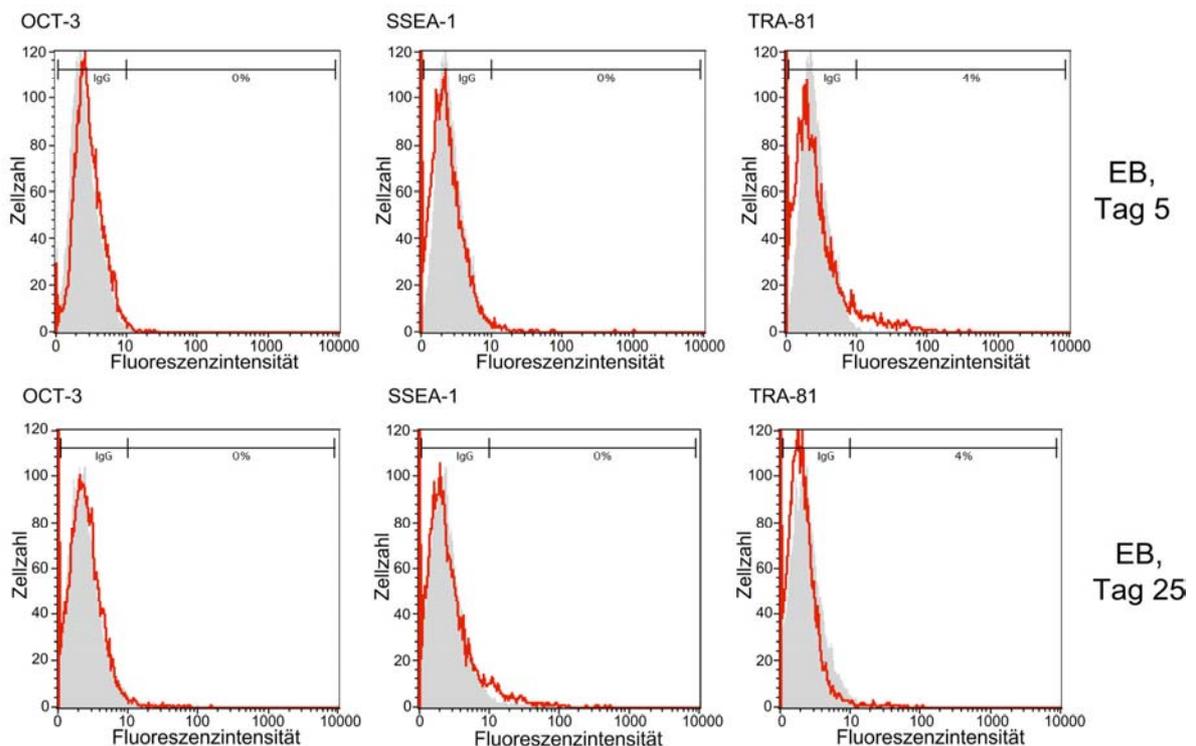


Abb. 30: Untersuchung der Pluripotenz der hES H1-Kulturen nach 5 Tagen bzw. 25 Tagen Kultivierung im EB mittels Durchflusszytometrie. Dargestellt ist jeweils die Anzahl der detektierten Zellen gegen die gerätespezifische Fluoreszenzintensität. Es wurde keine Expression von OCT-3, SSEA-1 und TRA-81 (rot) nachgewiesen. Die jeweiligen IgG-Isotypkontrollen sind grau dargestellt.

3.1.5 Expression mesenchymaler Marker in MSCs und hES H1

Die Expression MSC-assoziiierter Oberflächenmarker in den unterschiedlichen MSC-Populationen und in hES H1 nach erfolgter Vordifferenzierung im EB wurde mittels Durchflusszytometrie charakterisiert (**Tab. 2**). Es wurden jeweils 3 Zellchargen untersucht. Die Histogramme sind im Anhang aufgeführt (**vgl. Abschnitt 7.3**).

In den untersuchten BM-MSC- und AT-MSC-Kulturen exprimierten über 95% der Zellen einer Population die Positivmarker CD44, CD73, CD90 und CD105. Demgegenüber war die Expression dieser Marker in den CB-MSCs heterogener. So wurden einzelne Marker in den unterschiedlichen CB-MSC-Chargen nicht von allen Zellen exprimiert, z.B. in der Charge CB 1 präsentierten nur 71% der Zellen CD105. Die Negativmarker CD31, CD34, CD45 und HLA-DR wurden von max. 7% der Zellen exprimiert. Des Weiteren waren alle untersuchten adulten Stammzellpopulationen negativ für CD117 und CD271.

In hES H1 wurde nach erfolgter Kultivierung im EB keine Expression der Negativmarker CD31, CD34, CD45 und HLA-DR demonstriert. Die Expression der MSC-assoziierten Marker CD73 und CD105 wurde ebenfalls nicht nachgewiesen. Des Weiteren wiesen die Zellen eine zeitabhängige Expression der Positivmarker CD44 und CD90 auf. Eine kurze Kultivierungszeit von 5 Tagen im EB führte zu über 95% positiver Zellen, während längere Kulturzeiten von 22 Tagen bzw. 25 Tagen mit einem geringeren Prozentsatz positiver Zellen korrelierten. Demgegenüber war der Einfluss der Kultivierungszeit im EB auf die Expression von CD271 gegenläufig. Eine Kultivierungszeit von 22 Tagen bzw. 25 Tagen im EB induzierte die Expression von CD271 in ca. 30% der Zellen, während hES H1 nach 5 Tagen im EB mit 4% nahezu negativ waren. Die untersuchten hES H1-Populationen zeigten mit 8% - 17% eine geringe Expression von CD117.

Tab. 2: Expressionsprofil MSC-assoziiierter Oberflächenmarker. Von jeder MSC-Population (Knochenmark = BM, Fettgewebe = AT und Nabelschnurblut = CB) wurden jeweils 3 Chargen im Durchflusszytometer untersucht. Das Expressionsprofil der hES H1-Kulturen wurde in Abhängigkeit der Kulturdauer im EB bestimmt. Dargestellt ist jeweils der Anteil positiver Zellen in Prozent zur Gesamtpopulation.

	BM 1	BM 2	BM 3	AT 1	AT 2	AT 3	CB 1	CB 2	CB 3	EB 5 Tage	EB 22 Tage	EB 25 Tage
CD31	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
CD34	0%	7%	1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	1%	0%	0%
CD44	98%	99%	96%	99%	99%	98%	99%	97%	98%	99%	7%	14%
CD45	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
CD73	98%	99%	95%	99%	99%	99%	98%	88%	98%	2%	0%	1%
CD90	98%	99%	98%	99%	99%	99%	95%	93%	90%	95%	45%	34%
CD105	98%	98%	89%	99%	99%	98%	71%	90%	89%	1%	2%	1%
CD117	0%	1%	1%	0%	0%	1%	0%	0%	0%	17%	8%	15%
CD271	1%	0%	1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	4%	31%	32%
HLA-DR	0%	0%	1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

3.1.6 Osteogene Differenzierung adulter MSCs in 2D-Zellkulturen

Die osteogene Differenzierung der adulten Stammzellkulturen (BM-MSCs, AT-MSCs und CB-MSCs) wurde nach 21 - 24 Tagen anhand der Expression von ALP, Kollagen-1 und kalzifizierter ECM demonstriert (**Abb. 31**). Die untersuchten Zellkulturen befanden sich in der Passage vier bis Passage fünf. In den osteogen stimulierten Kulturen war die Aktivität der Alkalischen Phosphatase im Vergleich zu den Kontrollen erhöht, was zu einer vermehrten Verstoffwechslung des Färbesubstrates und Rotfärbung der Zellen führte. Insgesamt wurde aber eine unterschiedlich hohe Grundaktivität in den nativen Kontrollen demonstriert. Des Weiteren wurde nach osteogener Stimulation die Expression von fibrillärem Kollagen-1 mittels Immunfluoreszenzfärbung gezeigt sowie eine Kumulation von Kalziumverbindungen in der extrazellulären Matrix mittels von Kossa-Färbung.

3. Ergebnisse

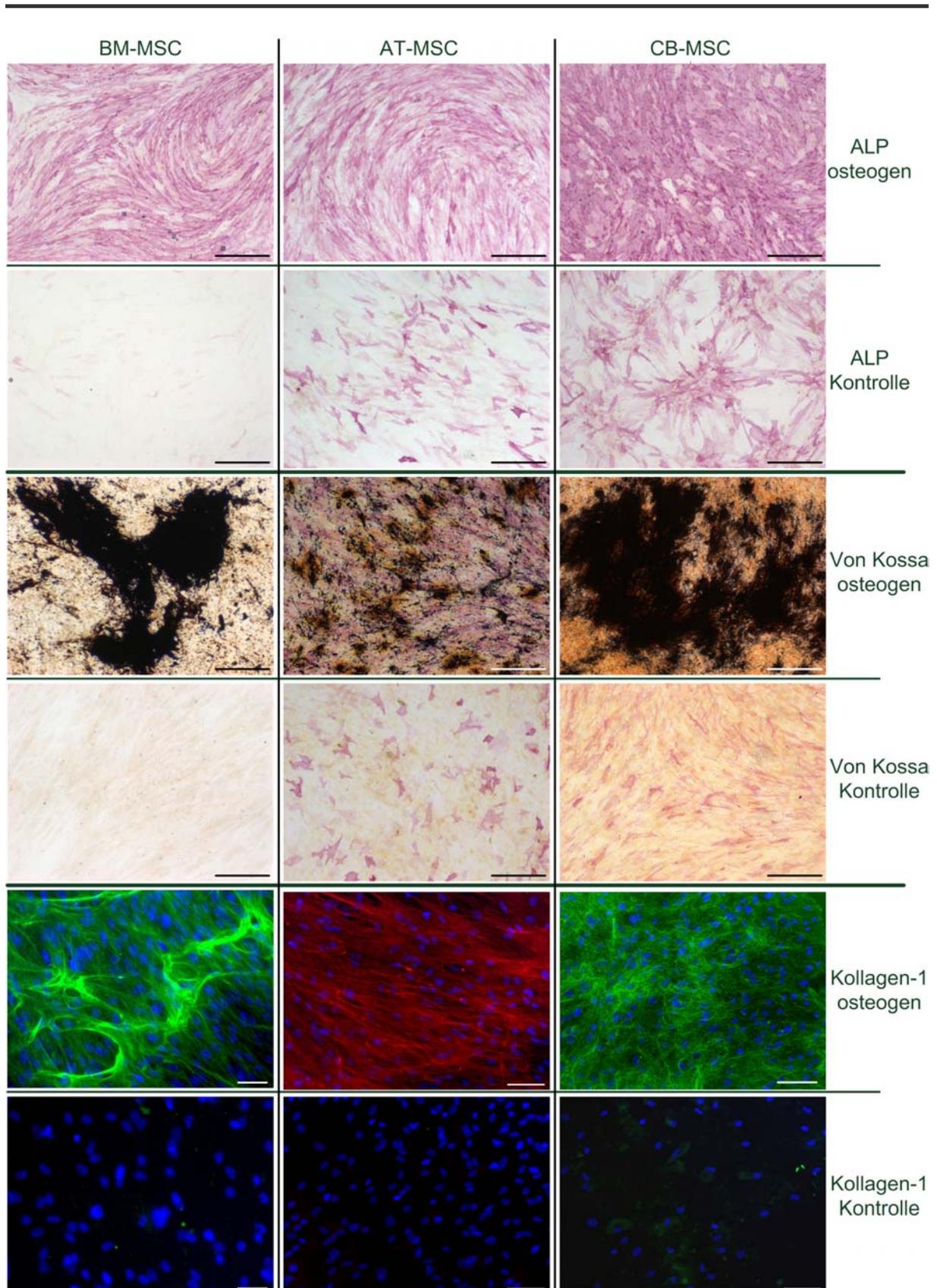


Abb. 31: Osteogene Differenzierung der MSCs. Dargestellt sind BM-MSCs, AT-MSCs und BM-MSCs nach 21 - 24 Tagen osteogener Stimulation (osteogen) und die nativen Zellkulturen als Kontrolle. Untersucht wurde die ALP-Expression (rot), die Mineralisierung der ECM mittels von Kossa-Färbung (schwarz) und die Expression von Kollagen-1 mittels Immunfärbung (grün bzw. rot). ALP/von Kossa: Balken = 500 µm, Kollagen-1-Immunfärbung: Balken = 100 µm.

3.1.7 Charakterisierung zellulärer Strukturen im Rasterelektronenmikroskop

Adulte Stammzellkulturen wurden nach 21 Tagen osteogener Differenzierung im Rasterelektronenmikroskop untersucht. Die Probenvorbereitungen und Aufnahmen mit dem Rasterelektronenmikroskop wurden freundlicherweise von Dr. Katsen-Globe, Fraunhofer IBMT durchgeführt. Exemplarisch wurden Bilder unterschiedlicher Vergrößerungen abgebildet. Die nativen BM-MSCs präsentierten eine glatte Oberflächenstruktur (**Abb. 32A**), bei höherer Vergrößerung wurden Filopodien und extrazelluläre Matrixstrukturen abgebildet (**Abb. 32B**). In **Abbildung 32C** wurde die Interaktion der Filopodien mit der extrazellulären Matrix dargestellt. Man erkennt, dass die Filopodien an der extrazellulären Matrix anhaften. Nach osteogener Stimulation erfolgte eine großflächige Präsentation kristalliner Strukturen auf der Zelloberfläche (**Abb. 32D**). Diese plättchenartigen Strukturen kristallisierten scheinbar direkt aus der Zellmembran heraus (**Abb. 32F**) und akkumulierten auf den Zellen (**Abb. 32E**). Um zu überprüfen, ob diese Strukturen mit dem Kalzifizierungsprozess assoziiert waren, wurde eine Elementanalyse durchgeführt. Die Ergebnisse werden weiter unten dargestellt.

Im Vergleich zu den BM-MSCs waren die untersuchten AT-MSCs insgesamt flächiger und breiter (**Abb. 32G**). Bei höherer Vergrößerung wurden vesikelartige Strukturen erkennbar (**Abb. 32H**). Zur Verifizierung, ob diese Vesikel intrazellulär lokalisiert waren, wurde das kontrastverstärkende BSE-Verfahren (*backscattered electrons*) angewendet (**Abb. 32I**). Die Strukturen waren intrazellulär lokalisiert. Nach osteogener Stimulation wurden vereinzelt Zellen mit einer unebenen Oberfläche (mittlere Zelle, **Abb. 32J**) detektiert. Bei höherer Vergrößerung zeigten sich plättchenartige Strukturen, die mit der Zellmembran assoziiert waren (**Abb. 32L**). Aufgrund der Ähnlichkeit zu den kristallinen Strukturen in **Abbildung 32F**, könnte es sich um ein frühes Stadium der Kalziumsekretion handeln. Des Weiteren präsentierten diese Zellen fibrilläre ECM (**Abb. 32K**).

Die Zelloberfläche der nicht differenzierten CB-MSCs (**Abb. 32M**) war nicht so strukturlos wie die der BM-MSCs (**Abb. 32A**) oder AT-MSCs (**Abb. 32G**). Die Zellen exprimierten Mikrovilli und fibrilläre ECM (**Abb. 32N**). In **Abbildung 32O** ist, wie bereits in BM-MSCs dargestellt (**Abb. 32C**), die Interaktion der Filopodien mit der ECM erkennbar. Nach osteogener Stimulation wurden keine kristallinen Strukturen präsentiert (**Abb. 32P, Q und R**).

3. Ergebnisse

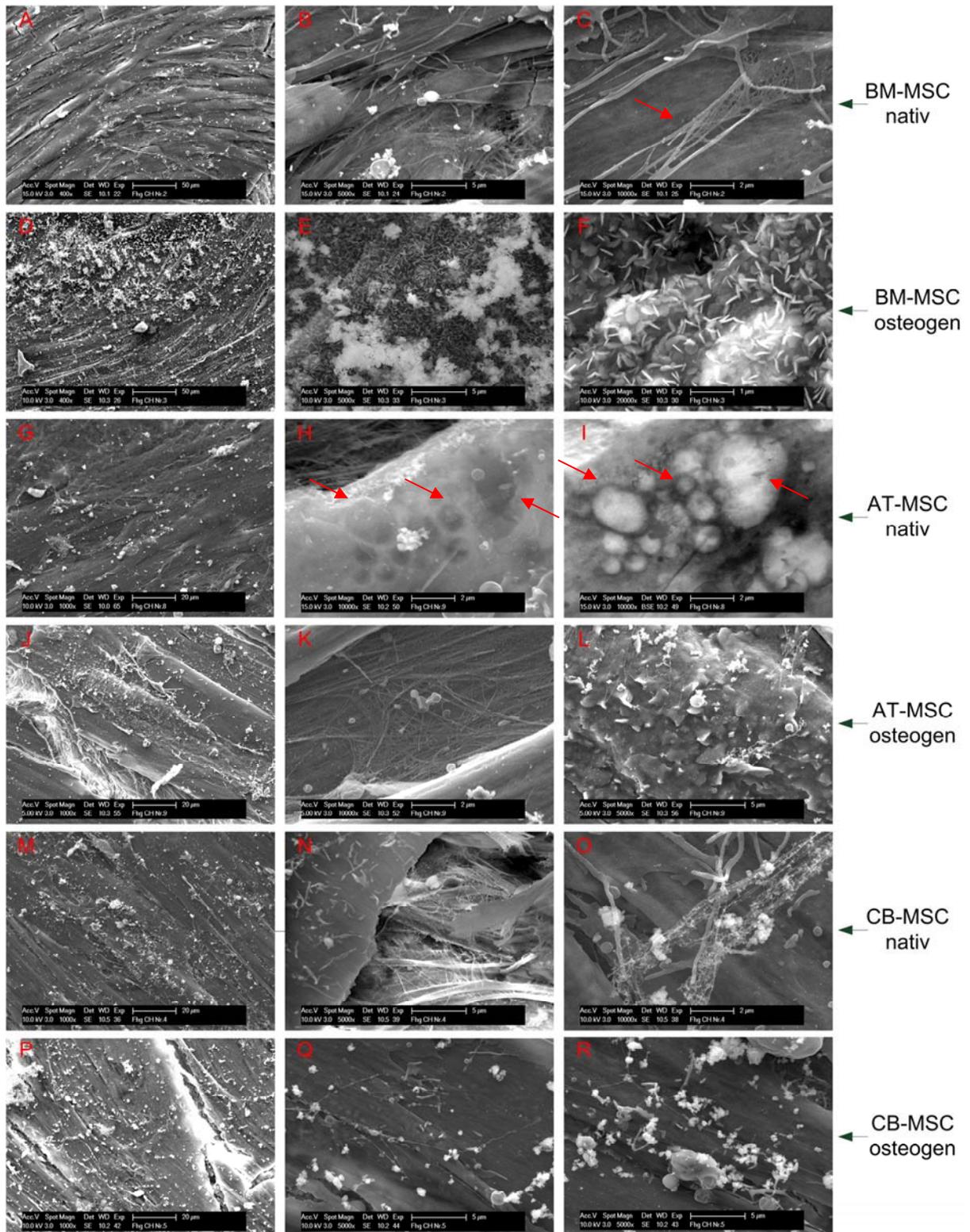


Abb. 32: Charakterisierung der osteogenen Differenzierung der MSCs im REM. Abgebildet sind BM-MSCs (A - C: nativ, D - F: osteogen), AT-MSCs (G - H: nativ, J - L: osteogen) und CB-MSCs (M - O: nativ, P - R: osteogen) nach 21 Tagen osteogener Induktion in unterschiedlicher Vergrößerung. Die Pfeile verweisen auf die Interaktion der Filopodien mit der extrazellulären Matrix (C) und auf intrazelluläre Vesikel (H, I).

3.1 Grundlegende Charakterisierungen der Stammzellkulturen

Um die Hypothese zu untersuchen, ob es sich bei den kristallinen Strukturen um einen knochenspezifischen Kalzifizierungsprozess der Zellen handelte, wurde eine Elementanalyse durchgeführt. Bei der Elementanalyse wurde die Emission der Röntgenstrahlung gemessen, die entsteht, wenn die applizierte Elektrodenstrahlung des REM auf die Probe trifft und ein Elektron aus seinem Orbital geschlagen wird. Das Orbital wird von energiereichen Elektronen eines höheren Orbitales aufgefüllt und Röntgenquanten mit einer für das Element spezifischen Energie emittiert. Diese Energie wurde in Elektronenvolt (eV) gemessen und die prozentuale Gewichts- (Wt%) und Flächenverteilung (At%) der detektierten Elemente bestimmt. Untersucht wurden ein Bereich mit hoher Akkumulationsdichte dieser Strukturen und ein Bereich mit einzelnen kristallinen Strukturen (**Abb. 33**). Es zeigte sich, dass beide Bereiche positiv für Kalzium und Phosphat waren, wobei in den akkumulierten Bereichen jeweils eine Zunahme dieser Elemente nachgewiesen wurde.

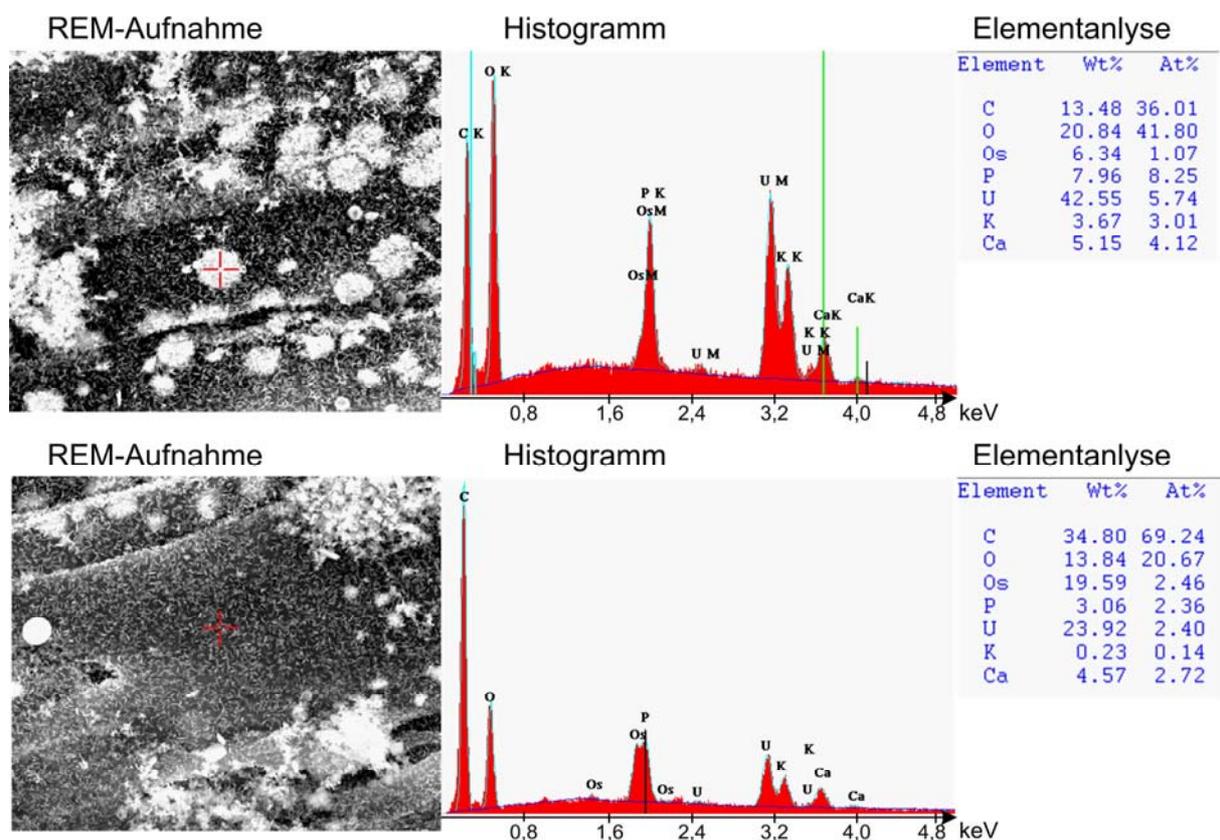


Abb. 33: Elementanalyse der kristallinen Strukturen in MSCs nach osteogener Stimulation. Dargestellt sind kristalline Strukturen auf der Zelloberfläche in der REM-Aufnahme sowie die korrespondierende Elementanalyse (rotes Kreuz) der prozentualen Gewichts (Wt%) und Flächenverteilung (At%) der detektierten Elemente. Die Histogramme der Rohdaten zeigen die Emission der elementspezifischen Energien in Kiloelektronenvolt (keV).

3.1.8 Osteogene Differenzierung der hES H1 in 2D-Zellkulturen

Voraussetzung zur Durchführung der Differenzierungsexperimente war eine Vordifferenzierung der hES H1 in keimblattspezifische Zellen, da diese durch die Expression spezifischer Rezeptoren, Integrine und einer Vielzahl von Proteinen und Signalmolekülen zur Interaktion mit den Differenzierungsfaktoren befähigt sind. Dabei wurden zwei Kulturtechniken untersucht: eine direkte Differenzierung der Zellkulturen, bei der die Kolonien vorab mittels Trypsinierung vereinzelt und neu ausgesät wurden, sowie eine Differenzierung nach erfolgter Subkultivierung im EB.

Es zeigte sich, dass die Art der Subkultivierung die Homogenität der Zellkulturen beeinflusste. Während hES H1-Zellen, die direkt aus dem Kolonieverband isoliert und subkultiviert wurden eine heterogene Zellpopulation ausbildeten (**Abb. 34A**), präsentierten Zellen nach 5 Tagen Subkultivierung im EBs überwiegend eine runde Morphologie (**Abb. 34B**) und nach 22 Tagen im EB einen fibroblastoiden Phänotyp, auch wenn die Zellen im Vergleich zu den MSCs kürzer waren (**Abb. 34C**).

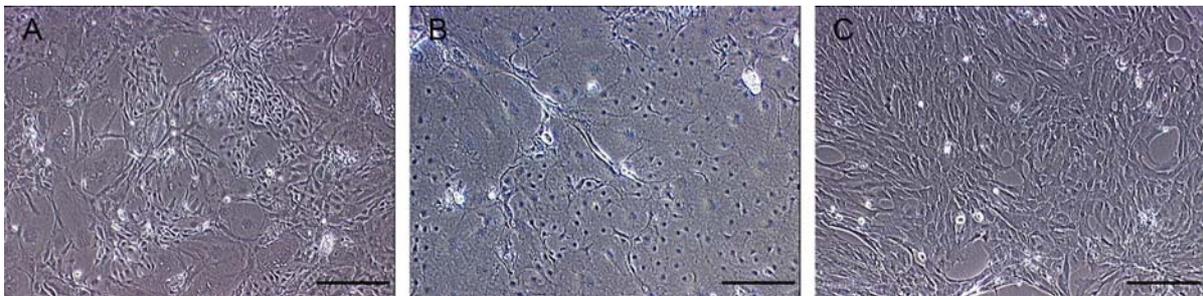


Abb. 34: Einfluss der Subkultivierung auf die Heterogenität der hES H1-Kulturen. A) Direkte Differenzierung, B) hES H1 nach 5 Tagen Kultivierung in einer EB-Kultur und C) nach 22 Tagen Kultivierung im EB. Balken = 200 μm .

Die Abhängigkeit der Subkultivierung auf die osteogene Differenzierung wurde anhand der Expression von ALP, Kollagen-1 und kalzifizierter ECM untersucht (**Abb. 35**). In den direkt differenzierten Kulturen wurde eine starke Expression von fibrillärem Kollagen-1 demonstriert und eine großflächige Kalzifizierung der ECM (von Kossa-Färbung). In den Kontrollen wurden eine geringere Kollagen-1-Expression nachgewiesen und keine Kalziumdeposition. Insgesamt war die Zellverteilung inhomogen, in den Kontrollen kam es zur Formation EB-ähnlicher Strukturen die teilweise eine erhöhte ALP-Aktivität aufwiesen.

Während in den hES H1-Kulturen nach 22 Tagen Subkultivierung im EB eine starke Expression von Kollagen-1 induziert wurde und eine großflächige Kalzifizierung (Alizarinrot-Färbung) erfolgte, wurden nach 5 Tagen im EB eine geringere Expression von Kollagen-1 und keine kalzifizierte ECM (von Kossa-Färbung) nachgewiesen. Die jeweiligen Kontrollen waren negativ für den entsprechenden Nachweis. Infolge osteogener Stimulation wurde keine Induktion der ALP beobachtet.

3.1 Grundlegende Charakterisierungen der Stammzellkulturen

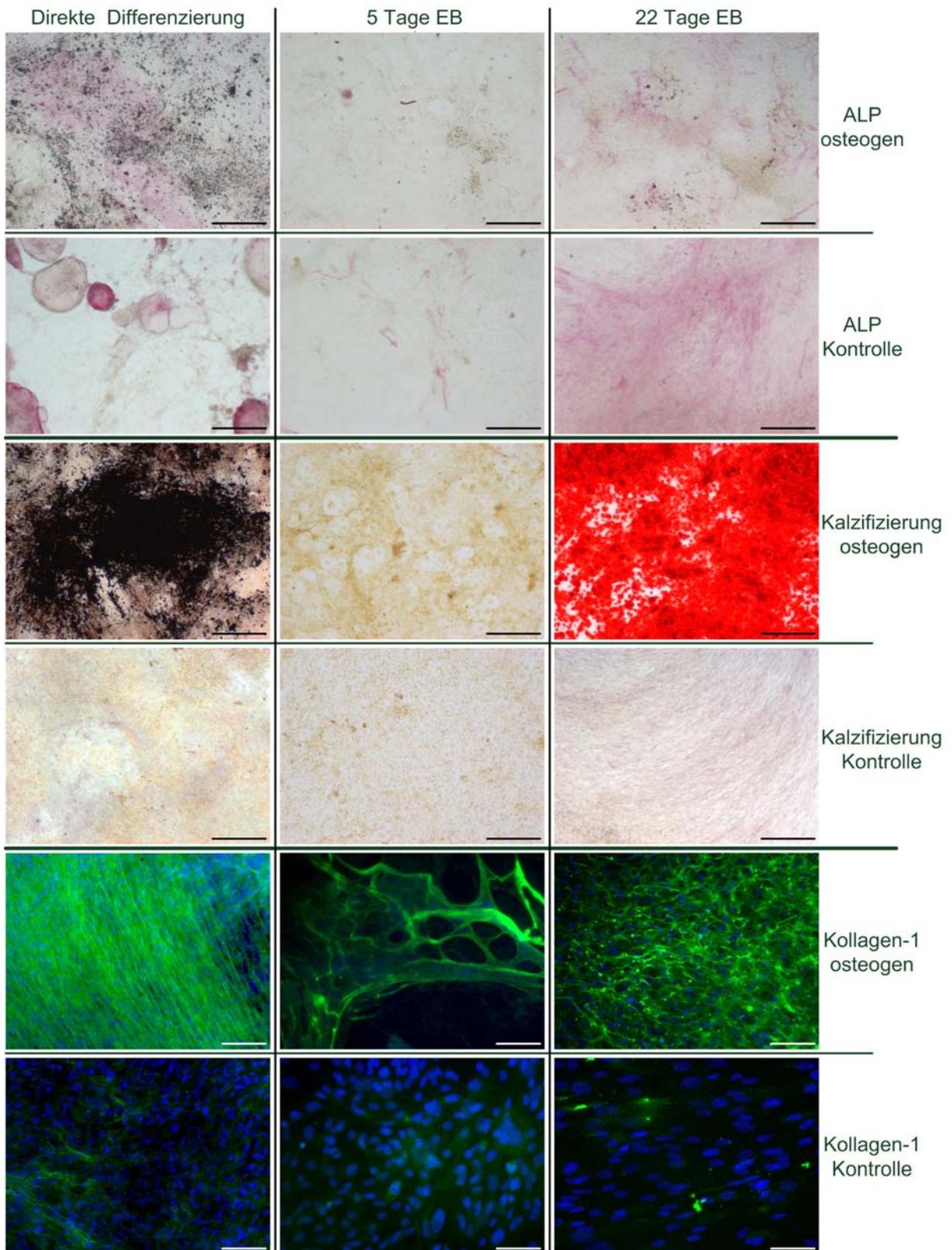


Abb. 35: Osteogene Differenzierung der hES H1-Zellen nach 22 Tagen osteogener Stimulation. Untersucht wurden eine direkte Differenzierung sowie eine Subkultivierung im EB für 5 Tage bzw. 22 Tage. Bestimmt wurde die ALP-Expression (rot), die Mineralisierung der ECM mittels von Kossa-Färbung (schwarz) bzw. mit Alizarinrot-Färbung (rot) und die Expression von Kollagen-1 (grün) mittels Immunfärbung. ALP/von Kossa: Balken = 500 µm, Kollagen-1-Immunfärbung: Balken = 100 µm.

3.1.9 Quantifizierung der Mineralisierung

Zur Charakterisierung der Kalziumdeposition in den adulten und embryonalen Stammzellkulturen nach 22 Tagen bzw. 28 Tagen osteogener Stimulation wurde nach erfolgter Alizarinrot-Färbung eine optische Rasteruntersuchung durchgeführt. Dabei wurden von jeder Zellpopulation drei parallele Ansätze untersucht. Das Rasterbild (19x25 einzelne Bilder, 10-fach Objektiv) erfasste eine Fläche von 2,3 cm² eines 12-wells (**Abb. 36**).

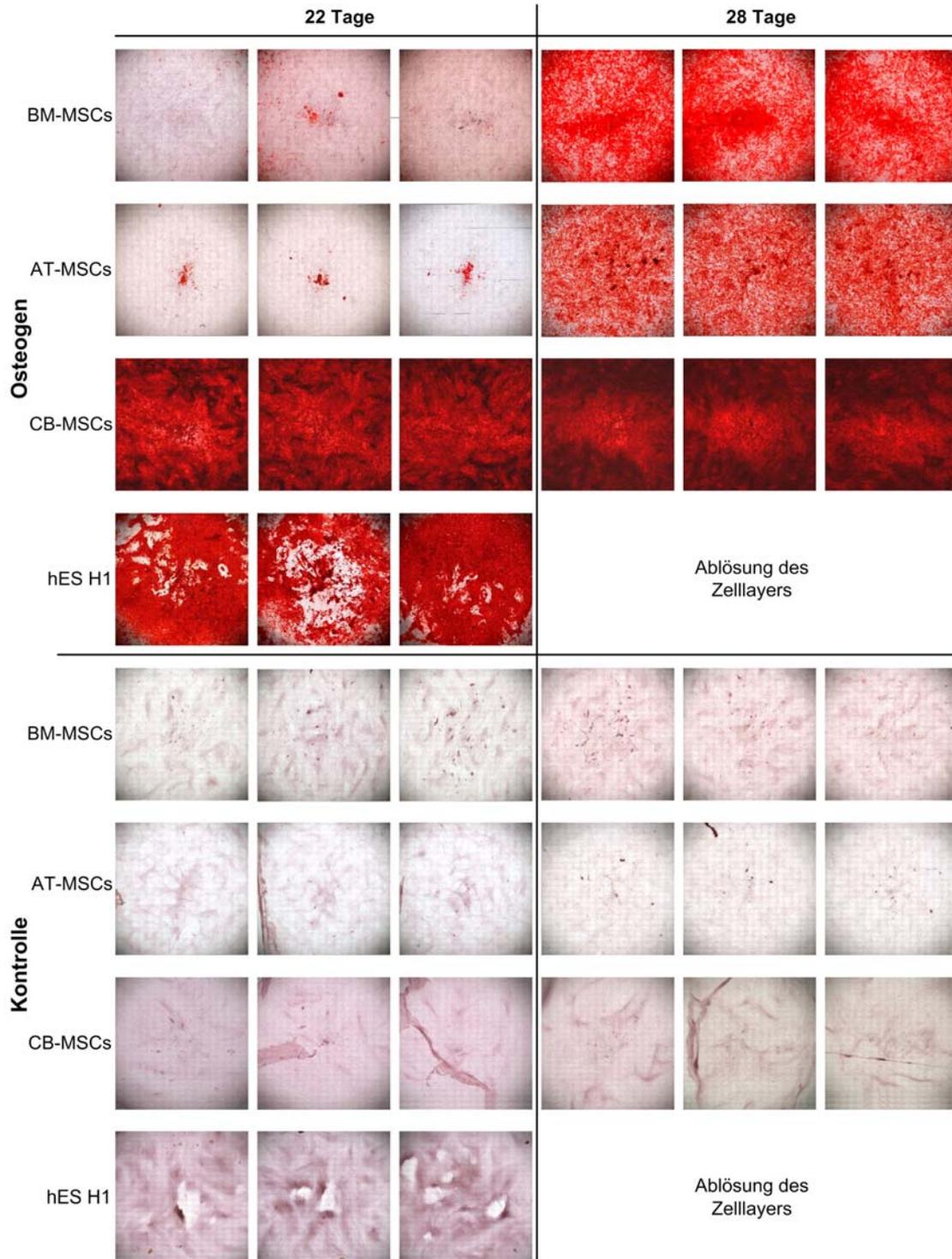


Abb. 36: Vergleich der Mineralisierung in den Stammzellkulturen nach 22 Tagen bzw. 28 Tagen osteogener Induktion. Dargestellt sind Rasteraufnahmen der kalzifizierten Bereiche nach Visualisierung mittels Alizarinrot.

3.1 Grundlegende Charakterisierungen der Stammzellkulturen

Anhand dieser Übersichtsbilder wurde eine RGB-Analyse (rot, grün und blau Farbanalyse, CellP, Olympus, Hamburg) der rot dargestellten, mineralisierten Bereiche prozentual zur Gesamtbildfläche durchgeführt (**Tab. 3**). Die Daten der RGB-Analyse korrelierten mit der optischen Beurteilung der Zellkulturen. BM-MSCs sowie AT-MSCs zeigten nach 22 Tagen kleine kalzifizierte Areale und eine deutliche Zunahme der Kalzifizierung im weiteren Kulturverlauf bis Tag 28. Demgegenüber präsentierten CB-MSCs bereits nach 22 Tagen eine nahezu vollständige Kalzifizierung der Zellkulturen.

In den hES H1-Kulturen wurde nach 22 Tagen eine großflächige Kalzifizierung demonstriert, wobei der prozentuale Bedeckungsgrad der drei parallelen Ansätze die größte Varianz der untersuchten Zellkulturen hatte. Infolge des Färbeprozesses wurde in hES H1 eine Ablösung des Kalziumkondensates beobachtet, was auf eine geringere Bindung der ECM-Strukturen schließen lässt. Aufgrund einer wiederholt beobachteten Ablösung des Zelllayers war eine Untersuchung am Kulturtag 28 nicht möglich.

Kontrollexperimente an Zellkulturen ohne spezifische osteogene Stimulation zeigten keine Kalziumdeposition.

Tab. 3: Prozentualer Bedeckungsgrad der kalzifizierten Bereiche nach Alizarinrot-Färbung im Bezug auf die Gesamtbildfläche. Es wurden jeweils 3 Ansätze untersucht.

		22 Tage			28 Tage		
		Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3
Osteogen	BM-MSCs	1%	5%	2%	86%	85%	86%
	AT-MSCs	3%	2%	3%	69%	73%	73%
	CB-MSCs	98%	99%	100%	100%	100%	100%
	hES H1	87%	72%	93%	-	-	-
Kontrolle	BM-MSCs	< 1%	< 1%	< 1%	< 1%	< 1%	< 1%
	AT-MSCs	< 1%	< 1%	< 1%	< 1%	< 1%	< 1%
	CB-MSCs	< 1%	< 1%	< 1%	< 1%	< 1%	< 1%
	hES H1	< 1%	< 1%	< 1%	-	-	-

3.1.10 Osteogenese-Assay

Zur Bestimmung des osteogenen Potentials der adulten Stammzellpopulationen sowie der embryonalen Stammzelllinie hES H1 nach 21 Tagen bzw. 28 Tagen osteogener Induktion wurde die Kalziumdeposition mit dem Osteogenese-Assay von Milipore (Schwalbach) quantifiziert. Die Kalziumkondensation in der extrazellulären Matrix der Zellkulturen (n = 3) wurde mittels Alizarinrot dargestellt, extrahiert und die Absorption der Kalziumchelatverbindung bei 450 nm bestimmt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels einer Konzentrationsreihe.

Im Vergleich zu den Kontrollen wurde in allen Zellkulturen nach 21 Tagen osteogener Stimulation ein Konzentrationsanstieg des Farbstoffes beobachtet (**Abb. 37**). Durch eine Verlängerung der Kultivierungszeit auf 28 Tagen wurde ein weiterer Konzentrationsanstieg induziert. Die CB-MSK-Kulturen hatten eine maximale Konzentration von 8,7 mM Alizarinrot am Tag 21 und eine Konzentration von 12,1 mM Alizarinrot am Tag 28. Die zweithöchste

3. Ergebnisse

Konzentration von 7,2 mM Alizarinrot wurde in den hES H1-Kulturen am Tag 21 detektiert. Bedingt durch ein Ablösen des hES H1-Zelllayers konnten keine Daten am Tag 28 ermittelt werden. Die BM-MSCs und AT-MSCs hatten ein vergleichbares Kalzifizierungspotential. Am Tag 21 wurde eine Konzentration von 1,3 mM Alizarinrot in BM-MSCs und von 0,5 mM Alizarinrot in AT-MSCs beobachtet und am Tag 28 eine Konzentration von 4 mM in BM-MSCs und von 5,1 mM in AT-MSCs (**Abb. 37**).

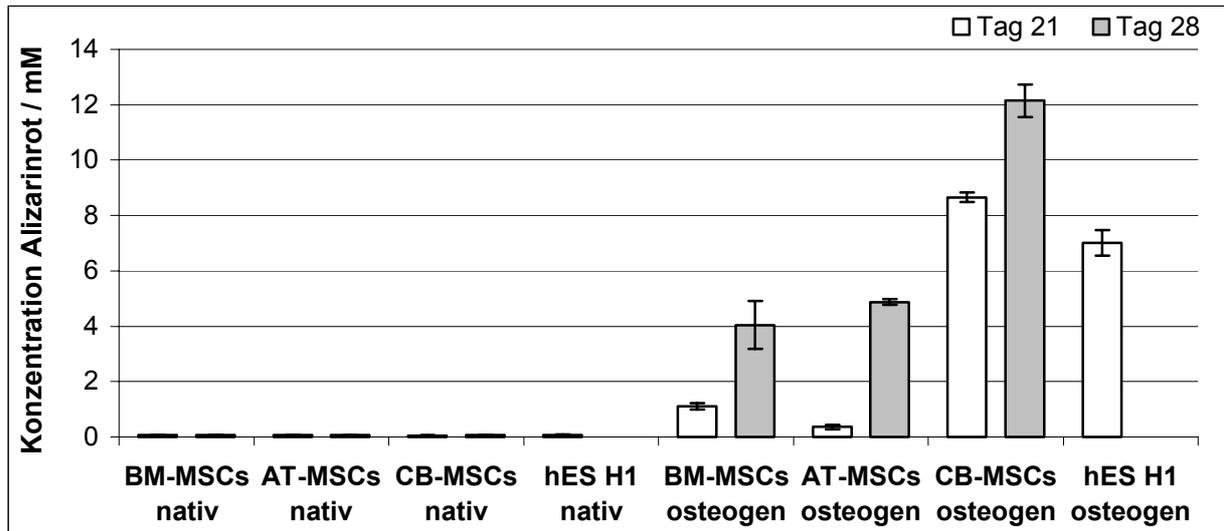


Abb. 37: Quantifizierung der Mineralisierung. Die Kalziumdeposition in den Stammzellkulturen (n = 3) wurde nach 21 Tagen bzw. 28 Tagen mit Alizarinrot gefärbt und die Konzentration als Maß für die Mineralisierung photometrisch bestimmt.

3.2 Etablierung eines trägerfreien 3D *in vitro* Modells für die osteogene Differenzierung

Für die osteogene Differenzierung der humanen Stammzellkulturen sollte ein trägerfreies 3D *in vitro* Modell etabliert werden. Zur Aggregation wurden unterschiedliche Kulturtechniken angewendet und modifiziert. Diese Arbeiten erfolgten exemplarisch an BM-MSCs. Ein geeignetes Kulturverfahren wurde ausgewählt und die osteogene Differenzierung der BM-MSCs, AT-MSCs, CB-MSCs und hES H1 in diesem 3D *in vitro* Modell untersucht.

3.2.1 Vergleich unterschiedlicher Kulturtechniken

Die Aggregation der BM-MSCs in unterschiedlichen Kultursystemen wurde im Phasenkontrast beurteilt und die Vitalität der Aggregate mittels FDA/Pi-Färbung bestimmt (**Abb. 38**). Die Effizienz der Aggregation, der prozentuale Anteil der formierten und kultivierten Aggregate im Verhältnis zur angesetzten Stückzahl (n), sowie die durchschnittliche Größe der Aggregate sind in **Tabelle 4** zusammengefasst.

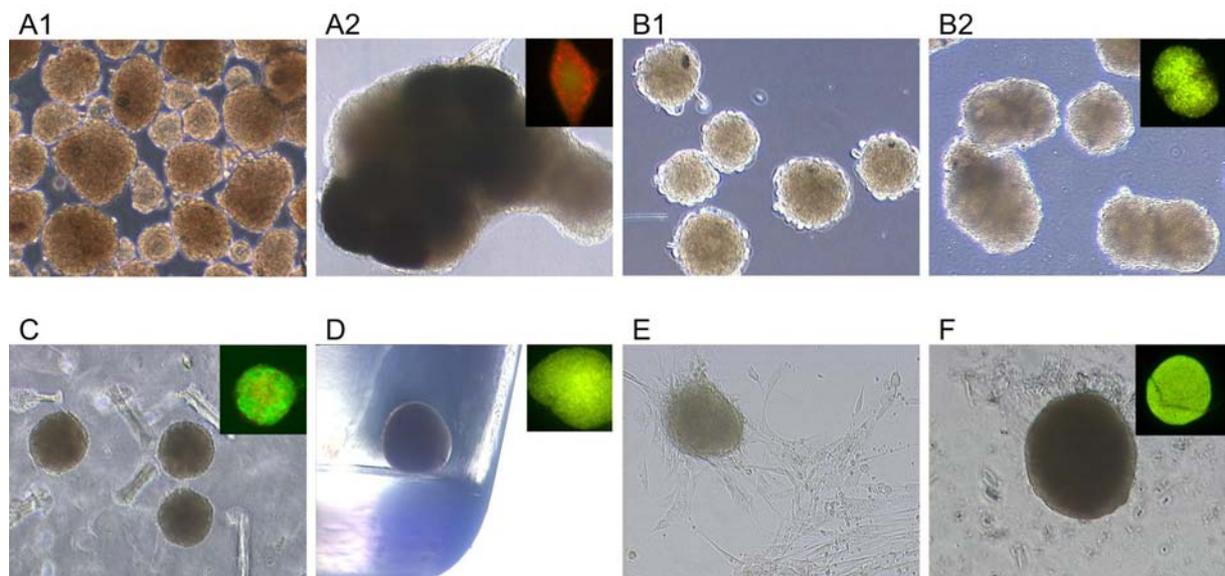


Abb. 38: Zellaggregation der BM-MSCs in unterschiedlichen Kultursystemen und Untersuchung der Vitalität mittels FDA/Pi-Färbung. Vitale Zellen wurden grün dargestellt, tote Zellen wurden rot markiert. A1) Zellaggregation nach 2 Tagen auf einer Rotationsplattform. A2) Ausbildung von multi-Aggregaten mit reduzierter Vitalität. B1) Zellaggregation im hängenden Tropfen und B2) Ausbildung von multi-Aggregaten 2 Tage nach Transfer in eine Rotationskultur sowie C) individuelle Aggregate 18 Tage nach Transfer in eine Gelkultur. D) Aggregation in 1,5 ml Reaktionsgefäßen aus Polypropylen. E) Aggregation in U-förmigen, nicht adhäsiven 96-well Kulturplatten ohne (F) und mit zusätzlicher Poly-HEMA-Beschichtung.

Die Kultivierung einer Zellsuspension in einer **Rotationskultur** für 2 - 3 Tage induzierte die Bildung von Aggregaten heterogener Größe (**Abb. 38A1**). Dieses System war aber nicht zur Langzeitkultivierung geeignet, da nach ca. 7 Tagen die Formation von multi-Aggregaten mit reduzierter Vitalität beobachtet wurde (**Abb. 38A2**). Nach Kultivierung einer Zellsuspension im hängenden Tropfen kam es zur Ausbildung sphärikaler Aggregate homogener Größe (**Abb. 38B1**), jedoch wurde nach Transfer in eine Rotationskultur zur Langzeitkultivierung

3. Ergebnisse

wieder die Ausbildung von multi-Aggregaten beobachtet. Zuerst bildeten sich Aggregate aus 2 - 3 Sphäroiden mit noch vitalen Zellen (**Abb. 38B2**), doch im weiteren Kulturverlauf kam es zur Ausbildung großer, nicht vitaler Massen. Da eine starke Ähnlichkeit mit den bereits gezeigten multi-Aggregaten in einer Rotationskultur bestand (**vgl. 38A2**), wurde auf eine Abbildung verzichtet. Sphäroide, die nach Aggregation im hängenden Tropfen in eine Gelkultur transferiert wurden, demonstrierten nach 18 Tagen in diesem Kulturformat eine hohe zelluläre Vitalität. Eine Ausbildung von multi-Aggregaten wurde nicht beobachtet (**Abb. 38C**).

Ein weiterer Ansatz zur Sphäroidaggregation war eine Kultivierung in individuellen Kulturgefäßen. In 15 ml Reaktionsgefäßen und 1,5 ml Reaktionsgefäßen (**Abb. 38D**) aus Polypropylene kam es zur Formation eines Aggregates pro Kulturgefäß, die nach 21 Tagen Kultivierungszeit noch vital waren. Des Weiteren wurde eine Zellaggregation in U-förmigen, nicht adhäsiven 96-well Zellkulturplatten getestet. Während in diesen kommerziell erhältlichen Kulturplatten eine unvollständige Aggregation mit zellulärer Adhärenz an dem Kulturgefäß beobachtet wurde (**Abb. 38E**), kam es nach zusätzlicher Poly-HEMA Beschichtung (**Abb. 38F**) zur Formation sphärikaler Aggregate (Sphäroide), die nach 21 Tagen in Kultur eine hohe zelluläre Vitalität aufwiesen.

Die durchschnittliche Größe der Aggregate korrespondierte mit der eingesäten Zellzahl, die sich an dem Volumen des Reaktionsgefäßes orientierte (**Tab. 4**). Insgesamt wurde bei Techniken mit einer Zellaggregation im hängenden Tropfen effektiv eine geringe Formationseffizienz von ca. 46% beobachtet. Dieser geringe Prozentsatz drückt den Verlust an Sphäroiden beim Transfer in eine Rotationskultur oder in eine Gelkultur zur Langzeitkultivierung aus. Bei einer Aggregation und nachfolgenden Kultivierung in individuellen Kulturgefäßen wurde nur ein geringer Verlust infolge der Medienwechsel verzeichnet, so dass die Effizienz bei über 80% lag.

Tab. 4: Aggregation der BM-MSCs in unterschiedlichen Kulturformaten. Die Effizienz der Aggregation definiert den prozentualen Anteil der formierten und kultivierten Aggregate im Verhältnis zur angesetzten Stückzahl (n). Gegeben sind die eingesäte Zellzahl pro Aggregat sowie die resultierende durchschnittliche Größe ± Standardabweichung nach osteogener Induktion bzw. nach Kultivierung in MSC-Kulturmedium als Kontrolle.

	n	Effizienz der Aggregation	Zellen per Aggregat	Durchmesser Kontrollen	Durchmesser osteogen
Rotationskultur	-	-	statistische Verteilung	statistisch/ multi-Aggregation	statistisch/ multi-Aggregation
Kultivierung im hängenden Tropfen/ Rotationskultur	160	46%	5.000	statistisch/ multi-Aggregation	statistisch/ multi-Aggregation
Kultivierung im hängenden Tropfen/ Gelkultur	388	45%	5.000	159 µm ± 19 µm	171 µm ± 28 µm
Kultivierung in 1,5 ml Reaktionsgefäßen	20	90%	20.000	323 µm ± 29 µm	360 µm ± 56 µm
Kultivierung in 15 ml Reaktionsgefäßen	6	83%	200.000	1 - 2 mm	1 - 2 mm
Kultivierung in U- förmigen 96-well Platten	96	95%	11.000	200 µm ± 18 µm	231 µm ± 26 µm

3.2.2 Größenentwicklung und metabolische Aktivität

Nach Bestimmung der jeweiligen Sphäroidgröße wurde die metabolische Aktivität der Sphäroide mittels WST-1-Test ermittelt (n = 8). Es wurden jeweils 20.000 Zellen pro Aggregat eingesät. Untersucht wurde der durchschnittliche Durchmesser der Sphäroide in μm und die korrelierende metabolische Aktivität. Die metabolische Aktivität der Sphäroide wurde in Prozent dargestellt, bezogen auf den initialen Wert der jeweiligen Kontrolle am Tag 1 (**Abb. 39**). Basierend auf diesen Daten wurde die metabolische Aktivität pro μm (normierte metabolische Aktivität) als Maß für proliferative Prozesse ermittelt. Die Normierung erfolgte anhand der Sphäroidgröße, da eine Zellzahlbestimmung an individuellen Sphäroiden im Kulturverlauf nicht zu realisieren war.

Die Sphäroidgröße und die metabolische Aktivität der adulten Stammzellsphäroide präsentierten tendenziell dieselbe Entwicklung im Kulturverlauf, auch wenn im direkten Vergleich die BM-MSCs hinsichtlich ihrer insgesamt geringeren Größe und höheren metabolischen Aktivität auffielen. Nach erfolgter Aggregation und Ausbildung kompakter Sphäroide wurde eine kontinuierliche Kondensation der Sphäroide im Kulturverlauf beobachtet. Der durchschnittliche Durchmesser der MSC-basierten Sphäroide reduzierte sich auf 69% - 57% der initialen Größe. Die korrelierende metabolische Aktivität demonstriert ebenfalls einen starken Abfall im Kulturverlauf, welcher bei den nativen Kontrollsphäroiden ausgeprägter war (20% - 40%) als bei den osteogen stimulierten Sphäroiden (30% - 60%). Die Erhöhung des Zellmetabolismus infolge des osteogenen Entwicklungsprozesses wurde nach Normierung auf die Sphäroidgröße dargestellt.

In den hES H1-basierten Sphäroiden wurde eine gegenläufige Entwicklung der metabolischen Aktivität demonstriert. Zwar waren die Initialwerte hoch, doch nach 6 Tagen reduzierte sich die metabolische Aktivität auf unter 30% des Ausgangswertes und zeigte eine positive Tendenz im weiteren Kulturverlauf. Dieser Anstieg der metabolischen Aktivität während der Kultivierung wurde ebenfalls nach Normierung auf die Sphäroidgröße verzeichnet. Insgesamt waren die hES H1-Sphäroide kleiner als die adulten Stammzellsphäroide.

3. Ergebnisse

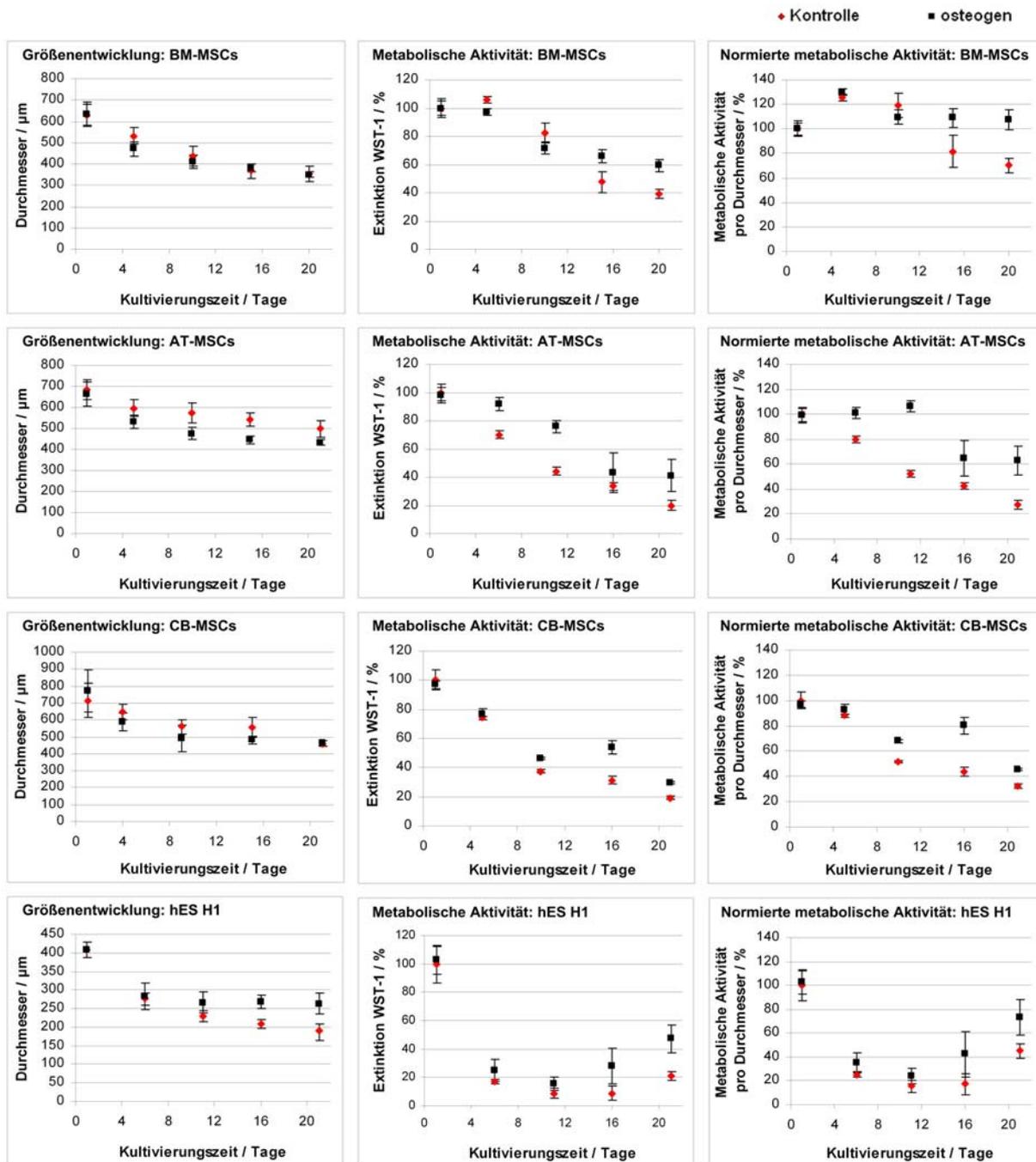


Abb. 39: Größenentwicklung der MSC- und hES H1-basierten Sphäroide im Kulturverlauf und korrelierende metabolische Aktivität. Untersucht wurde der durchschnittliche Durchmesser in µm und die metabolische Aktivität mittels WST-1-Test (osteogene Sphäroide: schwarz, native Sphäroide: rot). Die metabolische Aktivität wurde in % von dem initialen Wert der Kontrolle sowie normiert auf die Sphäroidgröße dargestellt.

3.2.3 Osteogene Differenzierung der Sphäroide

Der Prozess der osteogenen Differenzierung wurde in MSC-basierten Sphäroiden (**Abb. 40**) und in hES H1-basierten Sphäroiden (**Abb. 41**) untersucht. Eine qualitative Beurteilung der Expression der osteoblastentypischen Marker ALP, Kalzifizierung und Kollagen-1 erfolgte anhand von Kryoschnitten.

3.2 Etablierung eines trägerfreien 3D in vitro Modells für die osteogene Differenzierung

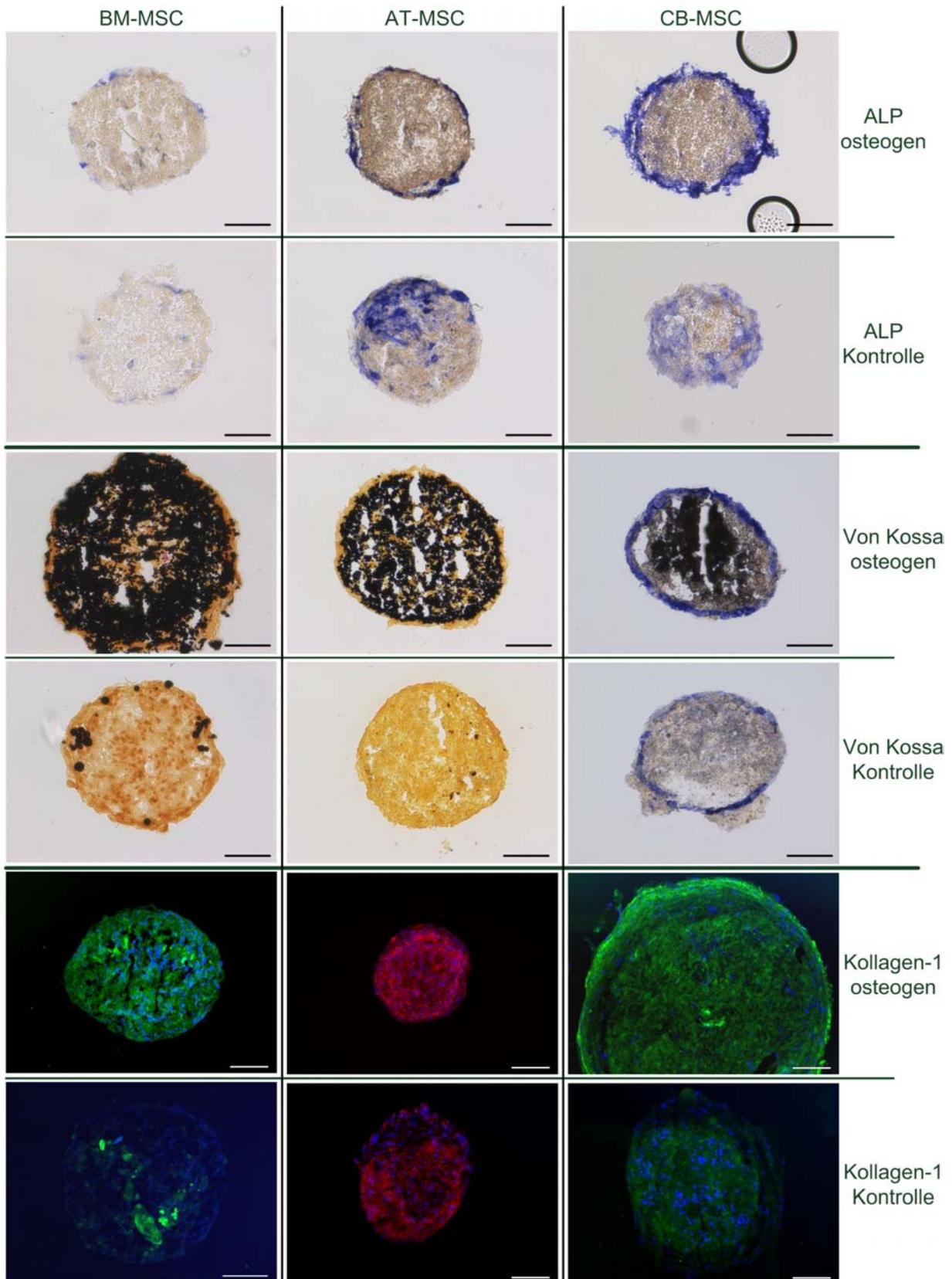


Abb. 40: Osteogene Differenzierung in BM-MSC-, AT-MSC- und CB-MSC-basierten Sphäroiden. Untersucht wurden die Expression der ALP (blau) und die korrespondierende Kalziumdeposition (schwarz) am Tag 22 - 24. Die Kollagen-1-Expression (grün bzw. rot) wurde am Tag 16 - 18 bestimmt. Balken = 100 µm.

3. Ergebnisse

In allen MSC-basierten Sphäroidkulturen wurde nach einer Stimulationsperiode von 22 - 24 Tagen die Deposition von extrazellulärem Kalzium demonstriert. Die histologischen Daten des ALP-Nachweises zeigten keine einheitliche Induktion der ALP (**Abb. 40**). So waren die BM-MSC-Sphäroide negativ für diesen Marker, während AT-MSC-Sphäroide und CB-MSC-Sphäroide positiv waren. Dabei wurde prinzipiell eine ringförmige Distribution in den osteogenen Sphäroiden beobachtet, aber auch die nativen Sphäroide demonstrierten eine unterschiedlich ausgeprägte Grundaktivität.

Eine Expression von Kollagen-1 war in stark kalzifizierten Sphäroiden immunhistologisch nicht zu detektieren. Exemplarisch sind histologische Färbungen eines nicht so weit fortgeschrittenen Differenzierungsstadiums (16 - 18 Tage) abgebildet (**Abb. 40**). In den MSC-basierten Sphäroiden wurde eine hohe Expression kollagenhaltiger ECM nachgewiesen, allerdings wurde eine Grundexpression dieses Strukturproteins ebenfalls in den nativen Aggregaten demonstriert. Da diese Daten in unabhängigen Experimenten erhoben wurden, variiert die Größe der Schnitte im Vergleich zu den ALP- und von Kossa-Färbungen.

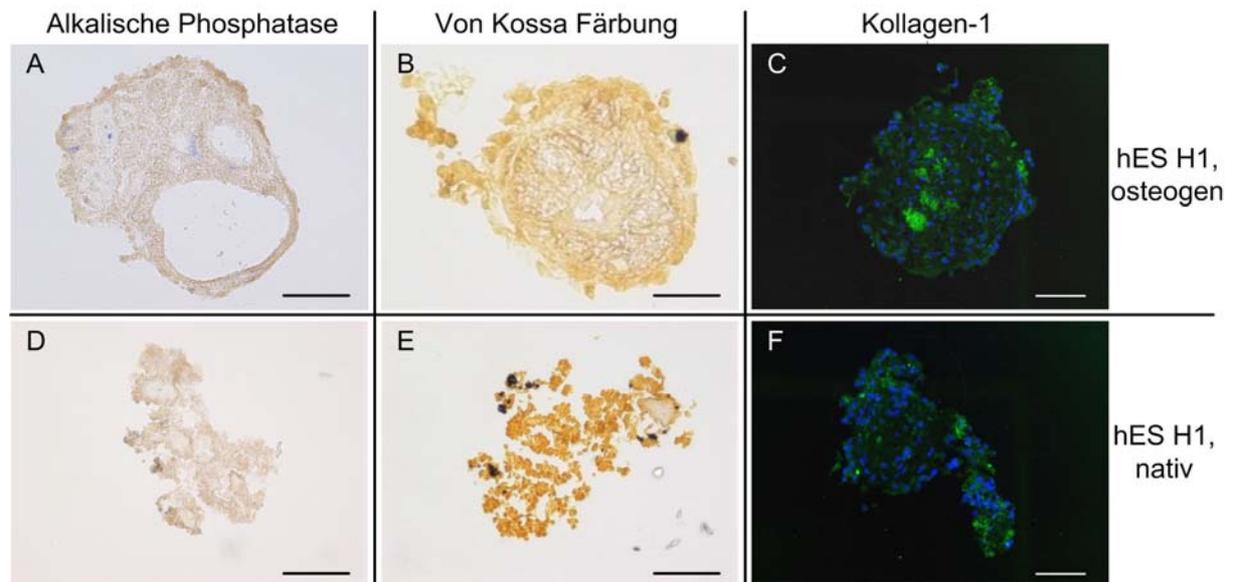


Abb. 41: Untersuchung der osteogenen Differenzierung in hES H1-basierten Sphäroiden nach 30 Tagen. In den Sphäroiden wurde keine Induktion der ALP (blau markiert; A: osteogen, D: Kontrolle), keine Mineralisierung mittels von Kossa-Färbung (schwarz; B: osteogen, E: Kontrolle) und nur eine geringfügige Kollagen-1-Expression (grün; C: osteogen, F: Kontrolle) nachgewiesen. Balken = 100 μ m.

Im Gegensatz zu den MSC-basierten Aggregaten wurde in den hES H1-Sphäroiden keine ALP-Aktivität und Kalzifizierung nachgewiesen (**Abb. 41**). Die histologische Beurteilung zeigte auch nur eine geringe Expression von Kollagen-1. Insgesamt war die Zelldistribution nicht homogen, die Schnitte wiesen zellfreie Bereiche auf. hES H1-Sphäroide, die ohne osteogene Faktoren kultiviert wurden, bestanden aus einem losen Zellverbund. Zum Vergleich wurde die ALP- und Kollagen-1-Expression sowie die Mineralisierung in EBs untersucht (**Abb. 42**). In den EBs wurde keine spontane Induktion dieser osteogenen Marker

3.2 Etablierung eines trägerfreien 3D in vitro Modells für die osteogene Differenzierung

präsentiert, die histologischen Schnitte wiesen eine ausgeprägte inhomogene Zelldistribution auf.

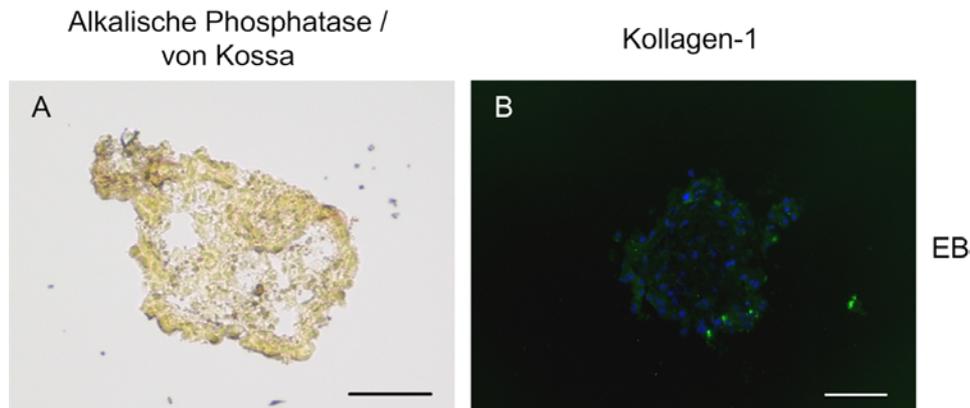


Abb. 42: Histologische Schnitte von *embryoid bodies* (EB). A) Kombinierte ALP- (rot) und von Kossa-Färbung (schwarz). Beide Marker waren negativ. B) Kombinierte Kollagen-1-Immunfärbung (grün) und DAPI-Kernfärbung (blau). Balken = 200 μ m.

3.2.4. Quantifizierung der Expression osteoblastentypischer Gene

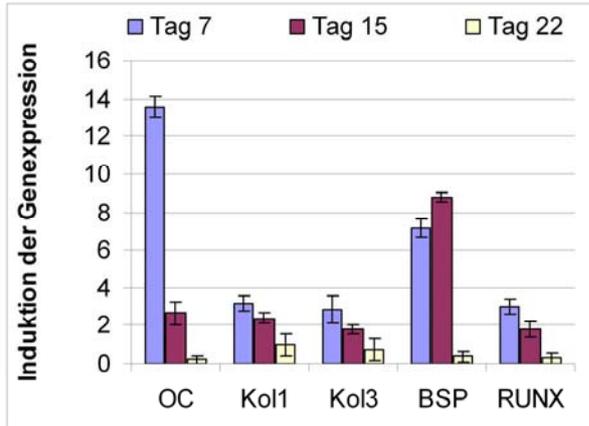
Eine Quantifizierung der mRNA-Expression verschiedener osteoblastentypischer Gene erfolgte kulturbegleitend am Tag 7, Tag 15 und Tag 22 mittels *real time* PCR. Eine interne Normalisierung erfolgte gegen die Expression des *housekeeper*-Gens β -Tubulin. Untersucht wurde eine Regulation der Gene nach osteogener Induktion im Verhältnis zur Expression in den Kontrollaggregaten (n-fach Expression). Als positive Regulation wurde eine n-fache Induktion der Genexpression von mind. 1 gewertet, was einer Verdoppelung der mRNA-Expression entspricht.

Die Untersuchung erfolgte an den zuvor impedanzspektroskopisch charakterisierten Stammzellsphäroiden (vgl. **Abschnitt 3.3.4 - 3.3.6**). Das Markerprofil der untersuchten Stammzellsphäroide (**Abb. 43**) demonstrierte eine Konvergenz zu den histologischen Befunden (vgl. **Abschnitt 3.3.10, Abb. 67 - 70**). Sphäroide, in denen die Knochenformation mittels von Kossa-Färbung nachgewiesen wurde, zeigten auch eine positive Regulation der untersuchten osteoblastentypischen Gene (BM-MSCs und AT-MSCs der Charge 2). In Sphäroiden, die diesen finalen Entwicklungsschritt zu funktionalen Osteoblasten auch nach 32 Tagen nicht vollzogen hatten (AT-MSCs der Charge 3), wurde keine Induktion der Genexpression nachgewiesen.

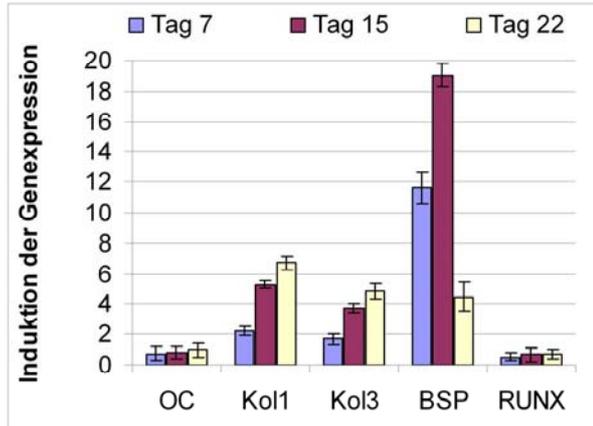
In allen untersuchten osteogen differenzierten Stammzellpopulationen wurde eine starke Expression von *bone sialoprotein 2* (BSP) detektiert, insgesamt war aber das Markerprofil nicht kohärent. In BM-MSCs wurde Osteocalcin (OC) stark exprimiert und eine initial erhöhte Expression von Kollagen-1 (Kol-1), Kollagen-2 (Kol-2) und RUNX2 (RUNX) detektiert. Im Vergleich zu den BM-MSCs wurden in den AT-MSCs die Expression von Kollagen-1 und Kollagen-3 stärker indiziert, aber nicht die Expression von RUNX2. In hES H1 waren die vergleichsweise starke Genexpression des Transkriptionsfaktors RUNX2 sowie die fehlende Expression von Kollagen-1 und Kollagen-3 auffällig.

3. Ergebnisse

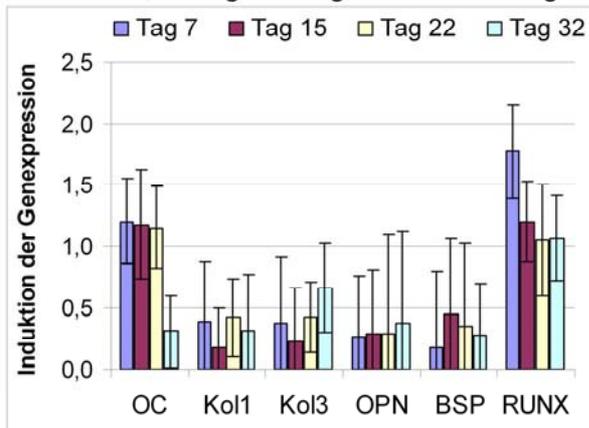
BM-MSCs



AT-MSCs, Charge 2: pos. Differenzierung



AT-MSCs, Charge 3: neg. Differenzierung



hES H1

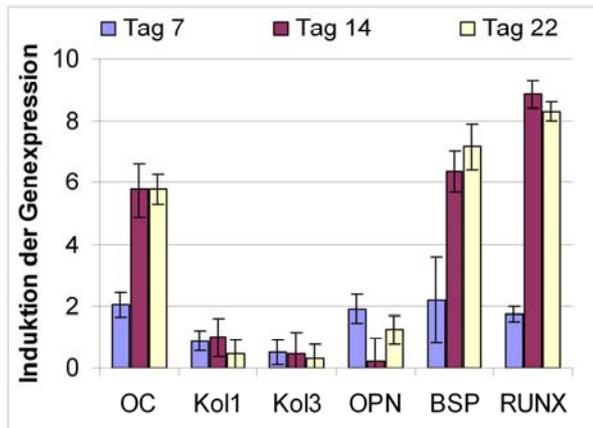


Abb. 43: *Real time* PCR der Regulation osteoblastentypischer Gene in den stammzellbasierten Sphäroiden nach osteogener Stimulation. Dargestellt ist eine n-fache Induktion der Genexpression im Verhältnis zu den jeweiligen nativen Kontrollsphäroiden.

3.3 Impedanzspektroskopische Charakterisierung der osteogenen Differenzierung in 3D

Im folgenden Abschnitt wurde untersucht, ob Impedanzspektroskopie geeignet ist, um den Prozess der osteogenen Differenzierung in den stammzellbasierten Sphäroiden zu messen. Charakteristische Änderungen in den Impedanzspektren sollten identifiziert und ein beschreibender Parameter bestimmt werden. Anhand eines elektrischen Gewebemodells wurden die für die Impedanzänderungen relevanten Gewebestrukturparameter untersucht. Um die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der verschiedenen Messreihen zu evaluieren, wurde der Einfluss der Medienimpedanz, die Sphäroidgröße und die Positionierung innerhalb der Kapillare untersucht.

3.3.1 Programm zur Auswertung der Impedanzspektren

Zur Auswertung der gemessenen Impedanzspektren wurde ein LabVIEW-basiertes Programm erstellt. Dieses ermöglichte die Anzeige und Gruppierung der individuellen Messungen. Dabei erfolgte jeweils eine Gruppierung der nativen Kontrollsphäroide bzw. der osteogenen Sphäroide des jeweiligen Messzeitpunktes (Tag 7, Tag 14 und Tag 21). Die Datenausgabe erfolgte sowohl im Argand-Diagramm als auch im Bode-Diagramm (**Abb. 44**). Für jede Messgruppe wurden die Mittelwerte und die Standardabweichung bestimmt und als Graphikdatei oder als ASCII-Datei der Rohdaten gespeichert. Die Dokumentation der einzelnen Programmfunktionen ist ausführlich im **Anhang 7.2** aufgeführt.

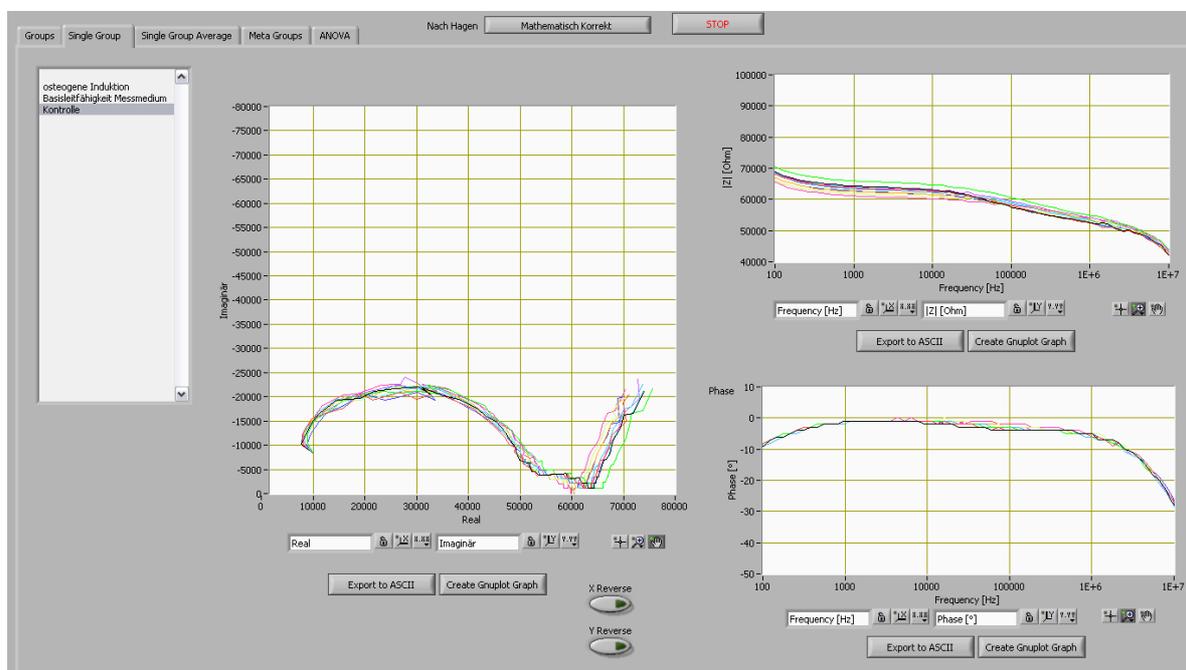


Abb. 44: Darstellung der Arbeitsoberfläche des LabVIEW-basierten Auswertungsprogramms. Exemplarisch wurde die Anzeige und Gruppierung individueller Messungen der nativen BM-MS-C-Sphäroide am Tag 21 dargestellt. Die Daten wurden jeweils im Argand-Diagramm und im Bode-Diagramm ausgegeben.

3.3.2 Evaluierung zufälliger Einflüsse auf die Impedanzmessung

Leitfähigkeitsschwankungen des Kulturmediums

Um die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der verschiedenen Messreihen zu untersuchen, wurden die Impedanzspektren des MSC-Kulturmediums, in dem die Messungen erfolgten (Basislinie Medium), in vier unabhängigen Messreihen bestimmt. Dabei wurden unterschiedliche Chargen des MSC-Kulturmediums verwendet. Es zeigte sich, dass die Leitfähigkeit des MSC-Kulturmediums an unterschiedlichen Messtagen stark variierte (**Abb. 45**). Dabei wurden Varianzen im Betrag der Impedanz $|Z|$ demonstriert, aber nicht im Phasengang φ . Der Betrag der Impedanz des MSC-Kulturmediums verschiedener Messreihen im Frequenzbereich von $10^3 - 10^6$ Hz lag zwischen 48 kOhm und 56 kOhm. Diese absolute Abweichung von ca. 15% im Betrag der Impedanz $|Z|$ ist bei einem Vergleich verschiedener Messreihen zu berücksichtigen und schlägt sich ebenfalls im Durchmesser der Ortskurve im Argand-Diagramm nieder.

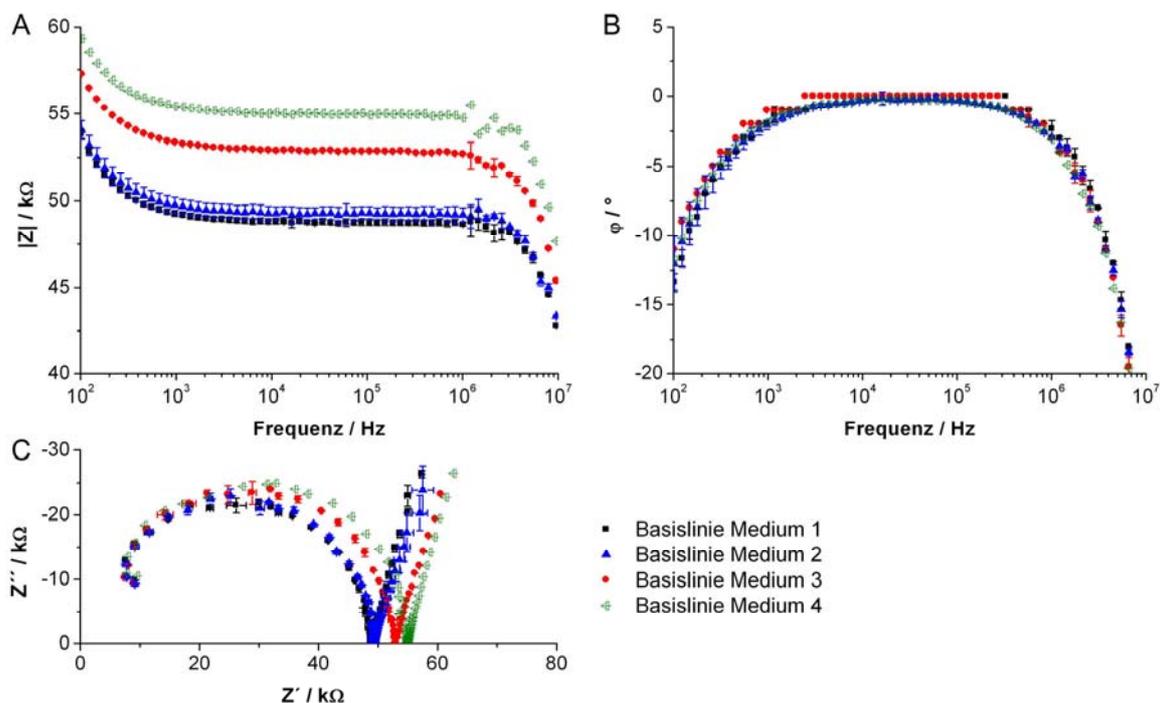


Abb. 45.: Einfluss des MSC-Kulturmediums auf die gemessenen Impedanzspektren. Es wurden die Impedanzen unterschiedlicher Chargen über einen Zeitraum von 2 h ermittelt. Dargestellt wurden jeweils die Mittelwerte ($n = 3$) sowie die Standardabweichung von vier unabhängigen Messreihen. A) Bode-Diagramm des Betrags der Impedanz $|Z|$ über einen Frequenzbereich von 100 Hz - 10 MHz, B) korrelierender Phasenwinkel φ und C) Argand-Diagramm des Imaginärteils Z'' gegen den Realteil Z' . Während der Betrag der Impedanz eines Messtages relativ konstant war (max. 3% Standardabweichung), variierte der Betrag der Impedanz $|Z|$ verschiedener Versuchstage um bis zu 15% und infolge dessen ebenfalls der Durchmesser der Ortskurve im Argand-Diagramm. Demgegenüber wurde der Verlauf des Phasenwinkels nicht beeinflusst.

Reproduzierbarkeit der Positionierung

Um die Reproduzierbarkeit der Impedanzspektren zu ermitteln, wurden vier zufällig ausgewählte MSC-basierte Sphäroide unter visueller Kontrolle jeweils dreimal an derselben Position in der Kapillare vermessen. Dargestellt wurden der Mittelwert und die durchschnittliche Standardabweichung der gemessenen Impedanzen im Bode- und Argand-Diagramm sowie die Sphäroidgröße in μm (**Abb. 46**). Im Betrag der Impedanz $|Z|$ betrug die maximale Standardabweichung ca. 9% und im korrelierenden Phasenwinkels φ ca. 5%. Nur bei einem Sphäroid (Sphäroid 2 mit einem Durchmesser von 357 μm) wurde bei identischer Positionierung eine Standardabweichung von 22% im Phasenwinkel gemessen.

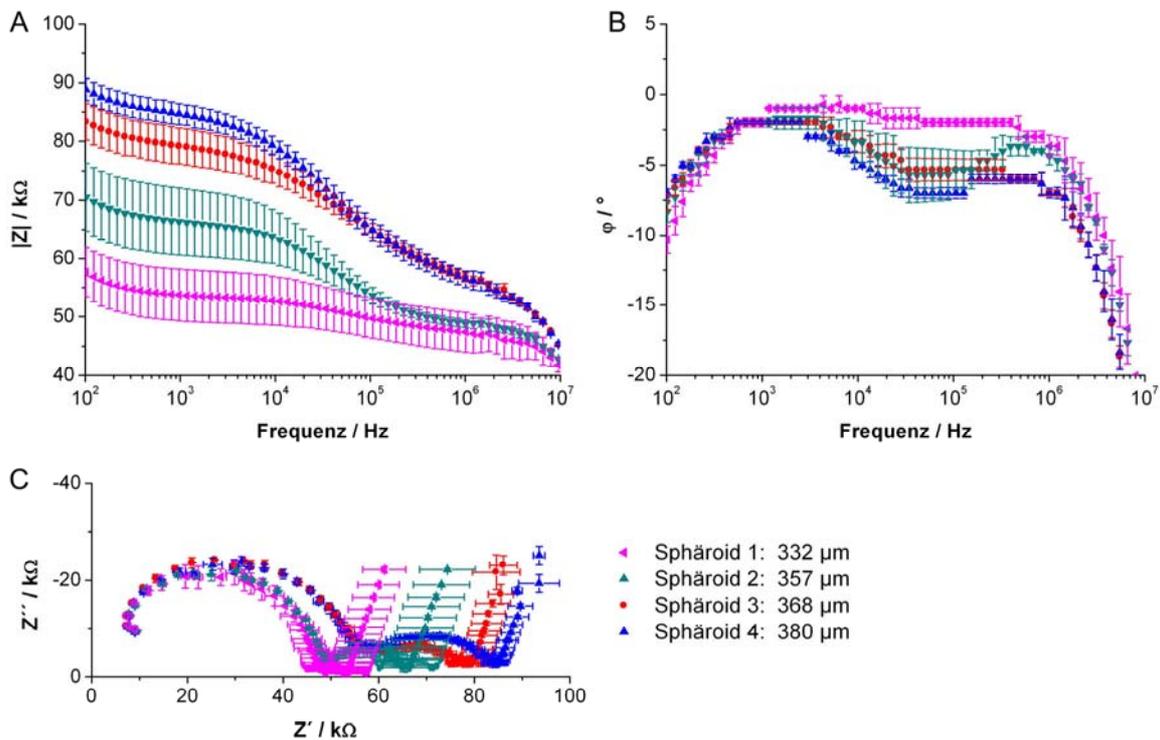


Abb. 46: Reproduzierbarkeit der Sphäroidmessungen. Vier zufällig ausgesuchte MSC-basierte Sphäroide wurden dreimal an der gleichen Position in der Kapillare vermessen. Dargestellt wurden A) der Betrag der Impedanz $|Z|$ über einen Frequenzbereich von 100 Hz - 10 MHz, B) der korrelierende Phasenwinkel φ und C) Argand-Diagramm des Imaginärteils Z'' gegen den Realteil Z' .

3.3.3 Einfluss der Sphäroidgröße auf die Impedanzmessung

Auch wenn die durchschnittliche Sphäroidgröße eines Ansatzes eine Standardabweichung von max. 10% aufwies (vgl. **Abschnitt 3.3.4 – 3.3.6, Tab. 5 - 8 und Abschnitt 3.2.2, Abb. 39**), war es insgesamt nicht möglich stammzellbasierte Sphäroide reproduzierbarer Größe zu generieren. Dies lag zum einen an unsystematischen Varianzen der Zellmorphologie unterschiedlicher Zellchargen, worauf mit einer Anpassung der eingesetzten Zellzahl pro Aggregat (17.000 - 25.000 Zellen/Aggregat) reagiert wurde. Des Weiteren beeinflusste die Kulturdauer sowie das Zellkulturmedium, MSC-Kulturmedium bzw. osteogenes Differenzierungsmedium, die Sphäroidgröße tendenziell. Zudem war trotz größtmöglicher Akkuratessse eine identische Positionierung an verschiedenen Messtagen nicht zu gewährleisten.

Daraus ergab sich für die Impedanzcharakterisierung der Aggregate folgendes:

1. Aggregate unterschiedlicher Größe wurden an derselben Kapillarposition vermessen. Dies beeinflusste die Kompression der Aggregate innerhalb der Kapillare.
2. Aufgrund der Größenunterschiede war teilweise keine vergleichbare Positionierung möglich.

Größen- und Kompressionsabhängigkeit

Die Impedanzspektren von parallelen, unter identischen Bedingungen kultivierten MSC-basierten Sphäroiden wurden am Kulturtag 23 ermittelt. Untersucht wurde jeweils eine Gruppe mit je 20.000 Zellen pro Sphäroid und eine Gruppe mit je 25.000 Zellen pro Sphäroid (jeweils $n = 20$). Beide Gruppen wurden am Kulturtag 23 an identischer Position in der Kapillarmitte gemessen. Der durchschnittliche Durchmesser \pm Standardabweichung betrug für die Gruppe mit 20.000 Zellen pro Sphäroid $370 \mu\text{m} \pm 14 \mu\text{m}$ und für die Gruppe mit 25.000 Zellen pro Sphäroid $451 \mu\text{m} \pm 25 \mu\text{m}$.

Im Vergleich zu den größeren Sphäroiden demonstrierten die kleineren Sphäroide insgesamt geringere Werte im Betrag der Impedanz $|Z|$ verbunden mit einer höheren Standardabweichung (**Abb. 47A**). Demgegenüber wurde im Phasenwinkel φ zwar eine größere Standardabweichung in der Gruppe der kleineren Sphäroide detektiert, aber es wurden keine größenabhängige Änderungen im Verlauf oder der Stärke der gemessenen Dispersion gezeigt (**Abb. 47B**). Die unterschiedlich großen Sphäroide demonstrierten im Argand-Diagramm den gleichen Impedanzverlauf. Die Ortskurve beschrieb neben einem einfachen Halbkreis einen weiteren nicht idealen Kreisbogen (**Abb. 47C**).

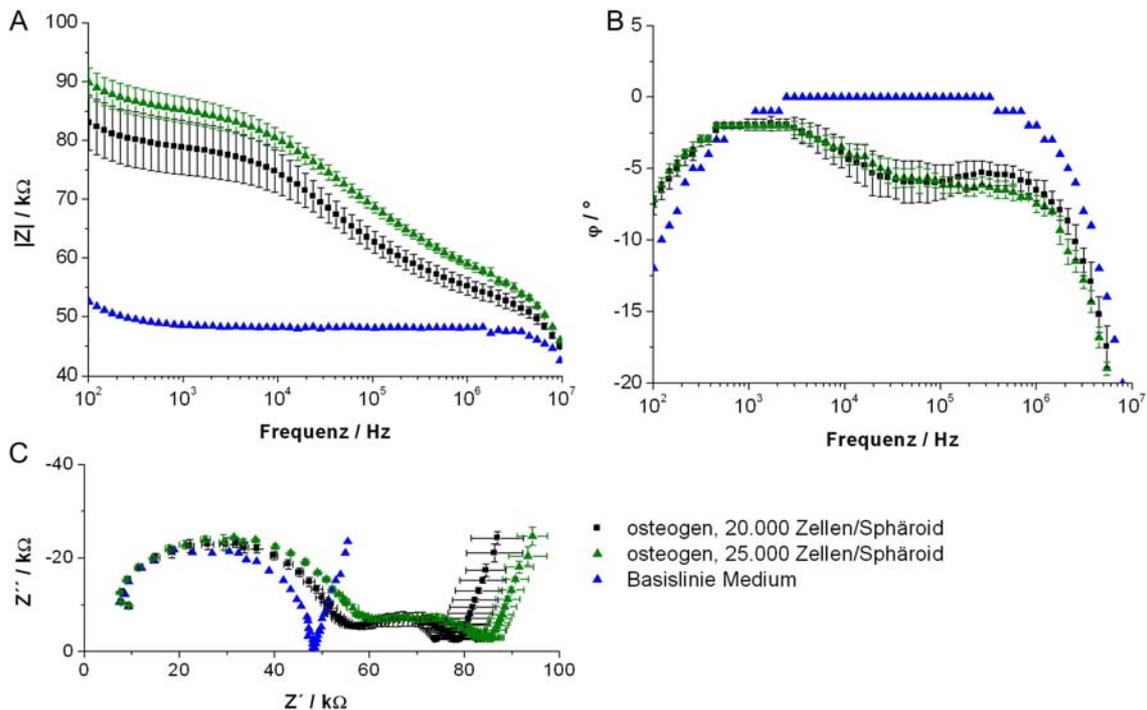


Abb. 47: Größenabhängigkeit der Impedanz. Dargestellt sind die Impedanzen von zwei Gruppen ($n = 20$) osteogener Sphäroide am Kulturtag 23 im Bode- (A und B) und im Argand-Diagramm (C). Die Gruppe mit 20.000 Zellen pro Sphäroid hatte einen durchschnittlichen Durchmesser von $370 \mu\text{m} \pm 14 \mu\text{m}$, während die Gruppe mit 25.000 Zellen pro Sphäroid einen durchschnittlichen Durchmesser von $451 \mu\text{m} \pm 25 \mu\text{m}$ aufwies. Die Impedanzspektren der Sphäroide wurden an derselben Messposition ermittelt.

Größen- und Positionsabhängigkeit der Impedanz

Untersucht wurden die Impedanzspektren von zwei parallel kultivierten Sphäroidgruppen ($n = 20$) mit 20.000 Zellen pro Sphäroid und mit 25.000 Zellen pro Sphäroid am Kulturtag 23. Der durchschnittliche Durchmesser \pm Standardabweichung betrug für die Gruppe mit 20.000 pro Sphäroid $503 \mu\text{m} \pm 29 \mu\text{m}$ und für die Gruppe mit 25.000 Zellen pro Sphäroid $549 \mu\text{m} \pm 30 \mu\text{m}$. Aufgrund der großen Dimension der Gruppe mit 25.000 Zellen pro Sphäroid war eine Positionierung in der Kapillarmitte nicht möglich. Diese Sphäroide wurden im konisch erweiterten Teil der Kapillare vermessen.

Die Sphäroide, die oberhalb der mittleren Position vermessen wurden, demonstrierten einen geringeren Betrag der Impedanz $|Z|$, obwohl sie größer waren. Demgegenüber zeigten die vergleichsweise kleineren Sphäroide, die in der mittleren Position messbar waren, einen höheren Betrag der Impedanz (**Abb. 48A**). Der Betrag der Impedanz ist folglich von der Position und der daraus resultierenden unterschiedlichen Kompression abhängig. Der Zusammenhang, dass eine Zunahme der Sphäroidgröße bei identischer Positionierung zu höheren Werten im Betrag der Impedanz führte, wurde bereits demonstriert (**vgl. Abb. 48**). Im Gegensatz zum Betrag der Impedanz wurden der Phasenwinkel sowie der Kurvenverlauf des Argand-Diagramms nicht beeinflusst. Beide Sphäroidgruppen zeigten oberhalb von 10^4 Hz einen Abfall von etwa 3° im Phasenwinkel φ (**Abb. 48B**), während der Kurvenverlauf

3. Ergebnisse

des Argand-Diagramms neben einem Halbkreis ein schwach ausgeprägtes zweites Dispersionsgebiet zeigte (**Abb. 48C**).

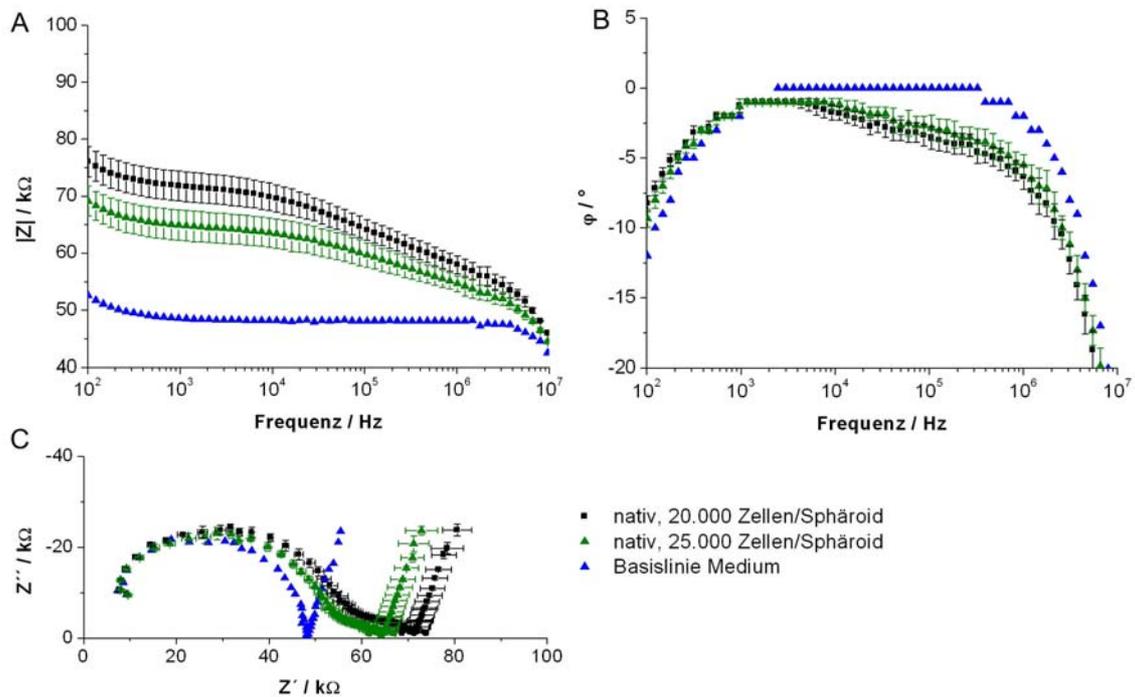


Abb. 48: Positionsabhängigkeit der Impedanz. Dargestellt sind die Impedanzen von zwei Gruppen ($n = 20$) nativer Sphäroide am Kulturtag 23 im Bode- (A und B) und im Argand-Diagramm (C). Die Gruppe mit 20.000 Zellen pro Sphäroid hatte einen Durchmesser von $503 \mu\text{m} \pm 29 \mu\text{m}$ und wurde in der Kapillarmitte vermessen. Bei der Gruppe mit 25.000 Zellen pro Sphäroid und einem resultierenden größeren Durchmesser von $549 \mu\text{m} \pm 30 \mu\text{m}$ war eine Positionierung in der Kapillarmitte nicht mehr möglich. Die Messung erfolgte oberhalb der Kapillarmitte.

3.3.4 Impedanzspektren der BM-MSC-basierten Sphäroide

BM-MSC-basierte Sphäroide der Passage 8 wurden unter osteogenen Bedingungen bzw. mit MSC-Kulturmedium kultiviert. Nach 7 Tagen, 14 Tagen und 21 Tagen wurden jeweils 20 Sphäroide pro Kulturbedingung (osteogene Sphäroide = osteogen stimulierte Sphäroide; native Sphäroide = Sphäroide kultiviert mit MSC-Kulturmedium als native Kontrolle) impedanzspektroskopisch vermessen. Der durchschnittliche Durchmesser der BM-MSC-basierten Sphäroide mit 17.500 Zellen/Aggregat ist in **Tabelle 5** aufgeführt. Aufgrund der Größenunterschiede wurden die Sphäroide bei der Positionierung in der Kapillarmitte unterschiedlich stark komprimiert. Am Tag 7 war aufgrund der Größe der Sphäroide eine Positionierung in der Kapillarmitte nicht möglich. Am Tag 21 waren die osteogenen Sphäroide nicht mehr komprimierbar, so dass diese Sphäroide und die jeweiligen Kontrollen ebenfalls im konisch erweiterten Teil vermessen wurden.

Tab. 5: Durchschnittlicher Durchmesser der BM-MSC-basierten Sphäroide \pm Standardabweichung.

	7 Tage	14 Tage	21 Tage
Osteogene Sphäroide	470 $\mu\text{m} \pm 22 \mu\text{m}$	428 $\mu\text{m} \pm 25 \mu\text{m}$	437 $\mu\text{m} \pm 23 \mu\text{m}$
Native Sphäroide	531 $\mu\text{m} \pm 29 \mu\text{m}$	477 $\mu\text{m} \pm 24 \mu\text{m}$	399 $\mu\text{m} \pm 21 \mu\text{m}$

Die Impedanzspektren der nativen und der osteogenen Sphäroide im Bode-Diagramm demonstrierten einen zu diskriminierenden Verlauf (**Abb. 49**). Im Frequenzbereich bis max. 10^5 Hz zeigten die osteogenen Sphäroide einen höheren Widerstand im Betrag der Impedanz $|Z|$ als die nativen Sphäroide. Dieses Verhältnis, ein insgesamt höherer Betrag der Impedanz infolge osteogener Differenzierung, wurde bei allen Messzeitpunkten beobachtet. Insgesamt sanken die gemessenen Beträge der Impedanz im Kulturverlauf konsekutiv zur insgesamt schrumpfenden Sphäroidgröße und der daraus folgenden verminderten Kompression. Die Reduktion der Sphäroidgröße betraf sowohl die osteogenen als auch die nativen Sphäroide, wobei die nativen Sphäroide insgesamt größer waren. Der Phasenwinkel φ der osteogenen Sphäroide demonstrierte im Vergleich zu den nativen Sphäroiden an allen Messtagen eine vergleichsweise stark ausgeprägte Dispersion im Frequenzbereich von 2×10^3 - 5×10^5 Hz. Nach 21 Tagen osteogener Differenzierung zeigte diese Dispersion einen s-förmigen Verlauf, während in den nativen Kontrollen ein gerader Abfall des Phasenwinkels gemessen wurde.

Im Argand-Diagramm (**Abb. 50**) demonstrierte die Ortskurve des Imaginärteils Z'' gegen den Realteil Z' in Folge einer Kultivierung mit löslichen osteogenen Differenzierungsfaktoren das Auftreten eines weiteren nicht idealen Kreisbogens. Dieses Dispersionsgebiet war in den nativen Sphäroiden nur schwach ausgeprägt und in dem Spektrum des Messmediums nicht vorhanden.

3. Ergebnisse

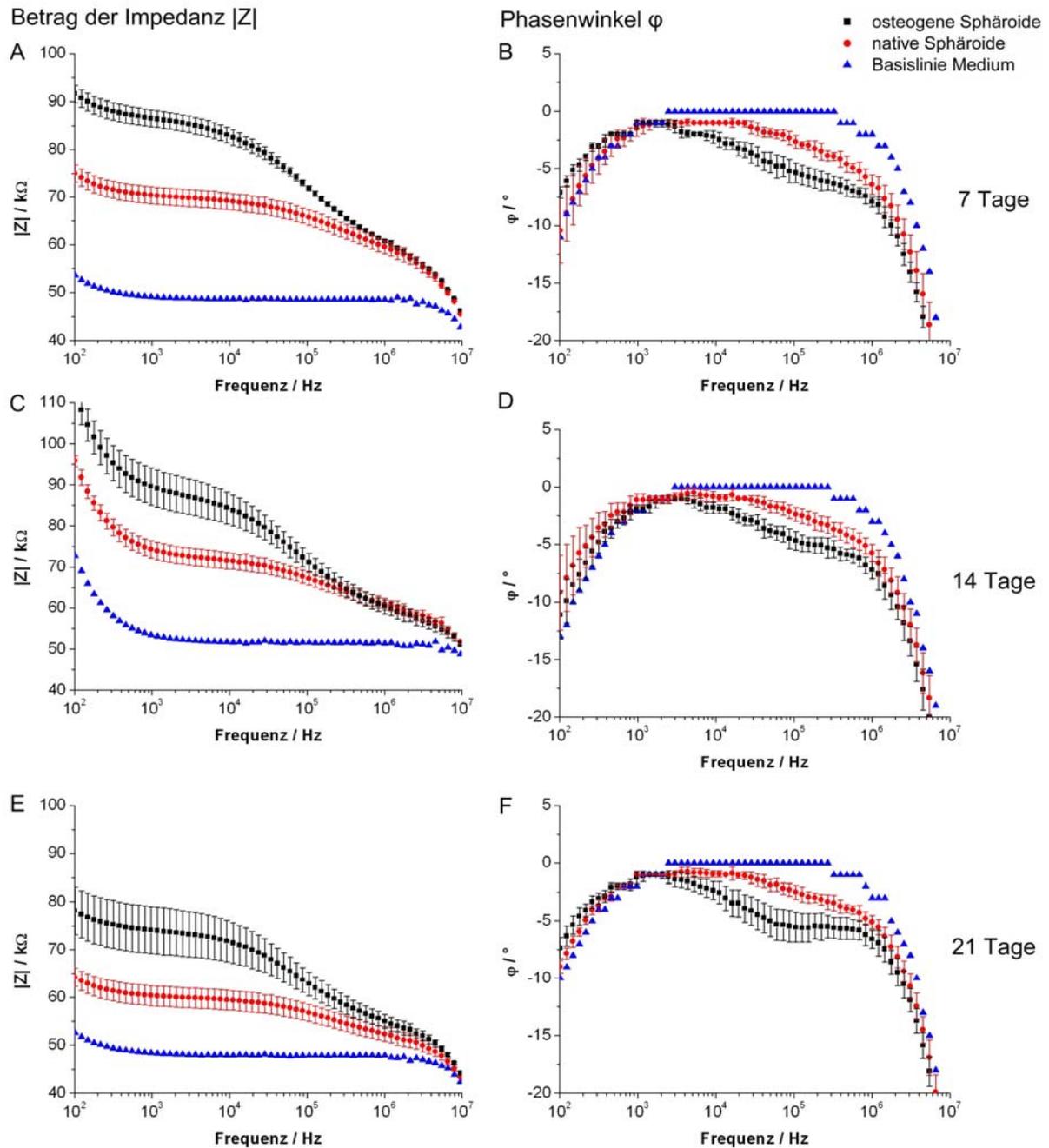


Abb. 49: Darstellung osteogener Prozesse in BM-MSC-basierten Sphäroiden im Bode-Diagramm. A) Betrag der Impedanz $|Z|$ und B) korrelierender Phasenwinkel ϕ nach 7 Tagen und analog nach 14 Tagen (C und D) und 21 Tagen (E und D). Bei allen Kulturzeitpunkten waren die osteogenen Sphäroide von den nativen Sphäroiden zu diskriminieren. Die osteogenen Sphäroide demonstrierten einen höheren Betrag der Impedanz sowie eine stärker ausgeprägte Dispersion im Phasengang.

3.3 Impedanzspektroskopische Charakterisierung der osteogenen Differenzierung in 3D

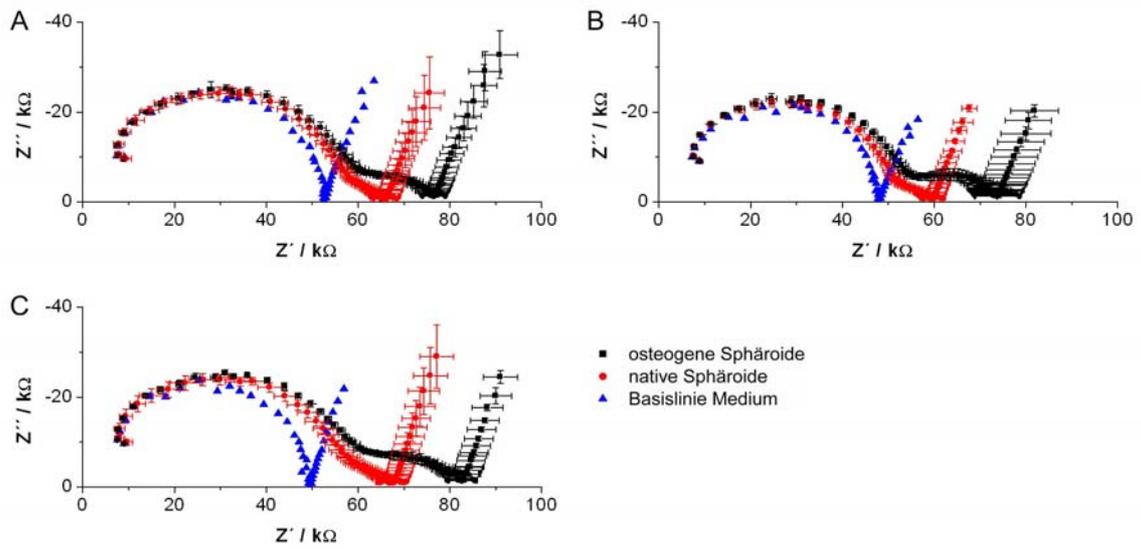


Abb. 50: Argand-Diagramm osteogener Prozesse in BM-MSK-basierten Sphäroiden nach A) 7 Tagen, B) 14 Tagen und C) 21 Tagen. Die jeweilige Ortskurve des Imaginärteils Z'' aufgetragen gegen den Realteil Z' demonstrierte in den osteogenen Sphäroiden neben einem einfachen Halbkreis im hochfrequenten Bereich einen stärker ausgeprägten zweiten Bogen.

3.3.5 Impedanzspektren der AT-MSC-basierten Sphäroide

Positiver osteogener Entwicklungsprozess (AT-MSCs, Charge 2)

Um osteogene Prozesse in AT-MSC-basierten Sphäroiden zu charakterisieren, wurden die Impedanzspektren von osteogen stimulierten und nativen Sphäroiden der Passage 8 gemessen. Da die verwendeten AT-MSCs bei der Kultivierung in einer 2D-Zellkultur einen relativ großen Phänotyp exprimierten, erfolgte die Aggregation mit 17.500 Zellen pro Sphäroid. Die Messung der Impedanzspektren erfolgte jeweils nach 7 Tagen, 14 Tagen und 21 Tagen. Pro Bedingung wurden 10 - 13 Sphäroide untersucht. Der durchschnittliche Durchmesser der charakterisierten Sphäroide ist in **Tabelle 6** aufgeführt. Aufgrund des relativ großen Durchmessers der Sphäroide am Tag 7 war eine Positionierung in der Mitte der Messkapillare nicht möglich. Die Messungen erfolgten bei vergleichbarer Positionierung im Vergleich zu den Kontrollen des jeweiligen Kulturzeitpunktes.

Tab. 6: Durchschnittlicher Durchmesser der AT-MSC-basierten Sphäroide (Charge 2) ± Standardabweichung.

	7 Tage	14 Tage	21 Tage
Osteogene Sphäroide	528 ± 27 µm	400 ± 20 µm	393 ± 25 µm
Native Sphäroide	547 ± 39 µm	504 ± 30 µm	414 ± 27 µm

Bei allen untersuchten Kulturzeitpunkten waren die osteogenen Impedanzspektren von den Impedanzspektren der nativen Sphäroide zu diskriminieren (**Abb. 51**). Die Impedanzspektren der osteogen differenzierten AT-MSC-Sphäroide demonstrierten den gleichen charakteristischen Verlauf wie die BM-MSC-Sphäroide (**vgl. 3.3.4**), nämlich einen höheren Betrag der Impedanz $|Z|$ und eine ausgeprägtere Dispersion im Phasengang φ . Neben der Stärke der Dispersion war ebenfalls der Kurvenverlauf unterschiedlich. Die nativen Sphäroide zeigten einen geraden Abfall im Phasengang, während die osteogenen Sphäroide eine s-förmige Kurve zeigten. Im Argand-Diagramm (**Abb. 52**) demonstrierten die osteogenen Sphäroide das Auftreten eines deutlich erkennbaren zweiten Kreisbogens, welcher in den nativen Sphäroiden nur schwach ausgeprägt war. Aus den gemessenen Spektren lässt sich keine Aussage über die Entwicklung dieser Charakteristika im Kulturverlauf treffen, da die Sphäroidgröße der unterschiedlichen Kulturzeitpunkte stark variierte (**Tab. 6**). Es bestanden keine vergleichbaren Bedingungen bezüglich der Positionierung (Tag 7: Messung im konisch erweiterten Teil, Tag 14 und 21 Messung in der Kapillarmitte) oder der Kompression der Sphäroide bei gleicher Messposition (Tag 14: ca. 100 µm Größenunterschied zwischen den Messgruppen).

3.3 Impedanzspektroskopische Charakterisierung der osteogenen Differenzierung in 3D

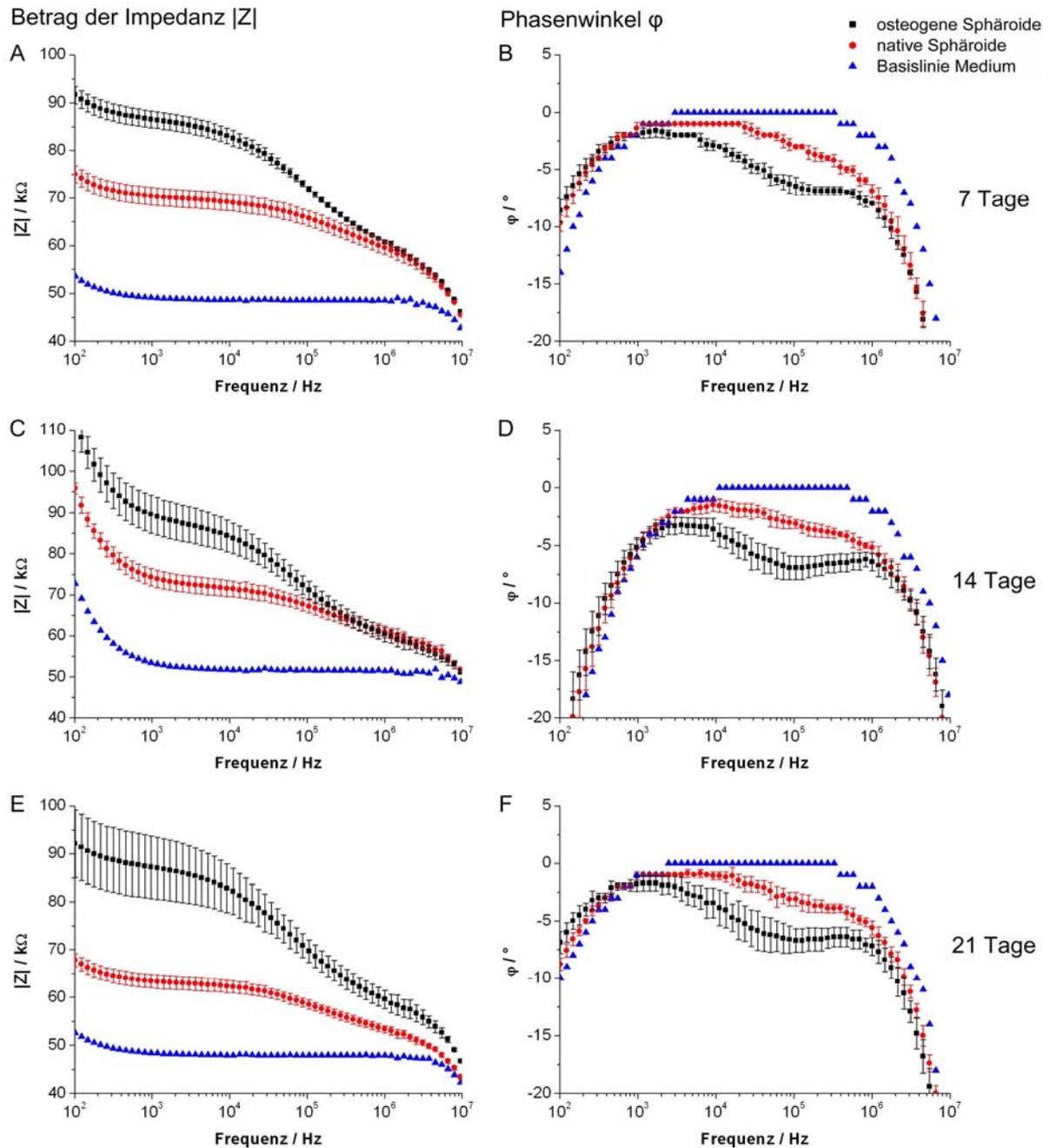


Abb. 51: Darstellung osteogener Prozesse in AT-MSC-basierten Sphäroiden im Bode-Diagramm. Betrag der Impedanz $|Z|$ nach 7 Tagen (A), 14 Tagen (C) und 21 Tagen (E) und der jeweils korrelierende Phasenwinkel ϕ nach 7 Tagen (B), nach 14 Tagen (D) und nach 21 Tagen (F). Die osteogenen Spektren demonstrierten einen höheren relativen Widerstand im Betrag der Impedanz $|Z|$ und eine stärker ausgeprägte Dispersion im Phasengang ϕ .

3. Ergebnisse

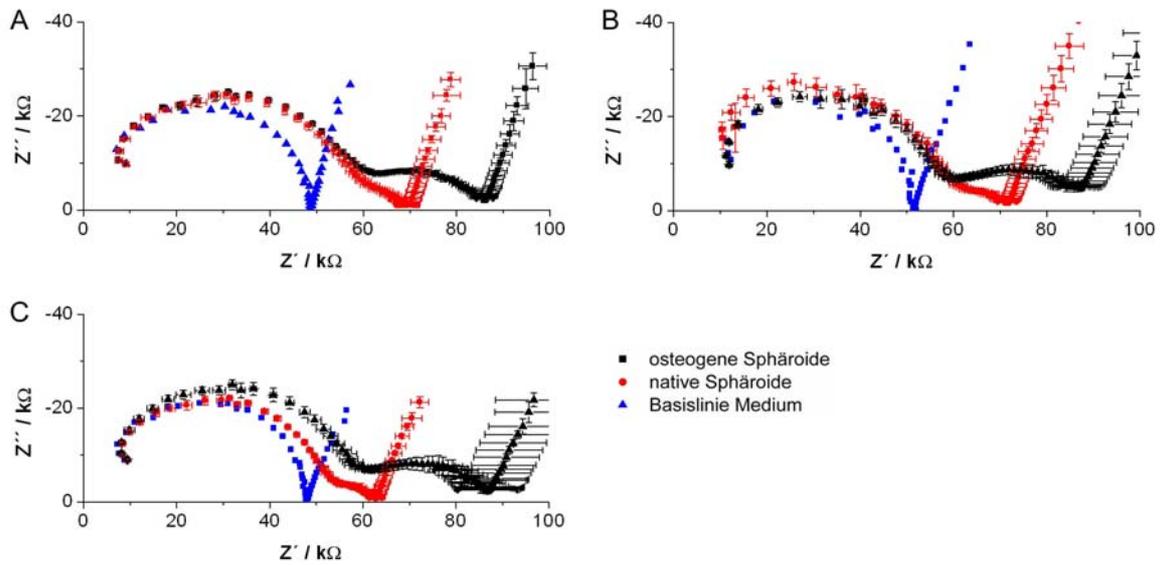


Abb. 52: Argand-Diagramm osteogener Prozesse in AT-MSC-basierten Sphäroiden nach A) 7 Tagen, B) 14 Tagen und C) 21 Tagen in Kultur. In den osteogen stimulierten Sphäroiden wies der Verlauf der jeweiligen Ortskurve einen stärker ausgeprägten zweiten Kreisbogen auf.

Negativer osteogener Entwicklungsprozess (AT-MSCs, Charge 3)

Als Negativkontrolle zu den Impedanzspektren der erfolgreich differenzierten Sphäroide wurden AT-MSC-Sphäroide einer Charge untersucht, in denen nach osteogener Stimulation keine osteogene Differenzierung nachgewiesen wurde. Die Aggregation dieser Charge AT-MSCs der Passage 5 erfolgte mit 17.500 Zellen. Der durchschnittliche Sphäroiddurchmesser ist in **Tabelle 7** dargestellt. Aufgrund der großen Dimension der Sphäroide am Tag 7 war eine Positionierung in der Kapillarmitte nicht möglich.

Tab. 7: Durchschnittlicher Durchmesser der AT-MSC-basierten Sphäroide (Charge 3) \pm Standardabweichung.

	7 Tage	14 Tage	21 Tage	30 Tage
Osteogene Sphäroide	527 \pm 22 μm	413 \pm 19 μm	385 \pm 18 μm	373 \pm 20 μm
Native Sphäroide	571 \pm 27 μm	496 \pm 28 μm	451 \pm 25 μm	427 \pm 21 μm

Die Impedanzspektren dieser Charge AT-MSCs demonstrierten initial die gleichen Charakteristika wie die AT-MSCs der Charge 2 (positives osteogenes Potential) oder die BM-MSCs (**vgl. Abschnitt 3.3.4**). Es wurde ein höherer Widerstand im Betrag der Impedanz $|Z|$ sowie eine Dispersion im Phasengang φ infolge der Kultivierung mit osteogenen Faktoren gemessen, wobei diese Charakteristika besonders prägnant am Kulturtag 14 auftraten (**Abb. 53**). Im weiteren Kulturverlauf, nach 21 Tagen und 30 Tagen, wurde eine Annäherung der osteogenen und der nativen Impedanzspektren beobachtet. Die Ortskurven der Argand-Diagramme demonstrierten nach osteogener Induktion einen stärker ausgeprägten zweiten Kreisbogen (**Abb. 54**).

3.3 Impedanzspektroskopische Charakterisierung der osteogenen Differenzierung in 3D

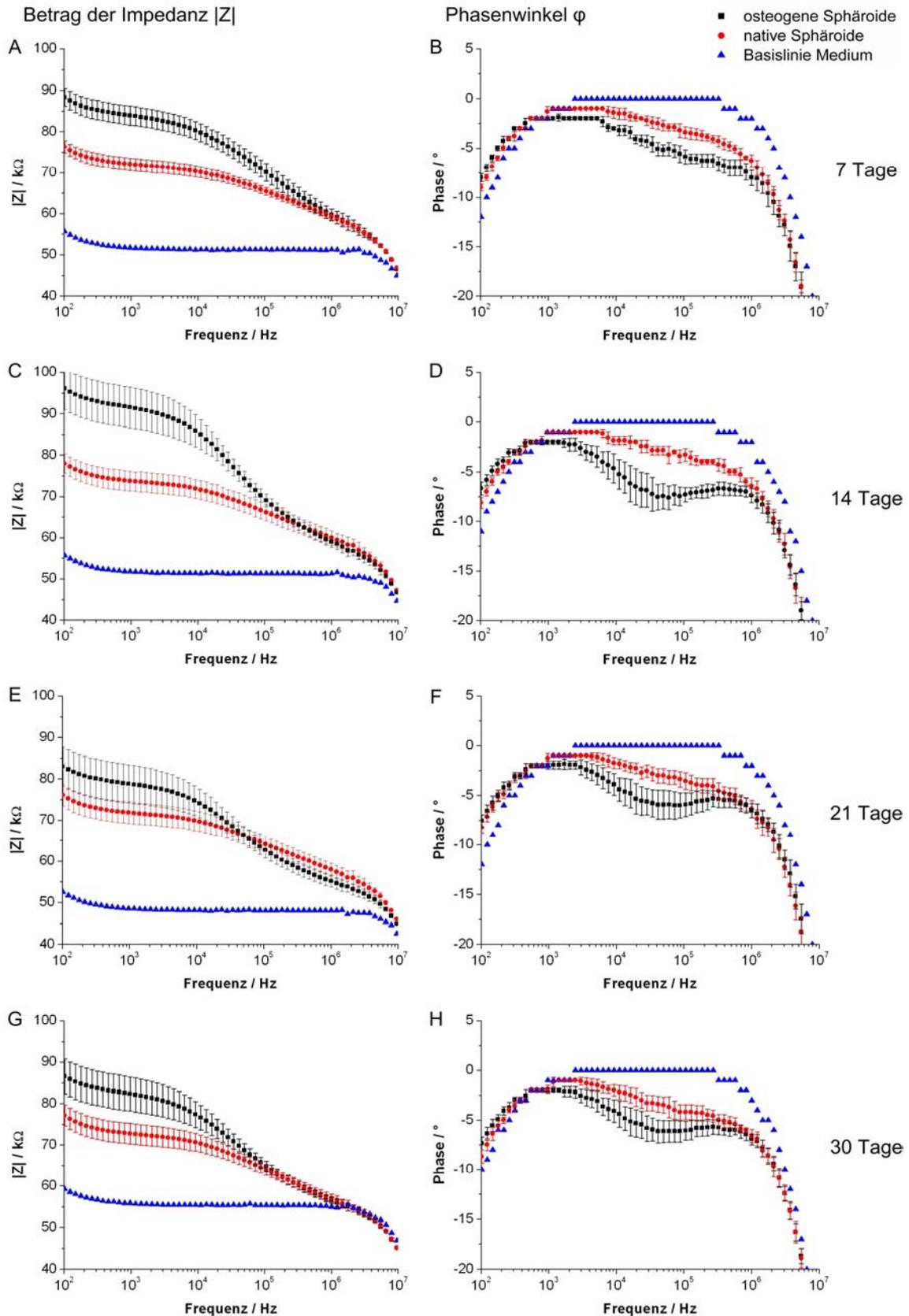


Abb. 53: Impedanzspektren der AT-MSC-basierten Sphäroide (Charge 3) mit dem negativen osteogenen Potential. Dargestellt wurde der Betrag der Impedanz $|Z|$ nach 7 Tagen (A), 14 Tagen (C), 21 Tagen (E) und nach 30 Tagen (G) sowie der jeweils korrelierende Phasenwinkel φ nach 7 Tagen (B), nach 14 Tagen (D), nach 21 Tagen (F) und nach 30 Tagen (H).

3. Ergebnisse

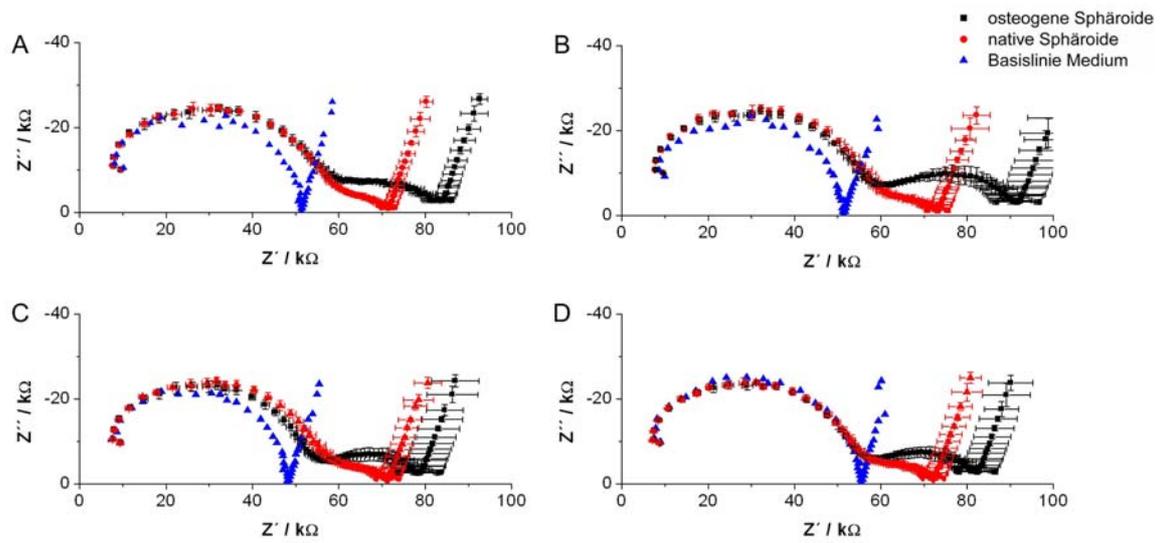


Abb. 54: Argand-Diagramm zellulärer Prozesse in AT-MSC-basierten Sphäroiden (Charge 3) nach A) 7 Tagen, B) 14 Tagen, C) 21 Tagen und D) 30 Tagen. In den osteogen stimulierten Sphäroiden demonstrierte die jeweilige Ortskurve einen stärker ausgeprägten zweiten Kreisbogen.

3.3.6 Impedanzspektren der hES H1-basierten Sphäroiden

hES H1-Zellen der Passage 47 wurden für eine Periode von 25 Tagen in einer EB-Kultur vordifferenziert. Nach Solubilisierung der EBs wurden die resultierenden Zellen zur Sphäroidformation verwendet. Aufgrund der relativ geringen Zellgröße erfolgte die Aggregation mit 20.000 Zellen pro Sphäroid. Eine vergleichende Bestimmung der Impedanzspektren osteogen stimulierter und nativer Kontrollsphäroide erfolgte jeweils nach 7 Tagen, 14 Tagen und 21 Tagen. Im Kulturverlauf wurde eine Disaggregation der nativen Sphäroide beobachtet. In **Tabelle 8** wurde die Größenentwicklung der hES H1-basierten Sphäroide erfasst. Trotz des großen Durchmessers der hES H1-Aggregate am Tag 7 war eine Positionierung in der Kapillarmitte möglich, die Aggregate waren komprimierbarer als die MSC-basierten Sphäroide.

Tab. 8: Durchschnittlicher Durchmesser der hES H1-basierten Aggregate \pm Standardabweichung.

	7 Tage	14 Tage	21 Tage
Osteogene Sphäroide	521 \pm 24 μm	500 \pm 29 μm	484 \pm 18 μm
Native Sphäroide	418 \pm 50 μm	334 \pm 32 μm	287 \pm 47 μm

Durch die Disaggregation der Kontrollen war keine impedanzspektroskopische Charakterisierung der Kontrollen am Tag 21 möglich. Ein direkter Vergleich der osteogenen Spektren mit den Kontrollen nach 7 Tagen und 14 Tagen zeigte einen höheren Widerstand im Betrag der Impedanz $|Z|$ (**Abb. 55**). Im Bezug auf den Verlauf des Phasengangs φ demonstrierten beide Sphäroidgruppen am Tag 7 eine ähnlich ausgeprägte Dispersion. In den nativen Sphäroiden wurden im weiteren Kulturverlauf eine Abschwächung dieser Dispersion und eine Reduktion des Betrags der Impedanz detektiert. Aufgrund der sich reduzierenden Sphäroidgröße der Kontrollen bestand bei den Messungen am Tag 14 und Tag 21 nur ein geringfügiger Kontakt zur Kapillarmwand, während die größeren, osteogenen Sphäroide teilweise stark in der Kapillare komprimiert waren. Im Argand-Diagramm (**Abb. 56**) wurde im Verlauf der Ortskurve der osteogenen wie auch der nativen Sphäroiden nach 7 Tagen das Auftreten eines zweiten Kreisbogens demonstriert, wobei der Kurvenverlauf infolge einer Kultivierung mit osteogenen Medium stärker ausgeprägt war. Dieser Kreisbogen unterschied sich von den in MSC-basierten Sphäroiden detektierten Kurvenverläufen durch die große Dimension.

3. Ergebnisse

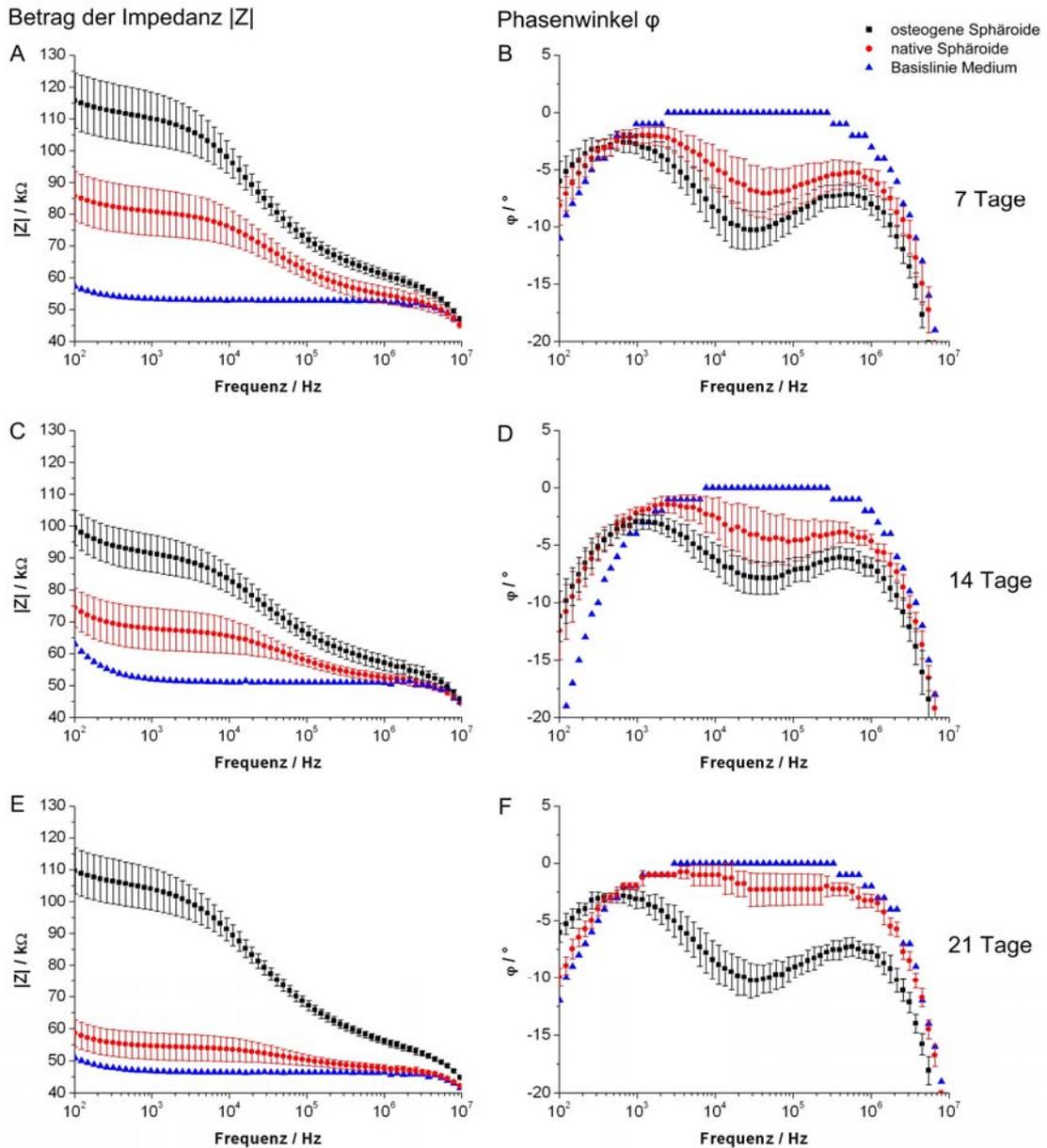


Abb. 55: Darstellung osteogener Prozesse in hES H1-basierten Sphäroiden im Bode-Diagramm. Betrag der Impedanz $|Z|$ nach 7 Tagen (A), 14 Tagen (C) und 21 Tagen (E) sowie der jeweils korrelierende Phasenwinkel φ nach 7 Tagen (B), nach 14 Tagen (D) und nach 21 Tagen (F). Die Spektren des Betrags der Impedanz demonstrierten einen höheren Widerstand in den osteogenen Sphäroiden, während im Phasengang bis einschließlich Tag 14 beide Sphäroidgruppen eine Dispersion zeigten. Infolge einer Disaggregation der Kontrollen bestand an Tag 14 und 21 Tag kaum Kontakt zur Messkapillare, wodurch die Messung der Sphäroide negativ beeinflusst wurde.

3.3 Impedanzspektroskopische Charakterisierung der osteogenen Differenzierung in 3D

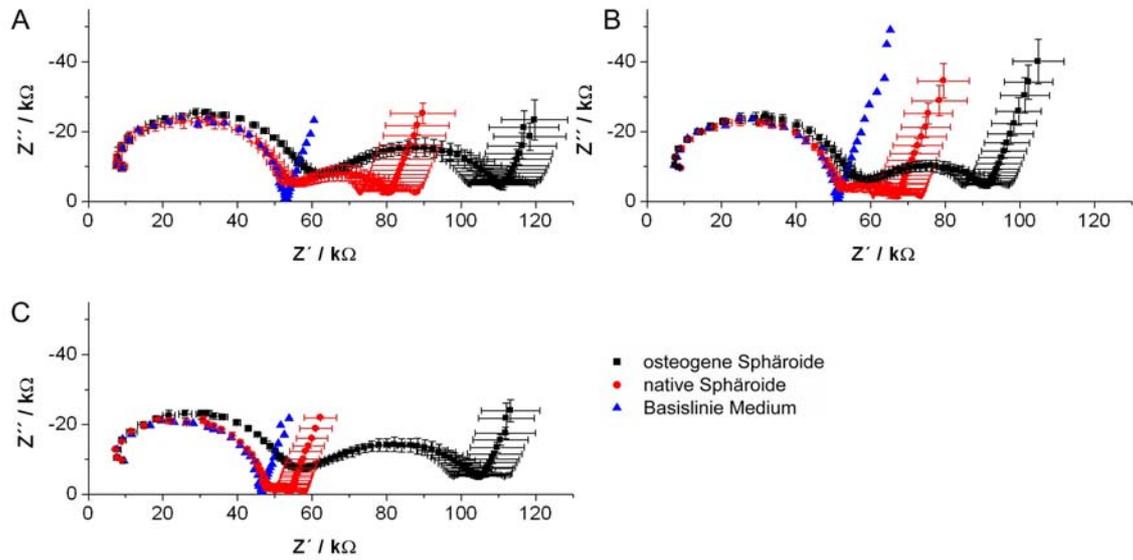


Abb. 56: Argand-Diagramm osteogener Prozesse in hES H1-basierten Sphäroiden nach A) 7 Tagen, B) 14 Tagen und C) 21 Tagen in Kultur. In den osteogen stimulierten Sphäroiden zeigte die jeweilige Ortskurve des Imaginärteils Z'' aufgetragen gegen den Realteil Z' einen deutlich ausgeprägten zweiten Kreisbogen.

3.3.7 Modellbildung

Ziel der Modellbildung war die Bestimmung der Gewebeparameter, welche sich infolge der osteogenen Differenzierung in den stammzellbasierten Sphäroiden änderten. Die Modellierung der elektrischen Ersatzschaltbilder erfolgte aufgrund gängiger Gewebemodelle unter Berücksichtigung der mit Osteogenese assoziierten zellulären Änderungen (**Abschnitt 1.5.3 und 2.3.2**). Die Untersuchung dieser zellulären Prozesse erfolgte mittels konventioneller zellbiologischer Methoden und ist in **Abschnitt 3.3.10** aufgeführt. Nach osteogener Induktion differenzierten die Stammzellen in Osteoblasten und sezernierten mineralisierte ECM. Diese strukturellen Änderungen betrafen den extrazellulären Raum. Des Weiteren wurde in den äußeren Bereichen der osteogenen BM-MS-C-Sphäroide eine dominante Expression der ALP demonstriert, einem intrazellulären Enzym. Sowohl die ALP wie auch die Strukturproteine der ECM sind membranassoziiert. Folglich wurde bei der Modellbildung die Kapazität der Zellmembran untersucht. Die Modellierung dieser zellulären Parameter erfolgte in unterschiedlicher Verschaltung in einem vereinfachten Modell, welches die Sphäroide als homogene Einheit beschreibt. Die Beurteilung der histologischen Schnitte demonstrierte eine heterogene Distribution der osteogenen Marker. Diese Heterogenität der Differenzierung wurde durch die modellhafte Annahme von zwei Bereichen (differenziert/nicht differenziert) in den Sphäroiden berücksichtigt.

→ Homogenes Modell: Darstellung des Sphäroides als Gesamteinheit (**Abb. 57A, B und C**)

→ Heterogenes Modell: Darstellung von zwei Bereichen im Sphäroid (**Abb. 57D und E**)

Um den Impedanzverlauf der Sphäroide zu interpretieren, wurden folgende Parameter verwendet:

R_{intra} intrazellulärer Widerstand

R_{extra} extrazellulärer Widerstand

CPE_1 Kapazität der Membran,

Parametrisierung mittels ZView2 in CPE_{1-T} und CPE_{1-P}

Als Geräteparameter wurden definiert:

C_{streu} parasitäre Streukapazität (Kabel, Stecker)

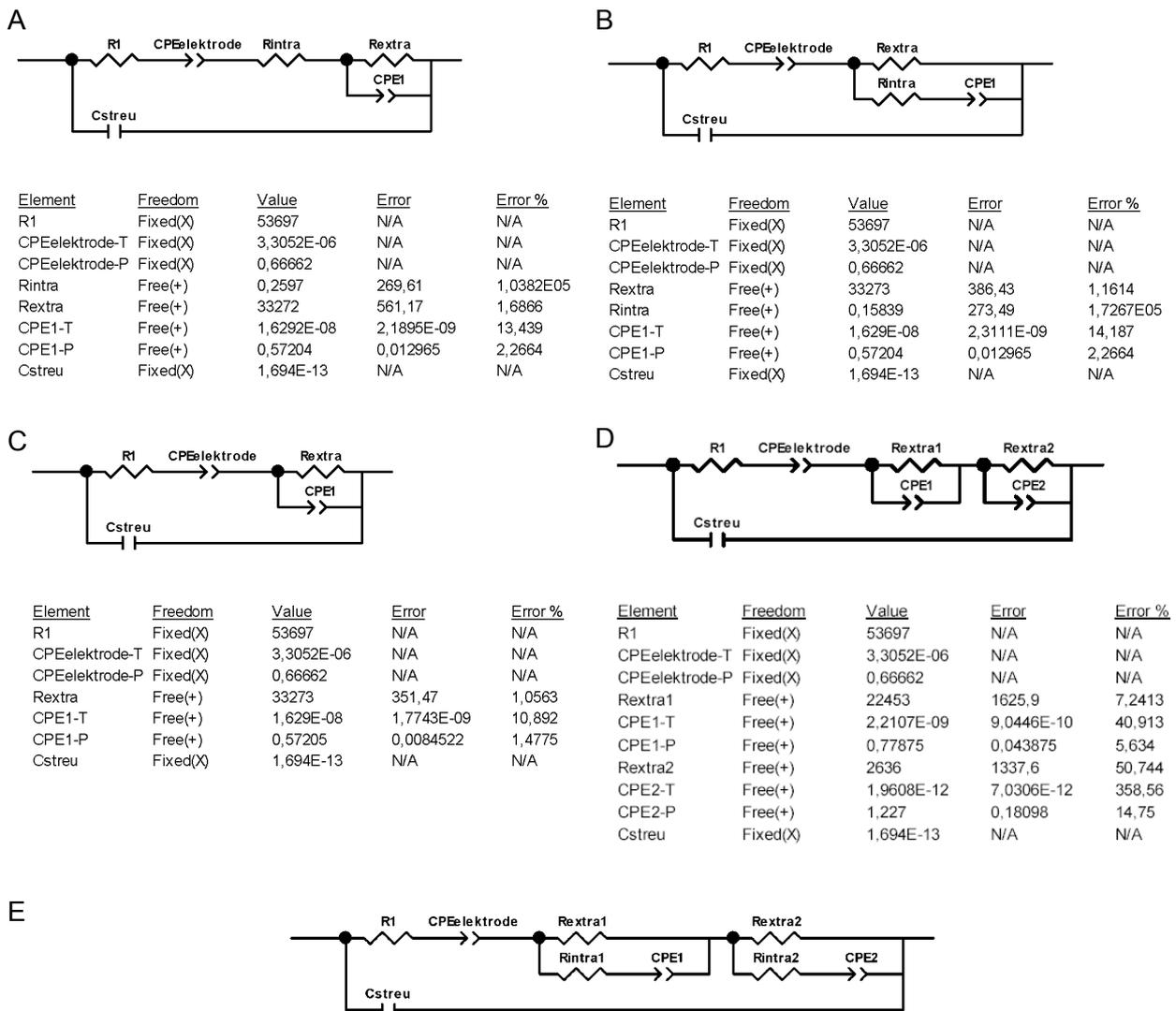
R_1 Widerstand des Messsystems und des Messmediums

$CPE_{\text{elektrode}}$ Kapazität des Messsystems,

Parametrisierung mittels ZView2 in $CPE_{\text{elektrode-T}}$ und $CPE_{\text{elektrode-P}}$

Die Basiswerte der Geräteparameter wurden anhand der Medienimpedanz (Basislinie des Messmediums der jeweiligen Messung, vgl. **Abb. 49, Abb. 51, Abb. 53 und Abb. 55**) bestimmt.

3.3 Impedanzspektroskopische Charakterisierung der osteogenen Differenzierung in 3D



→ Ersatzschaltbild war überbestimmt. Modellierung mit ZView2 nicht möglich.

Abb. 57: Untersuchte Ersatzschaltbilder zur Darstellung der experimentellen Impedanzspektren. In Modell A) und B) wurde der intrazelluläre Anteil des Widerstandes R_{intra} , der extrazelluläre Widerstand R_{extra} und die Membrankapazität CPE_1 in unterschiedlicher Verschaltung berücksichtigt. In Modell C) wurde der Verlauf nur durch den extrazellulären Widerstand R_{extra} und die Membrankapazität CPE_1 motiviert. In Modell D) wurde die Heterogenität der Sphäroide durch zwei Bereiche mit jeweils einem intrazellulären Widerstand (R_{intra1}/R_{intra2}), einem extrazellulären Widerstand (R_{extra1}/R_{extra2}) und einer Membrankapazität (CPE_1/CPE_2) dargestellt. Der intrazelluläre Widerstand wurde in dem vereinfachten heterogenen Modell E) nicht berücksichtigt. Es erfolgte jeweils eine Parametrisierung der CPE-Elemente mittels ZView2 in CPE-T (elektrische Kapazität) und CPE-P (Dispersionsparameter).

Die Ersatzschaltbilder **A**, **B**, und **C** (**Abb. 57**) modellierten äquivalente Impedanzspektren, welche mit den gemessenen Impedanzkurven übereinstimmten. Ersatzschaltbild **D** war mit vier freien Parametern überbestimmt, was zu großen Fehlern führte (z.B. R_{extra} mit einem Fehler von 50,744%, CPE1-T mit 40,913% und CPE2-P mit 358,56%). Die Modellierung der äquivalenten Impedanzspektren mit 6 freien Parametern (**Abb. 57**) war mit ZView2 nicht mehr möglich. Exemplarisch wurde die Modellierung des Verlaufs der experimentellen

3. Ergebnisse

Impedanzspektren mittels ZView2 mit dem einfachen Ersatzschaltbildes **C** für einen osteogenen BM-MS-C-Sphäroid am Tag 21 dargestellt (**Abb. 58**).

Ein Vergleich dieser Ersatzschaltbilder **A**, **B** und **C** (**Abb. 57**) demonstriert, dass in den Sphäroiden der intrazelluläre Widerstand aufgrund des relativ hohen Widerstands des Messsystems R_1 und des Kulturmediums von 53.697 k Ω sowie der Streukapazität C_{Streu} von $1,69 \times 10^{-13}$ F nicht bestimmbar war.

- R_{intra} war mit 0,259 k Ω (A) bzw. 0,15839 k Ω (B) sehr niedrig im Vergleich zu R_{extra} mit 33.272 k Ω (A) bzw. 33.273 k Ω (B)

- die Bestimmung von R_{intra} zeigte einen Fehler von über 100.000%

- die gemessenen Impedanzspektren wurden mit einem geringeren Fehler nur durch R_{extra} und einem CPE-Element mittels ZView2 äquivalent nachgebildet

Folglich wurde zur Auswertung der Impedanzspektren das Ersatzschaltbild **C** verwendet.

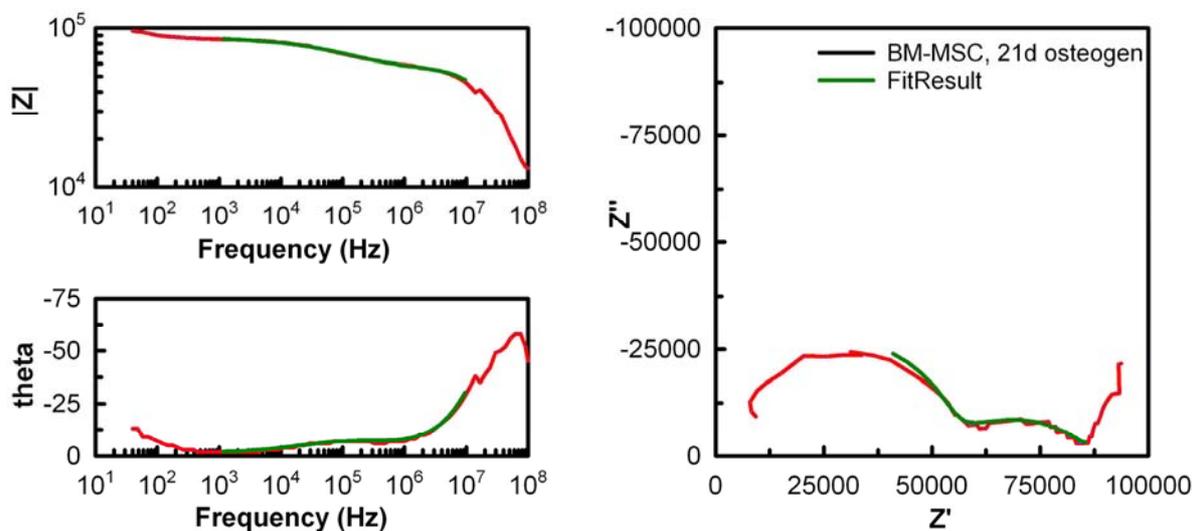


Abb. 58: Impedanzspektrum eines osteogenen BM-MS-C-Sphäroids am Tag 21 (rot) und modellierter Impedanzverlauf (grün) mittels ZView2. Der Impedanzverlauf wurde durch die Ersatzschaltbilder A), B) und C) vergleichbar genau motiviert. Exemplarisch werden die Daten von Ersatzschaltbild C) gezeigt.

3.3.8 Quantitative Bestimmung der zellulären Parameter nach Modellbildung

Auf Basis des Ersatzschaltbildes **Abbildung 57C** wurden die spezifischen zellulären Parameter untersucht, welche die Änderungen der gemessenen Impedanzspektren in den osteogenen Sphäroiden induzierten. Da die Membrankapazität nach dem Gewebemodell von Cole als CPE-Element dargestellt wurde, folgte eine Parametrisierung mittels ZView2 in CPE-T (elektrische Kapazität) und CPE-P (Dispersionsparameter α).

Zusammenfassend sind im Folgenden die durchschnittlichen Mittelwerte der Messgruppen im Kulturverlauf abgebildet. Eine Interpretation erfolgte im Vergleich zu der jeweiligen nativen Kontrolle, die p-Werte wurden mittels ANOVA berechnet (**Tab. 9**). Die Messergebnisse der individuellen Sphäroide sind im **Anhang 7.4** aufgeführt.

Tab. 9: Signifikanzanalyse der Modellparameter mittels ANOVA. Gegeben sind die p-Werte der Messungen im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. Die Kreuze markieren signifikante Abweichungen ($p < 0,05 = x$, $p < 0,005 = xx$, $p < 0,0005 = xxx$), während bei den nicht signifikanten Abweichungen die Zahlenwerte gegeben sind.

p-Werte				
	Tag	R _{extrazellulär}	CPE-T	CPE-P
BM-MSK	7	xxx	0,99949	0,1673
	14	xxx	0,054	0,2
	21	xxx	xx	0,23502
AT-MSK	7	xxx	xx	xxx
	14	x	xxx	xxx
	21	xxx	0,05538	0,39218
AT-MSK neg. Potential	7	xxx	xxx	xxx
	14	xxx	xxx	xxx
	21	0,22	xx	xxx
hES H1	7	xxx	0,24639	xxx
	14	xxx	0,0071	xxx
	21	xxx	0,067	xxx

Untersucht wurde der extrazelluläre Widerstand in den stammzellbasierten Sphäroiden (**Abb. 59**). Es zeigte sich, dass die osteogen differenzierten BM-MSK-Sphäroide und AT-MSK-Sphäroide sich signifikant ($p > 0,05$) von den nativen Kontrollen unterschieden. Der extrazelluläre Widerstand der osteogenen Sphäroide war während des gesamten Kulturverlaufs höher als in den nativen Kontrollen. Im Fall von den AT-MSKs der Charge 3 (AT-MSKs, neg. Potential), die nach osteogener Stimulation keine Mineralisierung präsentierten, wurde zu Beginn der Kultivierung (bis einschließlich Tag 14) noch ein signifikanter Unterschied detektiert. Aber nach 21 Tagen wurde ein Anstieg des extrazellulären Widerstandes der nativen Sphäroide auf das Niveau der osteogenen Sphäroide beobachtet ($p = 0,22$). Aufgrund der Disaggregation der hES H1-Kontrollen war der durchschnittliche Durchmesser dieser Sphäroide am Kulturtag 21 geringer als der Kapillardurchmesser. Daraus folgte eine reduzierte Messempfindlichkeit im Kulturverlauf, die durch ein Absinken des extrazellulären Widerstandes präsentiert wurde. Ein direkter Vergleich mit den osteogenen hES H1-Sphäroiden war daher nicht aussagekräftig, auch wenn die p-Werte dies indizierten ($p < 0,05$). Im Vergleich zu den adulten Stammzellen demonstrierten die osteogen stimulierten hES H1-Sphäroide insgesamt die höchsten Werte im Kulturverlauf.

Die Veränderung der Membrankapazität CPE-T wurde untersucht (**Abb. 60**). Die osteogen differenzierten BM-MSK- und AT-MSK-basierten Sphäroide zeigten dabei tendenziell geringere Werte im Vergleich zu den nativen Kontrollen. Von diesen MSC-Populationen unterschieden sich die AT-MSKs mit dem negativen Potential auffällig durch den erhöhten CPE-T-Wert der nativen Kontrollen. Ein Vergleich der osteogen stimulierten Sphäroide mit den nativen Kontrollsphäroiden dieser Charge zeigt signifikant geringere Werte dieses Parameters ($p < 0,005$). Demgegenüber waren die nativen hES H1-Sphäroide nicht von den osteogen stimulierten Sphäroiden zu unterscheiden.

Die Betrachtung des Dispersionsparameter CPE-P demonstrierte keine einheitliche Tendenz (**Abb. 61**). Die osteogen differenzierten BM-MSK-Sphäroide waren im gesamten Kulturverlauf nicht von den nativen Kontrollen zu diskriminieren und auch die osteogen

3. Ergebnisse

differenzierten AT-MSCs zeigten nach 21 Tagen keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$) im Vergleich zu den nativen Kontrollen. Demgegenüber wurde in der AT-MSC-Charge mit dem negativen osteogenen Potential im Vergleich zu der jeweiligen Kontrolle ein signifikanter Anstieg dieses Parameters demonstriert. In den osteogenen hES H1-Sphäroiden wurden geringere Werte gezeigt als in den Kontrollen, wobei allerdings in den Kontrollen das bereits beschriebene Phänomen der Disaggregation zu berücksichtigen war.

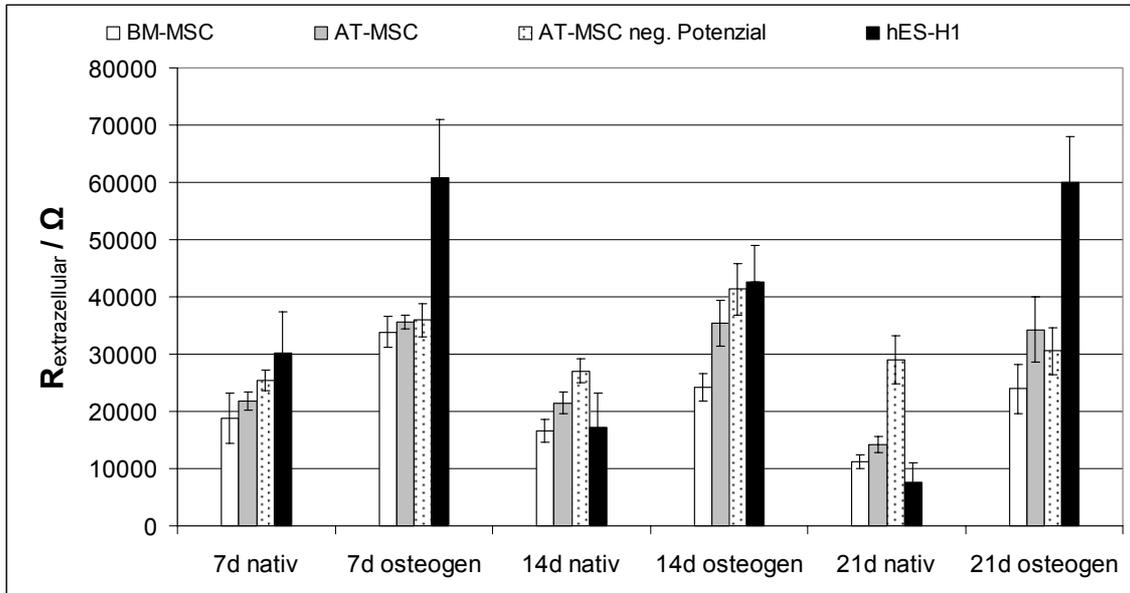


Abb. 59: Entwicklung des extrazellulären Widerstandes in den stammzellbasierten Sphäroiden nach osteogener Stimulation im Kulturverlauf. Gegeben sind die durchschnittlichen Mittelwerte \pm Standardabweichung.

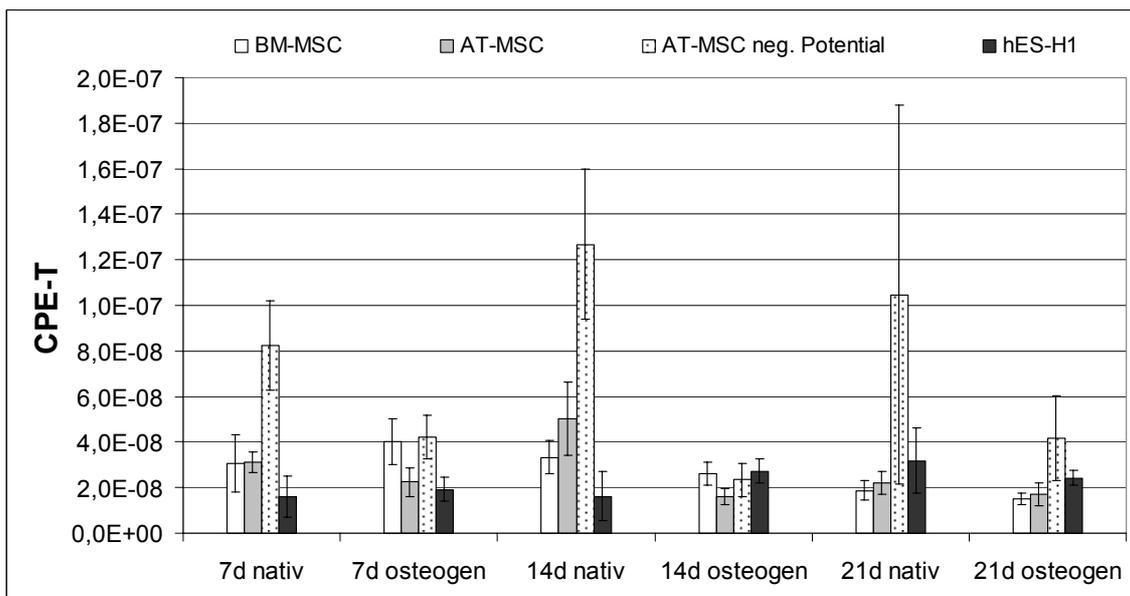


Abb. 60: Entwicklung des Parameters CPE-T in den stammzellbasierten Sphäroiden nach osteogener Stimulation im Kulturverlauf. Gegeben sind die durchschnittlichen Mittelwerte \pm Standardabweichung.

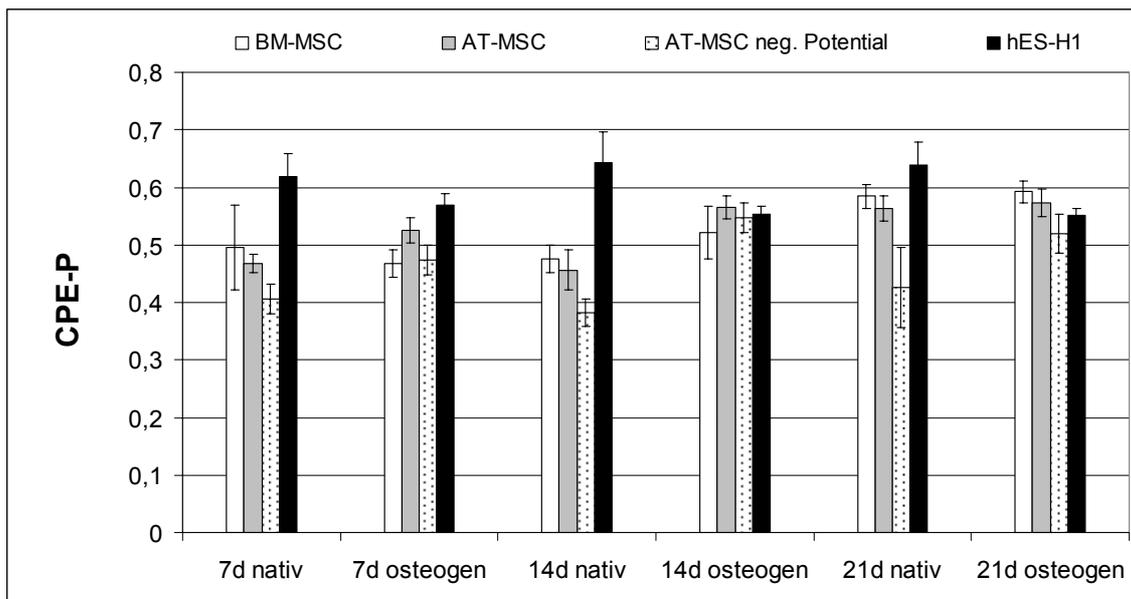


Abb. 61: Entwicklung des Parameters CPE-P in den stammzellbasierten Sphäroiden nach osteogener Stimulation im Kulturverlauf. Gegeben sind die durchschnittlichen Mittelwerte \pm Standardabweichung.

3.3.9 Untersuchung der Dispersion im Phasengang

Die Impedanzspektren des Phasengangs der osteogen differenzierten Sphäroide demonstrierten im Frequenzbereich von 20 kHz bis 500 kHz eine stärkere Dispersion als die nativen Sphäroide. In der halblogarithmischen Darstellung wurde in den nativen Sphäroiden ein gerader Abfall des Phasengangs beobachtet, während in den osteogenen Sphäroiden die Kurvenform des Phasengangs gekrümmt war. Um dieses Dispersionsverhalten zu untersuchen, wurde eine Regressionsanalyse (Excel, Microsoft) durchgeführt. Die Ergebnisse der Regressionsanalyse der BM-MSCs (**Abb. 62**), AT-MSCs (**Abb. 63**) sowie AT-MSCs der Charge 3 mit einem negativen osteogenen Potential (**Abb. 64**) und hES H1 (**Abb. 65**) wurden in **Tabelle 10** zusammengefasst.

Tab. 10: Regressionsanalyse.

	Tag	R ² nativ	R ² osteogen
BM-MSC	7	0,9854	0,9858
	14	0,985	0,976
	21	0,9956	0,7304
AT-MSC	7	0,9895	0,873
	14	0,9821	0,4067
	21	0,9744	0,544
AT-MSC neg. Potential	7	0,9903	0,9744
	14	0,9624	0,00879
	21	0,9751	0,1566
	30	0,9741	0,0346
hES H1	7	0,4521	0,1464
	14	0,7176	0,3354
	21	0,7844	0,17

3. Ergebnisse

Der Phasengang der nativen MSC-Sphäroide demonstrierte in der halblogarithmischen Darstellung eine hohe Konvergenz mit der beschreibenden Regressionskurve ($R^2 > 0,974$). Die osteogen differenzierten BM-MSCs und AT-MSCs zeigten im Kulturverlauf eine zunehmende Dispersion, die in einer stärkeren Abweichung von der Regressionskurve resultierte. Die BM-MSC-basierten Sphäroide demonstrierten nach 21 Tagen osteogener Induktion mineralisierte ECM (**vgl. Abschnitt 3.3.10, Abb. 67**). Zu diesem Zeitpunkt wurde eine starke Abweichung im Bestimmtheitsmaß der Regressionskurve ($R^2 = 0,73$) festgestellt. In den AT-MSC-basierten Sphäroiden wurde bereits nach 14 Tagen mineralisierte ECM nachgewiesen (**vgl. Abschnitt 3.3.10, Abb. 68**) und eine starke Dispersion ($R^2 = 0,4$), die ebenfalls im weiteren Kulturverlauf bestehen blieb ($R^2 = 0,54$).

In den AT-MSC-basierten Sphäroiden, die durch ein negatives osteogenes Potential gekennzeichnet waren (**vgl. Abschnitt 3.3.10, Abb. 69**), wurde der Verlauf des Phasengangs nur unzureichend durch die logarithmische Regressionsanalyse beschrieben ($R^2 > 0,156$). In diesen Sphäroiden wurde eine stärkere Dispersion demonstriert als in den osteogen differenzierteren AT-MSC- und BM-MSC-basierten Sphäroiden. In den hES H1-basierten Sphäroiden wurde ebenfalls eine starke Dispersion des Phasengangs in den osteogen differenzierten Sphäroiden beobachtet ($R^2 > 0,335$). Dieses Dispersionsgebiet erstreckte sich über einen größeren Frequenzbereich (11 kHz - 500 kHz) als das Dispersionsgebiet der MSC-basierten Sphäroide (20 kHz - 500 kHz). Im Gegensatz zu den nativen MSC-basierten Sphäroiden wurde in den nativen hES H1-basierten Sphäroiden am Tag 7 eine starke Dispersion beobachtet ($R^2 = 0,452$). Da im weiteren Kulturverlauf eine Disaggregation der nativen hES H1-Sphäroide beobachtet wurde, sind die Daten der Regressionsanalyse von Tag 14 und Tag 21 nicht aussagekräftig. Die histologischen Befunde dieser Sphäroide zeigten keine Differenzierung, sondern zellfreie Bereiche im Inneren der Sphäroide (**vgl. Abschnitt 3.3.10, Abb. 70**).

3.3 Impedanzspektroskopische Charakterisierung der osteogenen Differenzierung in 3D

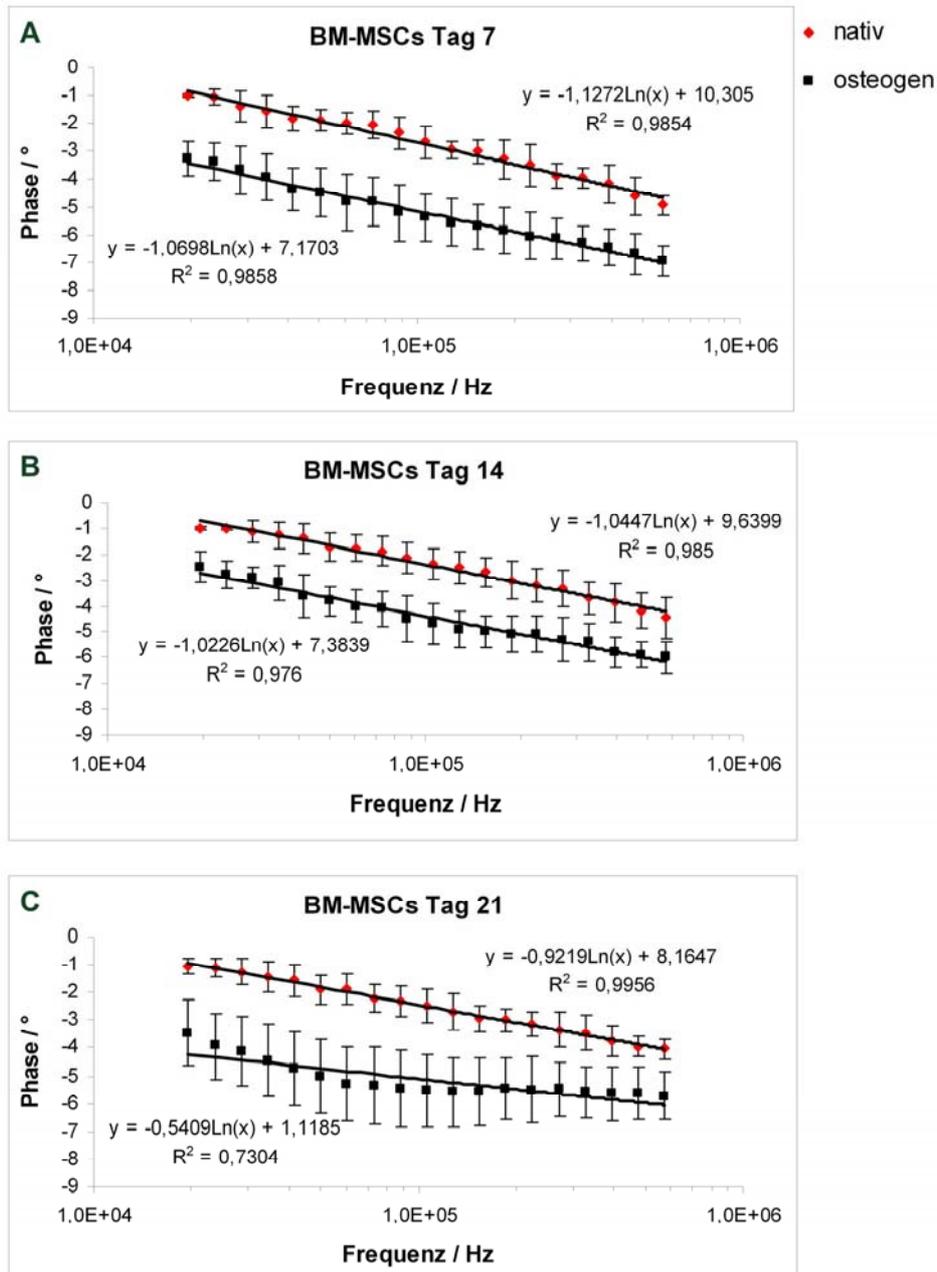


Abb. 62: Regressionsanalyse der BM-MSC-basierten Sphäroide am Tag 7, Tag 14 und Tag 21. Dargestellt sind der Verlauf des Phasenwinkels in dem Frequenzbereich von 20 kHz - 500 kHz und die beschreibende Regressionsgerade (schwarze Linie) in halblogarithmischer Auftragung.

3. Ergebnisse

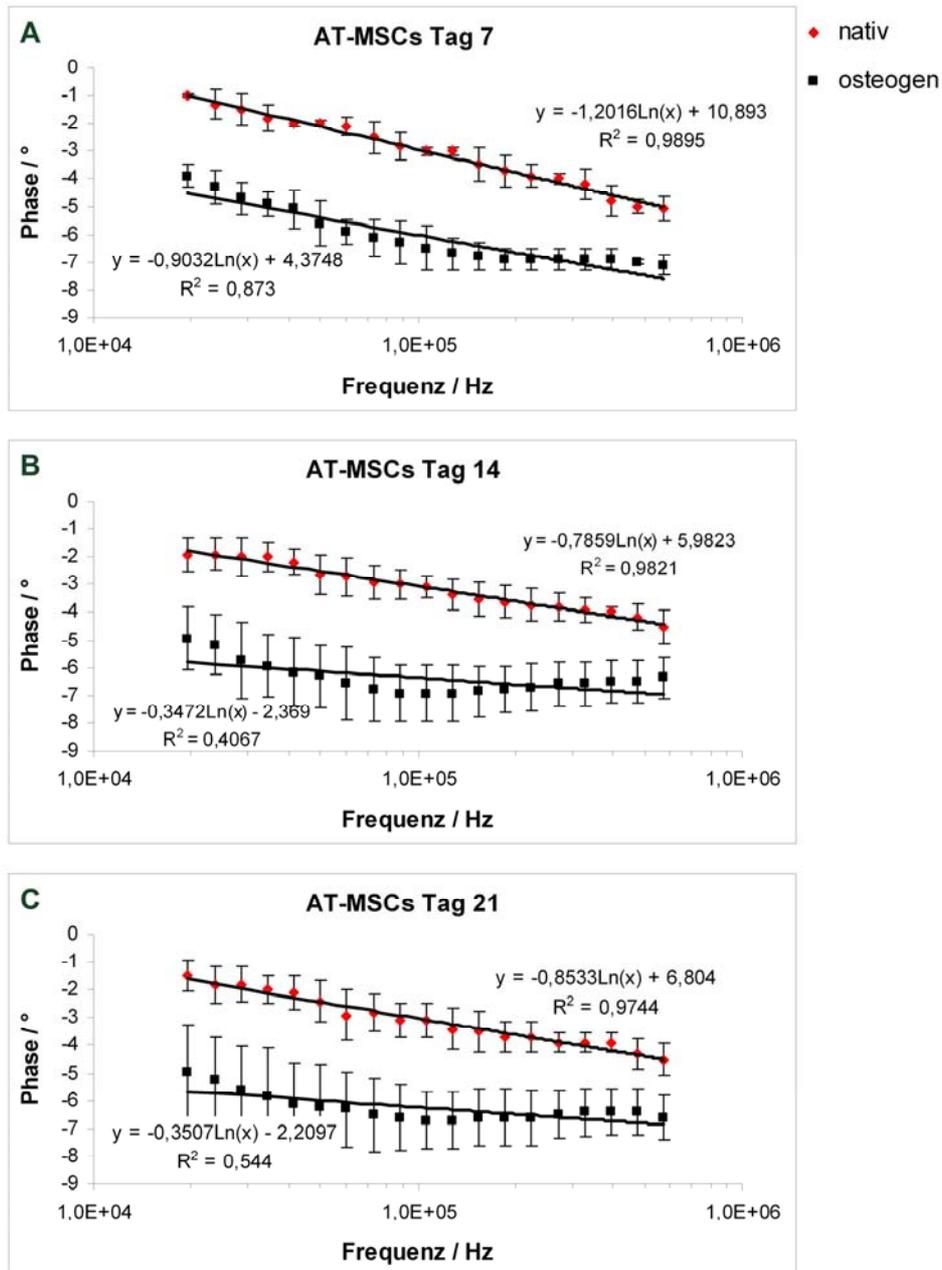


Abb. 63: Regressionsanalyse der AT-MSC-basierten Sphäroide am Tag 7, Tag 14 und Tag 21. Dargestellt sind der Verlauf des Phasenwinkels in dem Frequenzbereich von 20 kHz - 500 kHz und die beschreibende Regressionsgerade (schwarze Linie) in halblogarithmischer Auftragung.

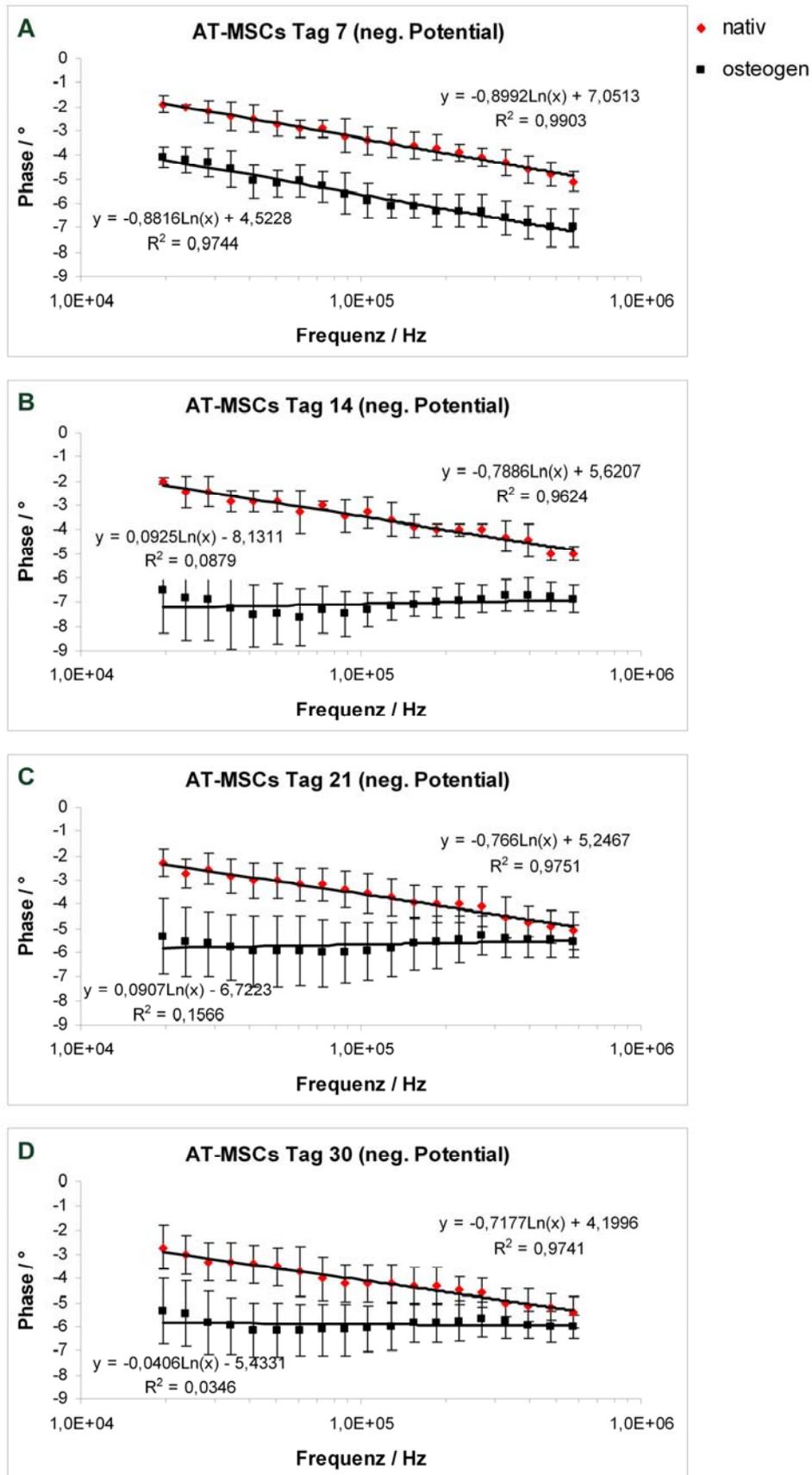


Abb. 64: Regressionsanalyse der AT-MSC-basierten Sphäroide mit einem negativen osteogenen Potential am Tag 7, Tag 14, Tag 21 und Tag 30. Dargestellt sind der Verlauf des Phasenwinkels in dem Frequenzbereich von 20 kHz - 500 kHz und die beschreibende Regressionsgerade (schwarze Linie) in halblogarithmischer Auftragung.

3. Ergebnisse

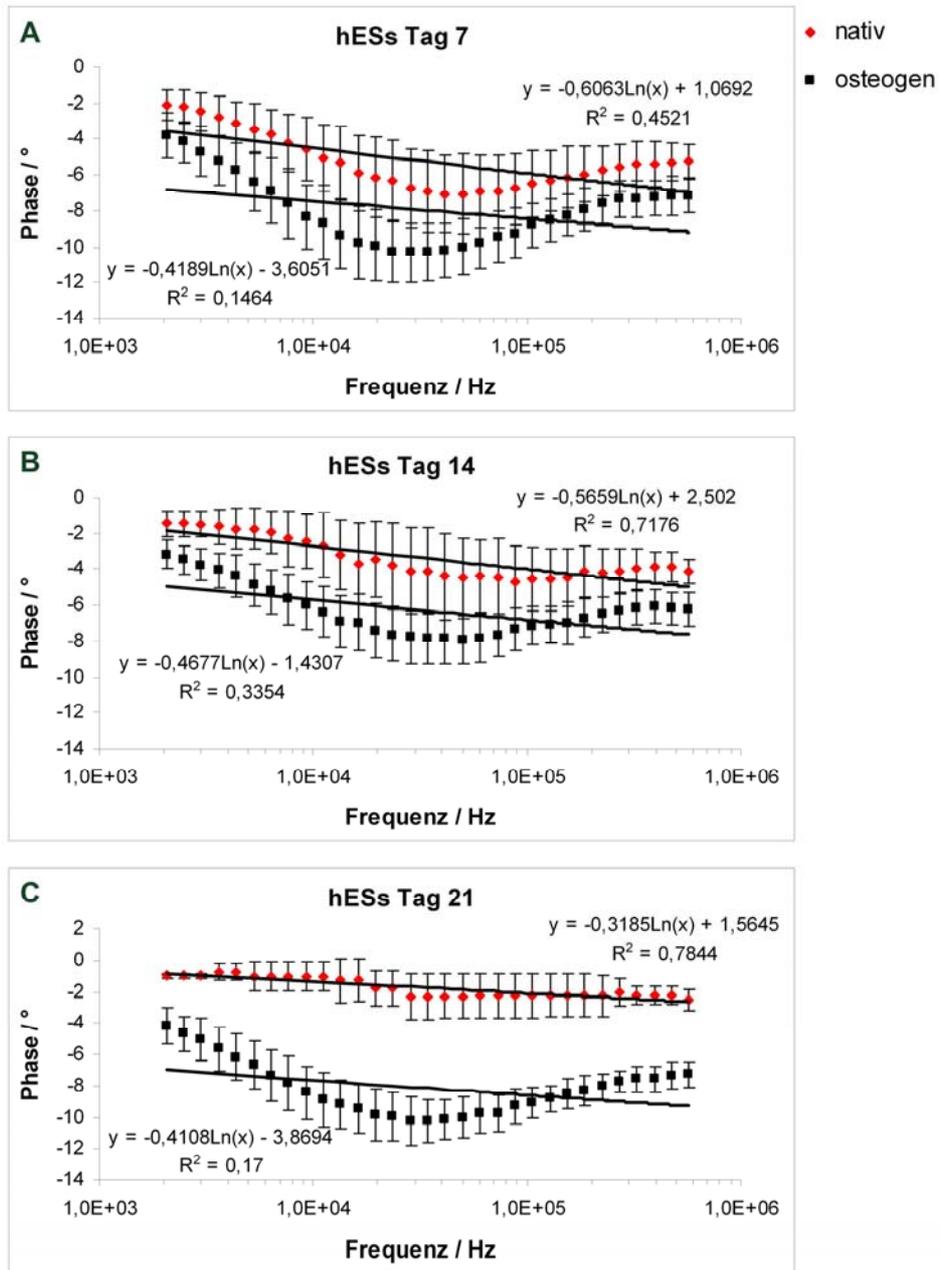


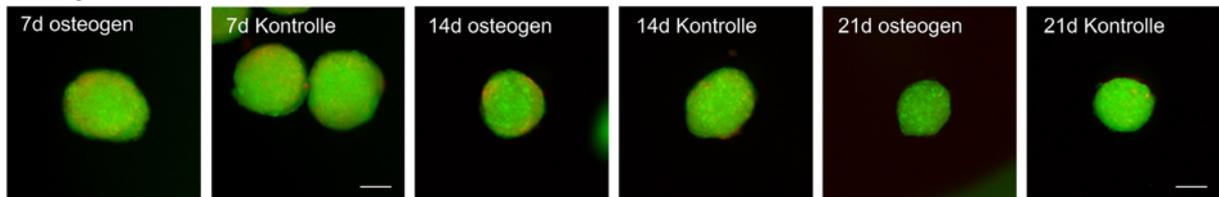
Abb. 65: Regressionsanalyse der hES H1-basierten Sphäroide am Tag 7, Tag 14 und Tag 21. Dargestellt sind der Verlauf des Phasenwinkels in dem Frequenzbereich von 11 kHz - 500 kHz und die beschreibende Regressionsgerade (schwarze Linie) in halblogarithmischer Auftragung.

3.3.10 Zellbiologische Charakterisierung der Sphäroide

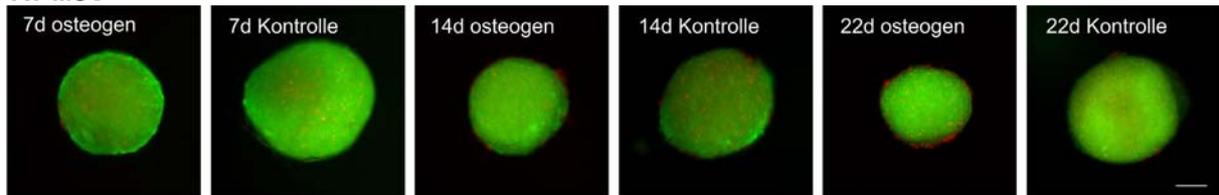
Untersuchung der Vitalität

Die Vitalität der Sphäroidkulturen wurde mittels FDA/Pi-Färbung untersucht (**Abb. 66**). Dabei erfolgten die Untersuchungen jeweils nach impedanzspektroskopischer Charakterisierung der Sphäroide. Eine dominante Präsenz vitaler Zellen (grün) im Verhältnis zu abgestorbenen Zellen (rot) wurde kulturbegleitend über einen Zeitraum von max. 22 Tagen in BM-MS- und AT-MS-basierten Sphäroiden demonstriert. Aufgrund der Daten war keine Reduktion der Vitalität durch die Kultivierung mit dem osteogenen Differenzierungsmedium oder durch das Impedanzmesssystem abzuleiten. In den hES-H1-basierten Sphäroiden wurden tote Zellen im Inneren der Aggregate detektiert. Dieses Phänomen war besonders ausgeprägt in den Kontrollen und lässt auf Nekrose schließen.

BM-MS



AT-MS



hES H1

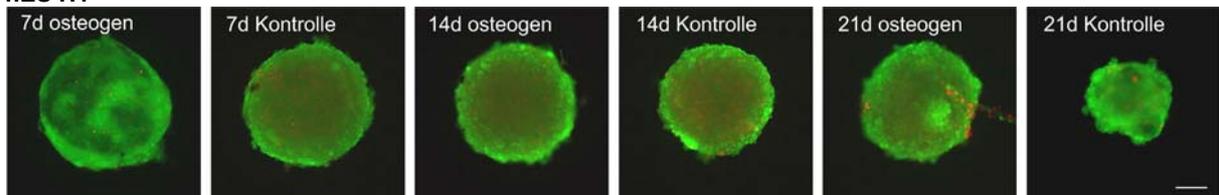


Abb. 66: Untersuchung der Vitalität der Sphäroide nach impedanzspektroskopischer Charakterisierung mittels FDA/Pi-Färbung. Vitale Zellen wurden grün gefärbt, während tote Zellen rot markiert wurden. Balken = 100 µm.

Histologie

Nach erfolgter impedanzspektroskopischer Charakterisierung der Sphäroide wurden Kryoschnitte angefertigt. Anhand der Schnitte wurde die Aktivität der ALP (ALP-Färbung; positive Induktion rot bzw. blau markiert), die Expression kollagenhaltiger ECM (Kollagen-1-Immunfärbung; positive Strukturen waren rot) sowie deren Kalzifizierung (von Kossa-Färbung; kalzifizierte Bereiche wurden schwarz gefärbt) untersucht. In den BM-MS-basierten Sphäroiden (Passage 8) (**Abb. 67**) wurde in Reaktion auf die osteogene Stimulation eine erhöhte Aktivität der ALP induziert. Die ALP-Aktivität war in dem äußeren Bereich der Sphäroide ringförmig exprimiert und war in den frühen Differenzierungsstadien,

nach 7 Tagen und 14 Tagen, stärker als nach 21 Tagen osteogener Stimulation. Die nativen Kontrollen zeigten eine negative ALP-Aktivität und eine starke Expression von fibrillärem Kollagen-1, die im Kulturverlauf von Tag 7 bis hin zu Tag 21 tendenziell geringer war. Im Vergleich dazu erfolgte in den osteogenen Sphäroiden kein immunhistologischer Nachweis von Kollagen-1. Dieses ist auf eine Maskierung der Kollagenfibrillen in Folge des Kalzifizierungsprozesses zurückzuführen. Die von Kossa-Färbungen der osteogenen Sphäroide waren bereits nach 7 Tagen osteogener Stimulation dunkler gefärbt als die Kontrollen. Nach 21 Tagen wurde eine eindeutige Kumulation von extrazellulärem Kalzium nachgewiesen.

In AT-MSC-basierten Sphäroiden der Charge 2 (Passage 8) (**Abb. 68**) wurde weder in den osteogenen noch in den nativen Sphäroiden eine Induktion der ALP-Aktivität nachgewiesen. Im Vergleich zu den BM-MSCs, die nach 21 Tagen osteogener Stimulation mineralisierte ECM exprimierten, erfolgte eine großflächige Kalzifizierung der AT-MSC-Sphäroide bereits nach 14 Tagen. Fibrilläres Kollagen-1 wurde verstärkt zu Beginn der Kultivierung in den nativen und osteogenen Sphäroiden detektiert.

Des Weiteren wurden AT-MSCs der Charge 3 (Passage 5) in einer weiteren Impedanzmessreihe nach 7 Tagen, 14 Tagen, 21 Tagen und 30 Tagen charakterisiert (**Abb. 69**). In diesen Sphäroiden wurde keine Knochenformation induziert. Es wurde keine Kalzifizierung der ECM demonstriert und im Vergleich zu den nativen Kontrollsphäroiden waren keine Unterschiede in der Kollagen-1-Expression erkennbar. Die Kollagen-1-Expression nahm im Kulturverlauf zu, bildete aber keine fibrilläre Struktur aus. Darüber hinaus wurde in den nativen Sphäroiden eine hohe ALP-Aktivität demonstriert, die sowohl in den äußeren und als auch in den inneren Bereichen der Sphäroide lokalisiert war. Demgegenüber war die ALP-Aktivität der osteogenen Sphäroide ringförmig in den äußeren Bereichen konzentriert.

Eine histologische Untersuchung der hES H1-basierten Sphäroide (**Abb. 70**) demonstrierte eine geringere zelluläre Dichte und inhomogene Zellverteilung in den Sphäroiden. Anhand der histologischen Schnitte wurden Löcher identifiziert. Selbst nach einer Kulturperiode von 21 Tagen war die Zellverteilung inhomogen, die Schnitte präsentierten einen losen Verbund unterschiedlicher zellulärer Strukturen. Die Kontrollsphäroide waren insgesamt kleiner und zeigten im Kulturverlauf eine Tendenz zur Disaggregation. Die resultierenden Aggregate ähnelten stark den hohlen EBs. In den Sphäroiden wurde keine ALP-Expression oder Kalzifizierung induziert. Die Untersuchung der Expression osteoblastentypischer Gene mittels *real time* PCR (**Abb. 43**) zeigte keine Induktion von Kollagen-1. Daher wurde auf einen histologischen Nachweis verzichtet. Zudem konnte in keinem Experiment dieser Arbeit die osteogene Differenzierung der hES H1-basierten Sphäroide gezeigt werden (**Abb. 41**).

3.3 Impedanzspektroskopische Charakterisierung der osteogenen Differenzierung in 3D

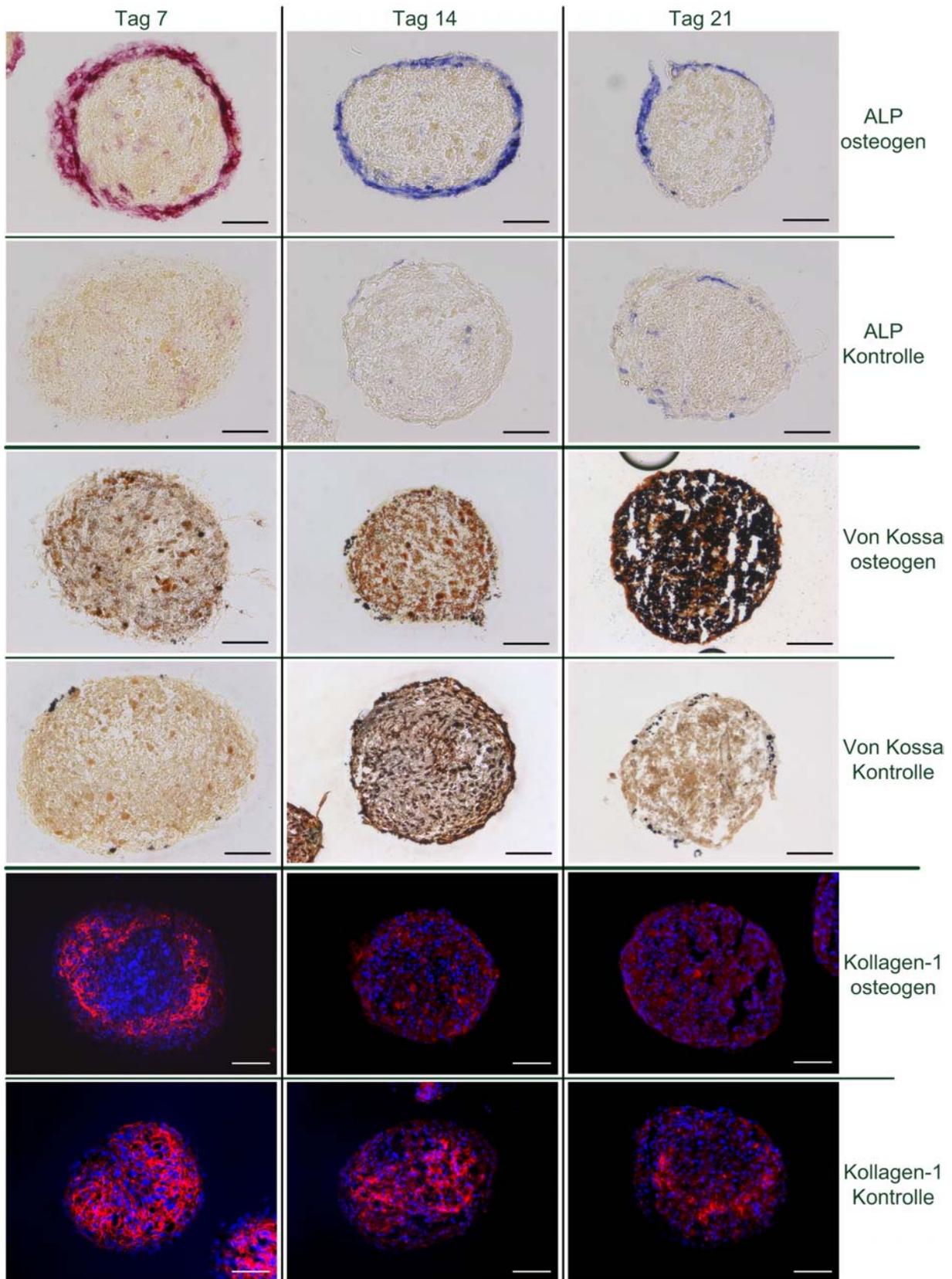


Abb. 67: Untersuchung der osteogenen Differenzierung in BM-MSK-basierten Sphäroiden (Passage 8) nach impedanzspektroskopischer Charakterisierung. Untersucht wurde die Aktivität der ALP (rot bzw. blau), die Kalzifizierung der ECM mittels von Kossa-Färbung (schwarz) und die Expression von Kollagen-1 (rot). Balken = 100 µm.

3. Ergebnisse

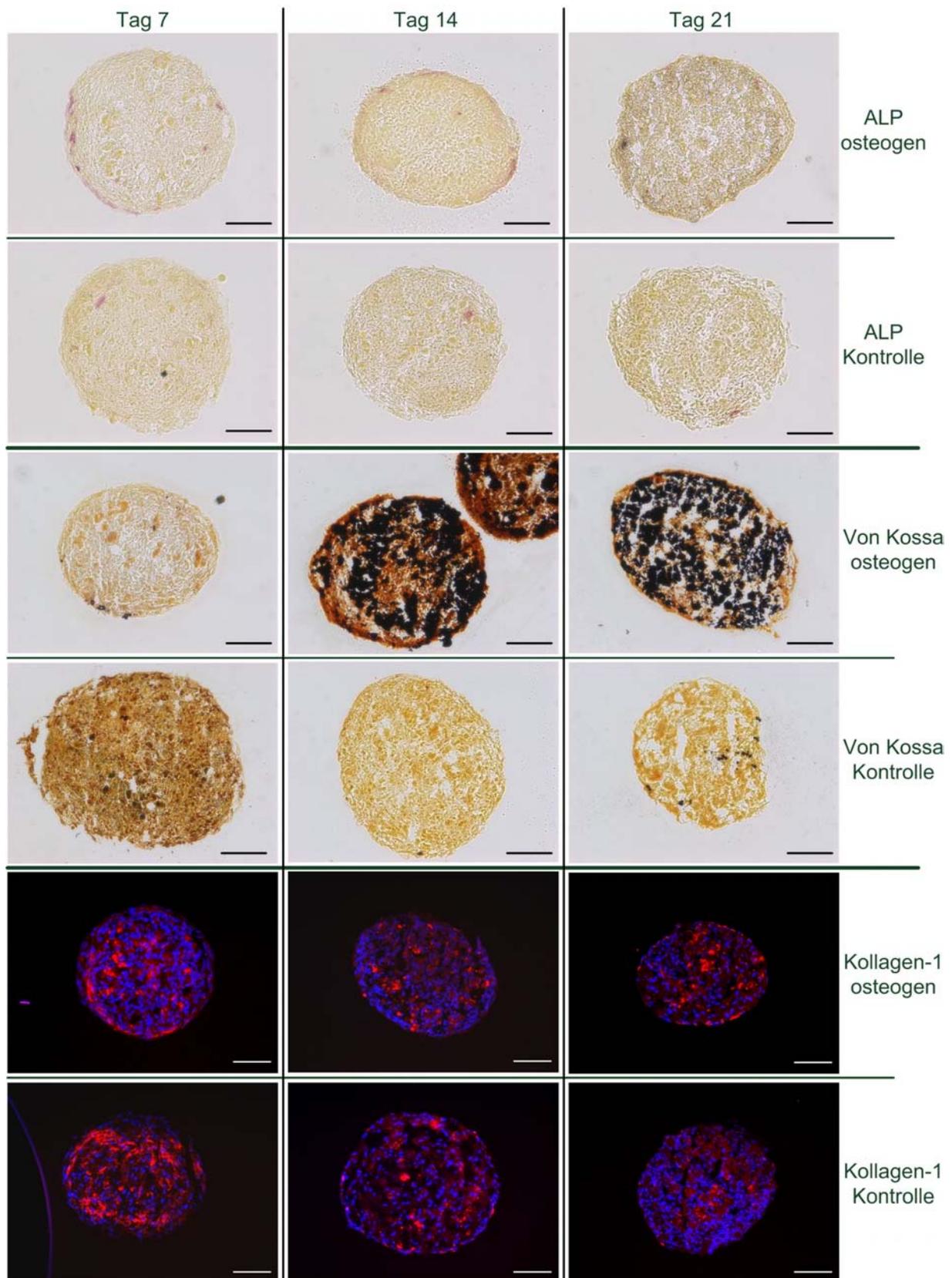


Abb. 68: Untersuchung der osteogenen Differenzierung in AT-MSC-basierten Sphäroiden (Charge 2, Passage 8) nach impedanzspektroskopischer Charakterisierung. Untersucht wurde die ALP-Expression (rot bzw. blau), die Kalzifizierung der ECM mittels von Kossa-Färbung (schwarz) und die Expression von Kollagen-1 (rot). Balken = 100.

3.3 Impedanzspektroskopische Charakterisierung der osteogenen Differenzierung in 3D

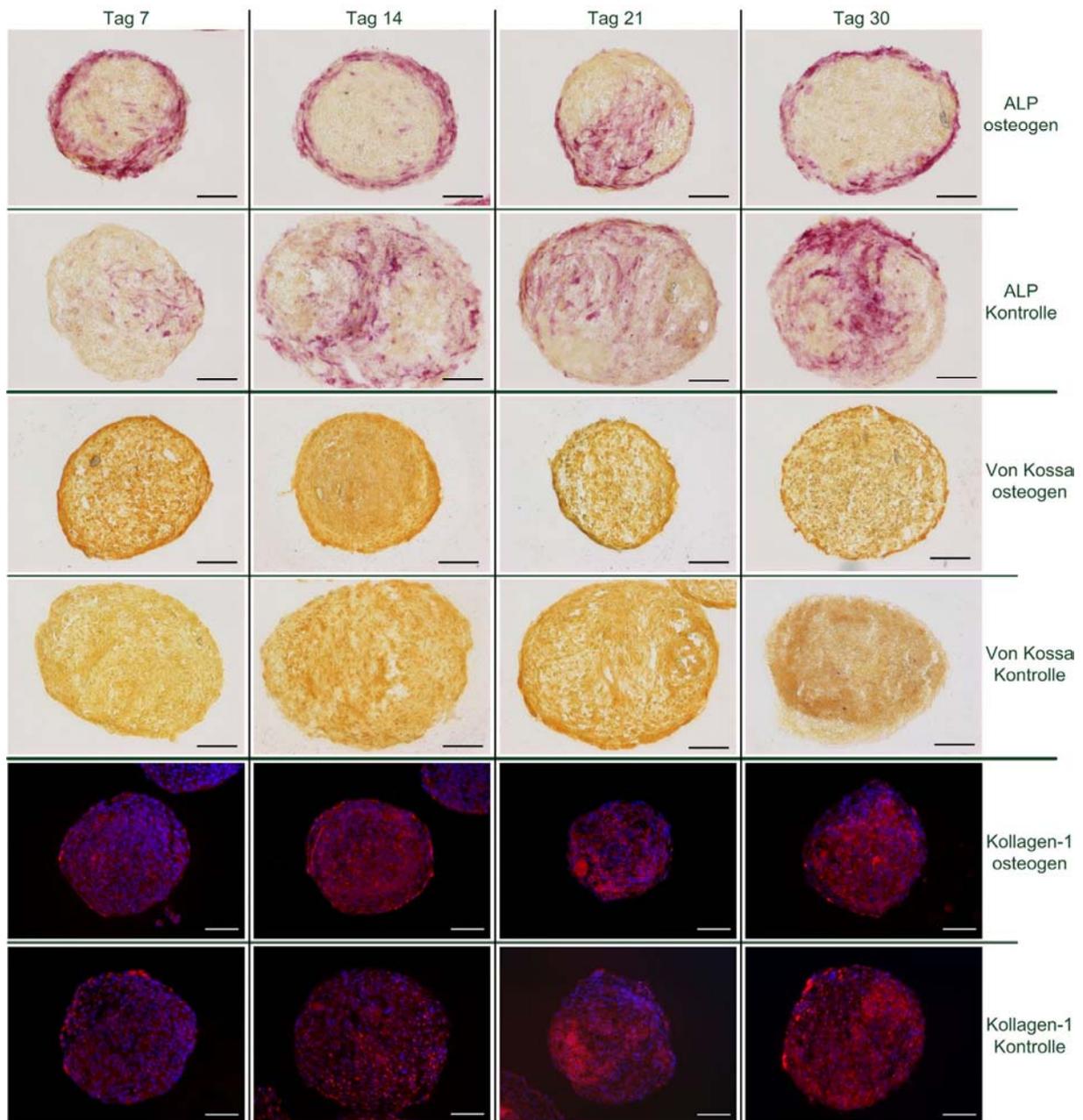


Abb. 69: Untersuchung der osteogenen Differenzierung in AT-MSC-basierten Sphäroiden (Charge 3, Passage 5, negatives osteogenes Potential) nach impedanzspektroskopischer Charakterisierung. Untersucht wurde die ALP-Expression (rot), die Kalzifizierung der ECM mittels von Kossa-Färbung (schwarz) und die Expression von Kollagen-1 (rot). Balken = 100.

3. Ergebnisse

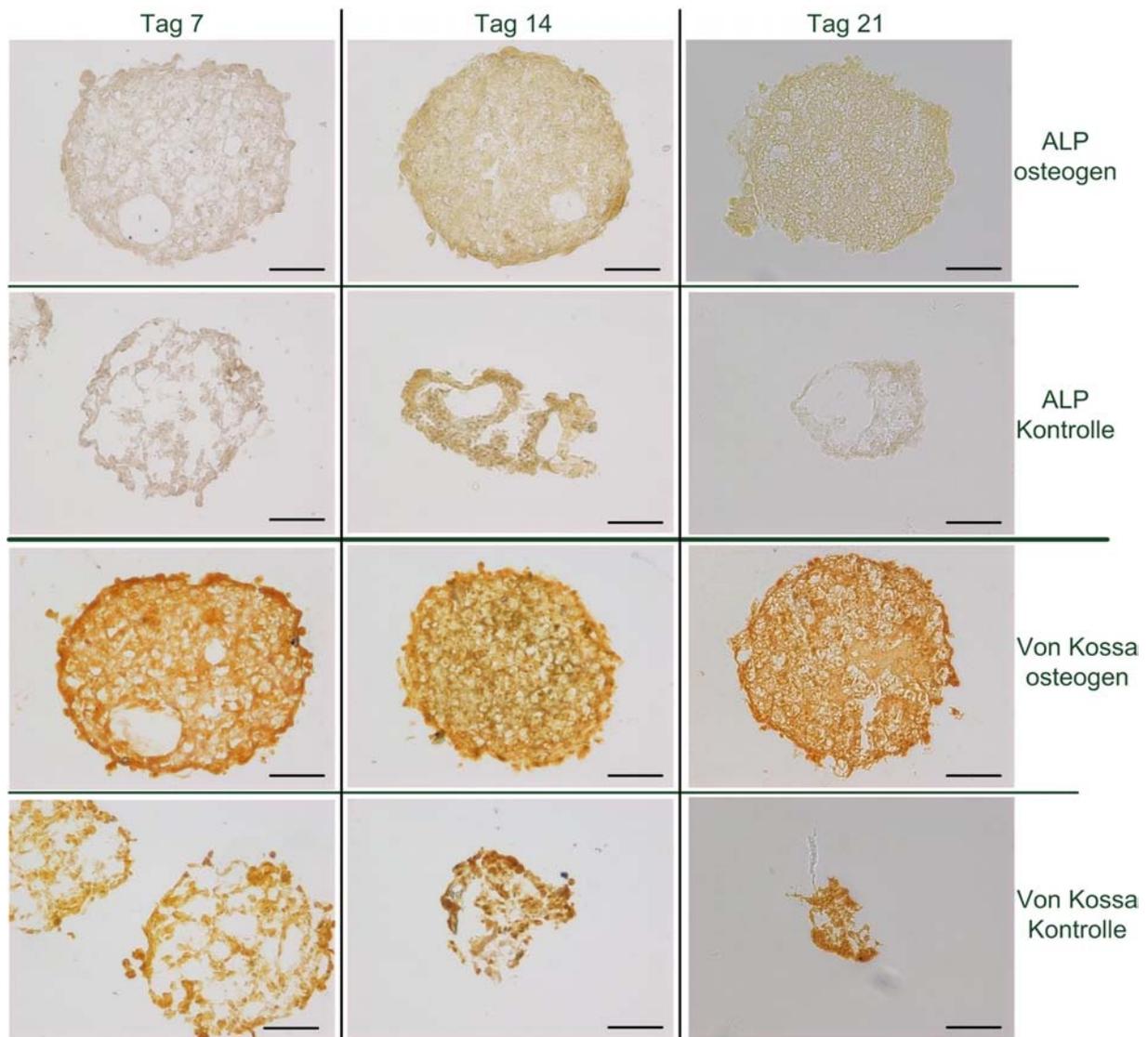


Abb. 70: Untersuchung der osteoblastentypischen ALP-Expression (rot) und Mineralisierung (von Kossa-Färbung, schwarz) in hES H1 nach impedanzspektroskopischer Charakterisierung. Beide Marker waren negativ. Balken = 100.

3.4 Charakterisierung der multipotenten Differenzierung mittels akustischer Mikroskopie

Die Charakterisierung der multipotenten Differenzierung der Stammzellen mittels akustischer Mikroskopie erfolgte exemplarisch in BM-MSC-Kulturen. Es sollte untersucht werden, ob die mechanischen Eigenschaften spezifisch sind und folglich dieses Verfahren geeignet ist zur Charakterisierung von Differenzierungsprozessen. Die mechanischen Eigenschaften von Zellen und Zellverbänden werden im Allgemeinen durch das Zytoskelett, die extrazelluläre Matrix, die Zellorganellen und den Zytoplasmagehalt bestimmt. Zur Interpretation der Ultraschalldaten wurden die spezifischen Änderungen dieser morphologischen Eigenschaften bei der adipogenen, chondrogenen und osteogenen Differenzierung untersucht. Diese Untersuchungen erfolgten nach akustischer Charakterisierung der Zellkulturen.

3.4.1 Darstellung vitaler BM-MSCs mittels akustischer Mikroskopie

Die vitalen BM-MSC-Kulturen wurden nach Differenzierung in Adipozyten, Chondroblasten und Osteoblasten mit hochfrequentem Ultraschall bei 1 GHz charakterisiert. In zwei unabhängigen Versuchsreihen wurde der Differenzierungsprozess zu einem frühen Zeitpunkt, 15 - 18 Tage Kultivierungszeit, und zu einem späteren Zeitpunkt, 22 - 25 Tage Kultivierungszeit, untersucht. Pro Zellkultur wurden 5 - 7 repräsentative Bereiche dokumentiert. Die akustischen Signale wurden als horizontale Schichtbilder (C-Projektion) abgebildet. Es wurde exemplarisch ein repräsentatives Beispiel für jede Differenzierungsrichtung ausgewählt. Zur Interpretation der im Ultraschallbild dargestellten zellulären und subzellulären Strukturen wurden jeweils das korrespondierende Phasenkontrastbild und die Fluoreszenzaufnahme der DiOC-Membranfärbung herangezogen. Diese Färbung ermöglichte eine Diskriminierung des Zellkörpers von dem Zellkultursubstrat oder der ECM.

Die nativen BM-MSCs-Kulturen sowie die adipogen differenzierten Zellen präsentierten bereits nach einer kurzen Kulturperiode (15 - 18 Tage) einen terminalen Phänotyp. Nach Erreichen der Konfluenz bzw. nach Differenzierung in Adipozyten wurden keine wesentlichen Unterschiede in der Zellmorphologie oder der akustischen Eigenschaften durch eine Verlängerung der Kulturdauer induziert. Die zellulären Strukturen, die in der Phasenkontrastaufnahme und der DiOC-Membranfärbung abgebildet wurden, konnten ebenfalls in den Ultraschallaufnahmen identifiziert werden. Die konfluenten MSCs zeigten eine spindelförmige Morphologie und eine annähernd parallele Orientierung (**Abb. 71**). In den adipogen differenzierten Zellkulturen waren individuelle Zellen mit intrazellulären Lipidvakuolen erkennbar (**Abb. 72**).

Die Phasenkontrastaufnahme einer frühen Chondroblastenkultur zeigte einen konfluenten Zelllayer mit runden Strukturen (**Abb. 73**). Durch den Vergleich mit der DiOC-Membranfärbung wurden die runden Strukturen als individuelle Zellen identifiziert, die in einer extrazellulären Matrix eingebettet waren. In der Ultraschallaufnahme war der Zellkörper von der umgebenen ECM durch die unterschiedlichen Reflektivitäten zu diskriminieren und es wurden der Nukleus mit den Nucleoli und filamentartige Strukturen (wahrscheinlich Aktin) abgebildet. Die Expression einer knorpeltypischer ECM konnte durch eine histologische Untersuchung auf saure Mucosubstanzen und Proteoglykan bestätigt werden (**vgl.**

3. Ergebnisse

Abschnitt 3.4.5). Im Gegensatz zu der chondrogenen Differenzierungsrichtung waren die Osteoblastenkulturen nach 17 Tagen Stimulation nicht terminal differenziert (**Abb. 74**). Die Zellkulturen waren positiv für ALP und Kollagen-1, präsentierten aber keine mineralisierte ECM. Die Osteoblasten waren insgesamt kleiner und wuchsen stark konfluent, dennoch konnten individuelle zelluläre Strukturen und Nuklei im Ultraschallbild identifiziert werden.

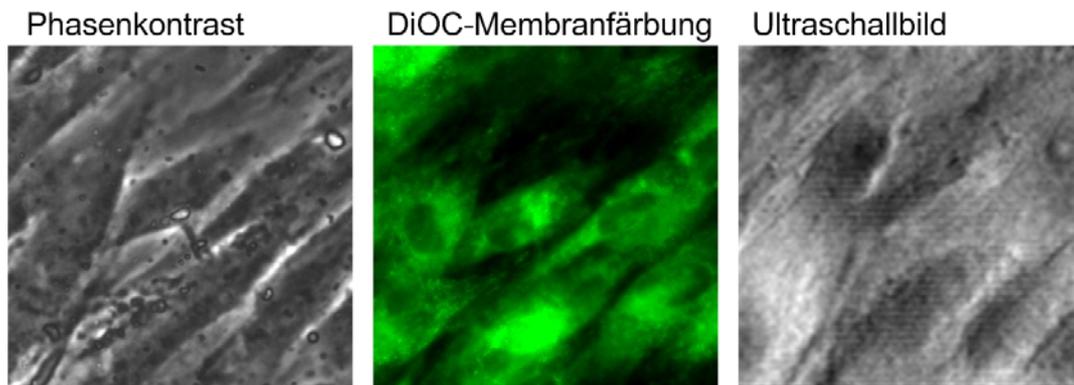


Abb. 71: Darstellung nativer BM-MSCs am Kulturtag 21. Bildgröße: 100 μm x 100 μm .

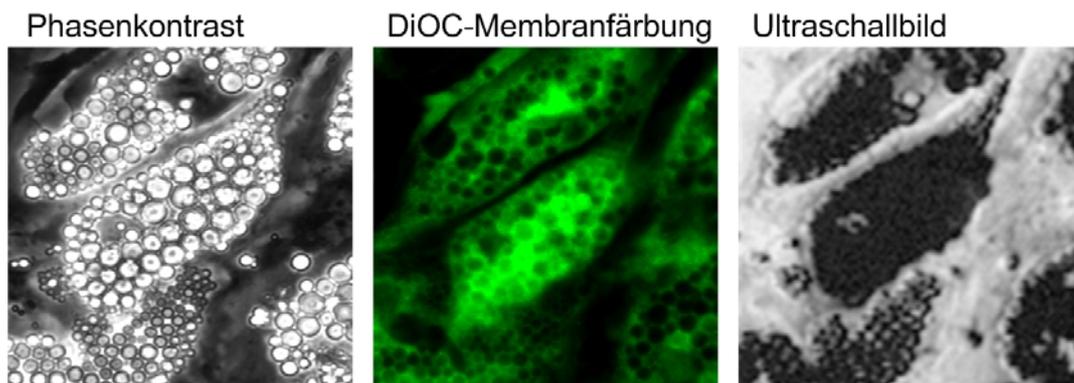


Abb. 72: Darstellung von Lipidvakuolen nach 16 Tagen adipogener Differenzierung der BM-MSCs. Bildgröße: 100 μm x 100 μm .

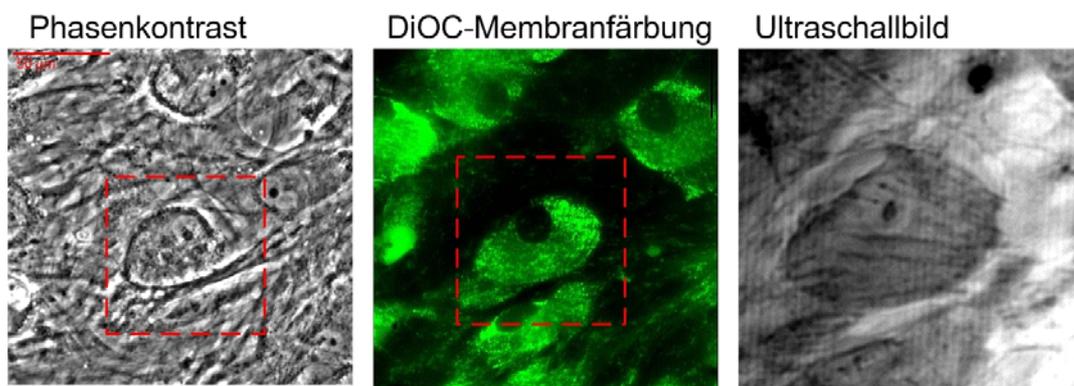


Abb. 73: Darstellung von Chondroblasten nach einer Differenzierungsperiode von 18 Tagen. Der Ausschnitt des Ultraschallbildes wurde rot gekennzeichnet. Bildgröße: 100 μm x 100 μm .

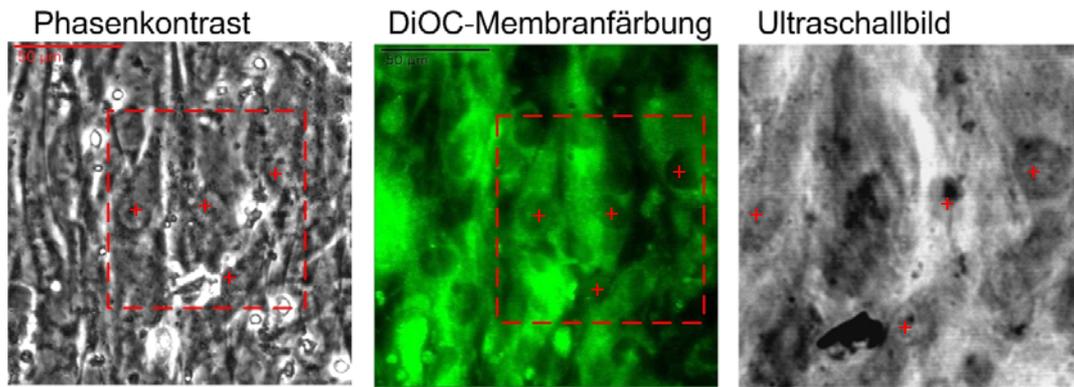


Abb. 74: Darstellung von BM-MSCs nach 17 Tagen osteogener Stimulation. Der Ausschnitt des Ultraschallbildes wurde rot gekennzeichnet. Exemplarisch wurden einige Nuklei in der Ultraschallaufnahme markiert (rotes Kreuz) sowie die korrespondierenden Positionen im Phasenkontrast und in der DiOC-Membranfärbung. Bildgröße: 100 μm x 100 μm .

Zur Strukturaufklärung der ECM-Expression wurden terminal differenzierte Chondroblasten- und Osteoblastenkulturen charakterisiert. Um die Expression innerhalb des Zelllayers zu untersuchen, wurden die detektierten Reflexionen (Frontecho, interne Echos und Substratecho) als horizontale Schichtbilder (C-Projektion) mit einer zeitlichen Auflösung von 2 ns dargestellt. Dies entsprach einer Schichtdicke von 1,5 μm . Zur Veranschaulichung der Struktur der ECM innerhalb eines Zelllayer wurden exemplarisch Schichtbilder mit einem Abstand von 3,0 - 4,5 μm ausgewählt.

In den Chondroblastenkulturen (**Abb. 75**) wurde durch eine Verlängerung der Kultur- und Differenzierungsperiode auf 24 Tage die Ausbildung einer stark konfluenten, mehrschichtigen Zellkultur induziert. Individuelle zelluläre Strukturen waren nicht mehr zu diskriminieren im Gegensatz zu der Ultraschallanalyse am Tag 18 (vgl. **Abb. 73**). Die Oberseite der konfluenten Chondroblastenkultur wurde in **Ultraschallbild 1 (Abb. 75)** dargestellt. Es waren drei dunkle Strukturen (grüne Kreuze) erkennbar, die mit der DiOC-Membranfärbung korrespondierten. In den **Ultraschallbildern 2 - 5** wurden fibrilläre Strukturen auf verschiedenen Ebenen des Zelllayers abgebildet. Eine Darstellung mehrerer Zellkörper und ihrer Nuklei (rote Kreuze) erfolgte in **Ultraschallbild 6**. Diese Zellen waren auf der Unterseite des Zelllayers lokalisiert. Die entsprechenden Ortskoordinaten dieser tief liegenden Zellen wurden in der Phasenkontrastaufnahme markiert. In **Ultraschallbild 7** wurden ebenfalls fibrilläre Strukturen dargestellt, diese Strukturen waren auf der Zellunterseite lokalisiert. In **Ultraschallbild 8 und 9** wurden im Wesentlichen die Reflexionen der Substratebene abgebildet. Diese Aufnahmen repräsentierten die Reflexion des Schalls, der nicht direkt von den darüber liegenden zellulären Strukturen reflektiert wurde. **Ultraschallbild 8** zeigte die adhärennten Zellkörper auf dem Glassubstrat, während in **Ultraschallbild 9** fibrilläre Strukturen im Substratecho dargestellt wurden.

3. Ergebnisse

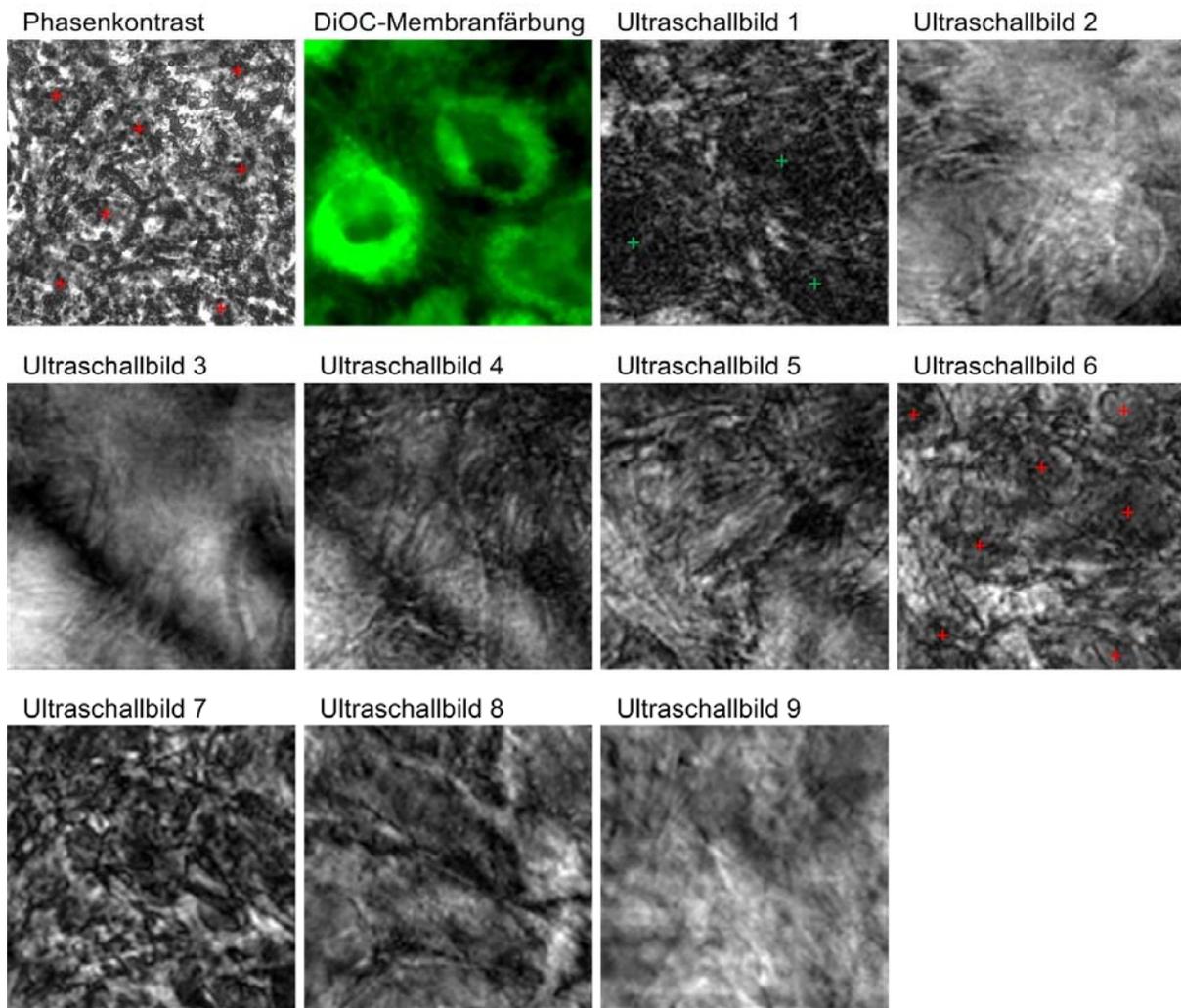


Abb. 75: Darstellung zellulärer Strukturen und fibrillärer ECM innerhalb einer mehrschichtigen Chondroblastenkultur. Abgebildet wurden Schichtbilder einer BM-MSC-Kultur nach 24 Tagen chondrogener Induktion. Die Kreuze markieren individuelle Zellen. Bildgröße: 100 µm x 100 µm.

Nach 25 Tagen osteogener Stimulation waren die BM-MSC-Kulturen terminal differenziert (**Abb. 76**), wie die großflächige Expression mineralisierter ECM und die hohe Aktivität der ALP belegen (vgl. **Abschnitt 3.4.5**). In der Phasenkontrastaufnahme wurde eine konfluente Zellkultur abgebildet. Diskrete zelluläre Strukturen waren nicht zu unterscheiden, aber auf der Oberfläche der Zellkultur war die fibrilläre Struktur der Kollagen-1-Matrix erkennbar. Demgegenüber ermöglichte das Ultraschallverfahren eine Diskriminierung zellulärer Strukturen auf der Zellkulturoberfläche (**Ultraschallbild 1**). Dargestellt wurden mehrere Nuklei, sehr gut erkennbar anhand der schwarzen Punkte, die die Nucleoli markieren. Exemplarisch wurden einige dieser Strukturen markiert (rotes Kreuz) sowie die korrespondierenden Positionen in der Phasenkontrastaufnahme und der DiOC-Membranfärbung. Des Weiteren wird eine diagonale Segmentierung des Zelllayers abgebildet, die sich ebenfalls in der DiOC-Membranfärbung abzeichnete. Diese Segmentierung zeigte die Orientierung der Zellen. Innerhalb des Zelllayers wurden auf verschiedenen Ebenen fibrilläre Strukturen dargestellt (**Ultraschallbild 2 - 5, Abb. 76**). Im Gegensatz zu den Chondroblastenkulturen waren die fibrillären Strukturen stark granulär. Das Substratecho wurde in **Ultraschallbild 6** gezeigt.

3.4 Charakterisierung der multipotenten Differenzierung mittels akustischer Mikroskopie

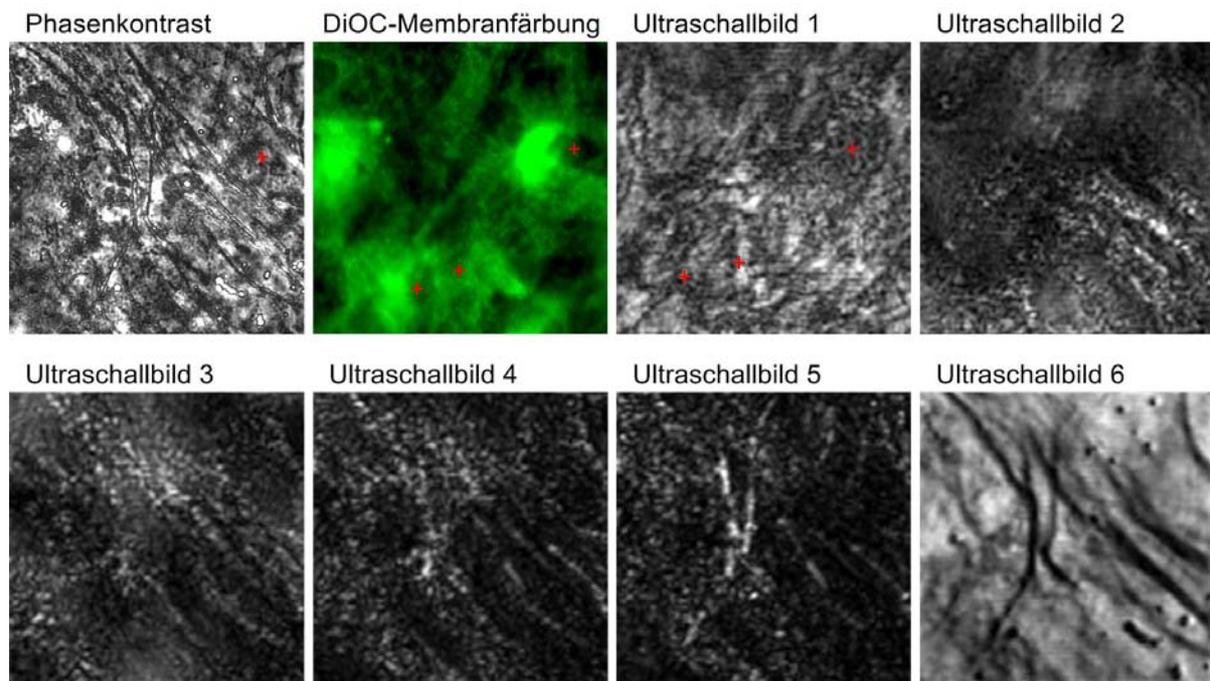


Abb. 76: Darstellung zellulärer Strukturen und fibrillärer ECM innerhalb einer mehrschichtigen Osteoblastenkultur. Abgebildet wurden Schichtbilder einer BM-MSK Kultur nach 25 Tagen osteogener Induktion. Bildgröße: 100 μm x 100 μm .

3.4.2 Quantifizierung der mechanischen Eigenschaften

Um die mechanischen Eigenschaften der verschiedenen Differenzierungsrichtungen zu bestimmen, wurden die Intensitäten des Frontechos und des Substratechos quantifiziert. Die Intensität des reflektierten Schalls wurde in pJ angegeben (**Tab. 11**). Das Frontecho stellt im Wesentlichen die Reflexionen auf den Zellen und den oberflächenassoziierten Strukturen dar, wodurch die Kompression oder auch Steifigkeit widerspiegelt wird. Das Substratecho quantifiziert den Anteil des Schalls, der den Zelllayer durchdrungen hat. Dieses Signal steht in erster Näherung für die Viskosität. Das Verhältnis der Reflexionsintensität zur Viskosität ist antiproportional, da Substanzen und Materialien mit viskosen Eigenschaften den applizierten Schall stärker adsorbieren.

Tab. 11: Quantifizierung der zellspezifischen Echos von Adipozyten, Osteoblasten und Chondroblasten (n = 20). Angegeben wurden die durchschnittlichen Intensitäten des Substrat- und des Frontechos in Picojoule (pJ) und die durchschnittliche prozentuale Standardabweichung (SD) der Reflexionen.

	Substratecho [pJ]	SD	Frontecho [pJ]	SD
Adipozyten	75	12%	0,350	21%
Osteoblasten	38	4%	0,200	10%
Chondroblasten	37	7%	0,125	8%

3. Ergebnisse

Die Reflexionsintensitäten des Substratechos und des Frontechos waren in den Adipozyten am höchsten. Dies indiziert einerseits die hohe mechanische Steifigkeit der Zellen, andererseits einen hohen Anteil intrazellulärer Komponenten vergleichsweise geringer Viskosität, die eingelagerten Lipide. Im Vergleich zu den Adipozyten waren die untersuchten Chondroblasten und Osteoblasten viskose Zellen, woraus eine größere Dämpfung des Substratechos resultierte. Dabei unterschieden sich die Chondroblasten von den Osteoblasten nur geringfügig in ihrer Viskosität, aber in der Steifigkeit der Zellen und den abgebildeten zellulären Strukturen. Das Frontecho der Osteoblasten demonstrierte eine höhere Schallintensität als die Chondroblasten. Diese höhere Reflektivität indizierte die höhere Steifigkeit dieser Zellen.

3.4.3 Darstellung BM-MSC-basierter Sphäroide

Der osteogene Entwicklungsprozess der BM-MSCs wurde in 3D-Sphäroidkulturen untersucht. Diese Experimente erfolgten parallel zu der impedanzspektroskopischen Charakterisierung. Aufgrund der Größe der Aggregate (ca. 300 - 400 μm) war eine Vermessung bei 1 GHz nicht ideal, da aufgrund der geringen Durchdringungstiefe nur die Oberfläche erfasst wurde. Die Untersuchungen erfolgten bei 400 MHz, wodurch eine höhere Durchdringungstiefe ermöglicht wurde, verbunden mit einer geringeren Auflösung. Dargestellt wurden die horizontalen C-Projektionen des Frontechos in unterschiedlichen Durchdringungstiefen (**Abb. 77**). Auf der Außenseite des Sphäroides war die unregelmäßige Oberfläche des Aggregates zu erkennen und es wurden fibrilläre Strukturen dargestellt. Im Inneren des Sphäroides erfolgte keine Darstellung diskreter zellulärer Strukturen. Bei maximaler Durchdringungstiefe (ca. 150 μm) waren dunkle Bereiche erkennbar. Eine Abbildung von nekrotischen Bereichen konnte aufgrund der histologischen Befunde ausgeschlossen werden (**vgl. Abschnitt 3.3.10, Abb. 67**). Auch bei 400 MHz war die Durchdringungstiefe nicht ausreichend, um den gesamten Sphäroid in seiner Tiefe zu erfassen. Dementsprechend konnten keine Signale des Substratechos detektiert werden.

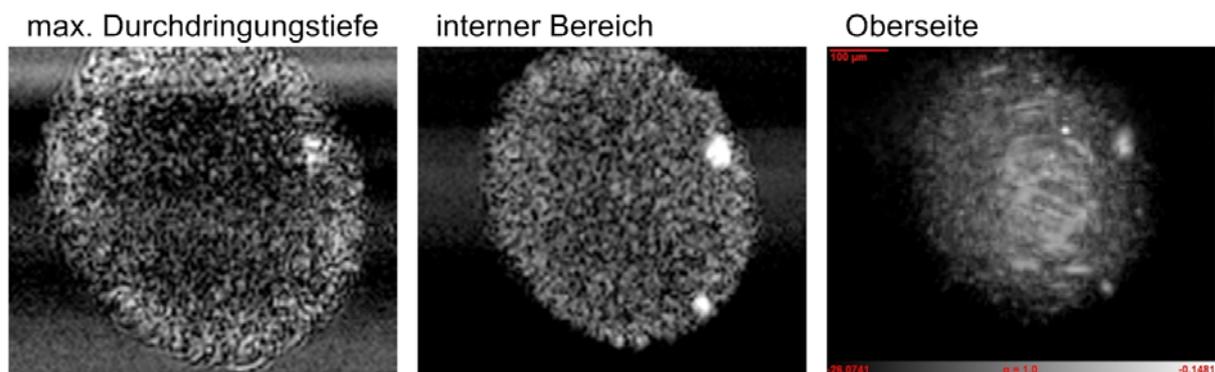


Abb. 77: Rekonstruktion eines BM-MSC-Sphäroides nach 21 Tagen osteogener Differenzierung. Dargestellt sind die C-Projektionen der Echos in unterschiedlichen Schichttiefen bei 400 MHz.

3.4.4 Untersuchung des Aktinzytoskeletts

Die strukturellen Änderungen des Aktinzytoskeletts bei der Differenzierung wurden mittels Phalloidin-Färbung untersucht (**Abb. 78**). In nativen BM-MSCs wurden dicke und langgestreckte Aktinfilamente demonstriert, die im Wesentlichen parallel orientiert waren. Nach Differenzierung in Chondroblasten formten die Aktinfilamente runde, nestartige Strukturen. Die Faserbündel in den Chondroblasten waren dünner und stärker vernetzt als in den nativen BM-MSCs. Osteoblasten hingegen präsentierten übereinanderliegende Einheiten aus kurzen, breit-gefächerten Aktinfilamenten. Das Aktinzytoskelett in Adipozyten bildete ein ausgeprägtes Netzwerk aus dünnen Fasern, welche die Lipidvakuolen stützten. Diese fein strukturierten Aktinfasern wurden dominant im gesamten intrazellulären Raum exprimiert. In zellulären Bereichen ohne Fetteinlagerungen wurden dickere Aktinfaserbündel detektiert. Im Gegensatz zu den nativen BM-MSCs waren die Filamente nicht parallel orientiert sondern flächig-gespreizt. Durch die Struktur der Aktinfilamente wurde im Wesentlichen die Zellmorphologie wiedergespiegelt. BM-MSCs waren spindelförmig und wuchsen bei Konfluenz parallel, Chondroblasten waren relativ große, runde Zellen, während Osteoblasten kleiner und cuboidal waren. In Adipozyten wurden die Lipidvakuolen durch das Aktinzytoskelett geformt.

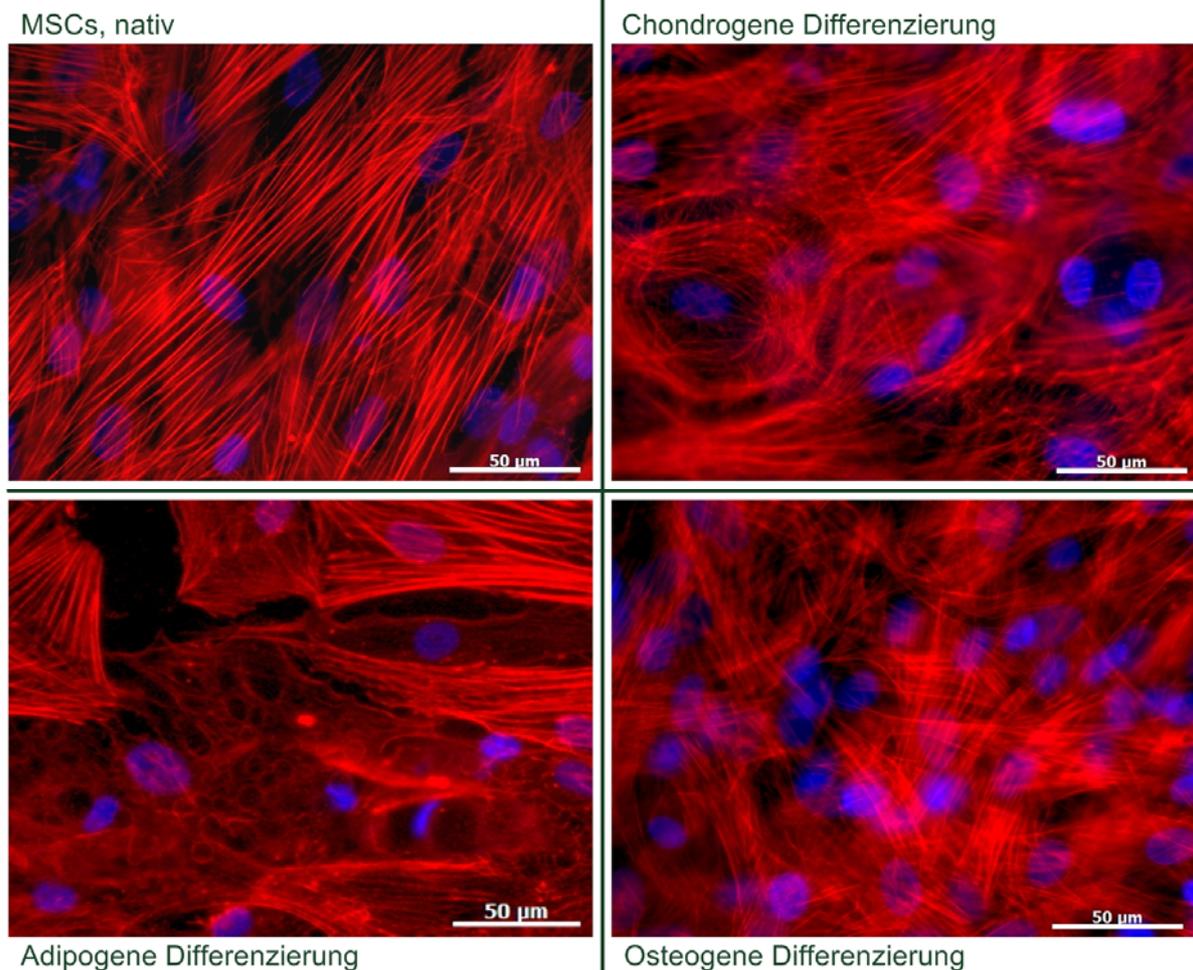


Abb. 78: Darstellung des Aktinzytoskeletts in BM-MSCs nach Differenzierung in Chondroblasten, Adipozyten und Osteoblasten mittels Phalloidin-Färbung.

3.4.5 Untersuchung der extrazellulären Matrix und spezifischer Zellorganellen

Die Differenzierung der Zellkulturen wurde nach erfolgter akustischer Charakterisierung histologisch untersucht. Die für die jeweiligen Gewebe spezifische Zusammensetzung der extrazellulären Matrix und Zellorganellen sind hinlänglich bekannt. Dennoch war es notwendig die charakteristischen Strukturen mittels konventioneller Methoden darzustellen (**Abb. 79**), um die Ergebnisse mit den akustischen Daten zu vergleichen.

Nach chondrogener Stimulation der BM-MSK-Kulturen wurde nach 18 Tagen die Expression saurer Mukosa (Alcianblau-Färbung) und Chondroitinsulfat (Safranin O-Färbung) nachgewiesen. Diese ECM-Komponenten erstreckten sich über die gesamte Zellkultur. Zur Demonstration der faserartigen Struktur der chondroblastentypischen ECM erfolgte eine Immunfärbung gegen Proteoglykan. Auf einen Nachweis der chondroblastentypischen Expression von Kollagen-2 wurde verzichtet. Die histologischen Befunde sowie die chondroblastenartige Morphologie zeigten die erfolgte Differenzierung, außerdem wurde im Rahmen dieser Arbeit die typische Struktur von fibrillärem Kollagen bereits bei der Osteoblastendifferenzierung gezeigt. Nach 19 Tagen osteogener Induktion wurde mittels Kollagen-1-Immunfärbung die großflächige Expression einer fibrillären Kollagenmatrix demonstriert. Im Weiteren Kulturverlauf (ab Tag 25) erfolgte die Mineralisierung der Osteoblasten. Die ausgewählte Abbildung repräsentiert einen Bereich mit geringer Mineralisierung. Es sind die kalzifizierten Strukturen der fibrillären Kollagenmatrix erkennbar.

Die Differenzierung der MSCs in Adipozyten wurde mittels Oil red O-Färbung untersucht. Es wurden intrazelluläre Lipidvesikel nachgewiesen, ansonsten präsentierten die Zellen eine strukturlose Zelloberfläche mit einem geringen Anteil extrazellulärer Matrix. Als Kontrolle wurde bei jeder Färbung eine parallele Probe mit nicht differenzierten MSCs mitgeführt. Die Kontrollen waren negativ für die untersuchten Differenzierungsmarker und wurden nicht abgebildet.

3.4 Charakterisierung der multipotenten Differenzierung mittels akustischer Mikroskopie

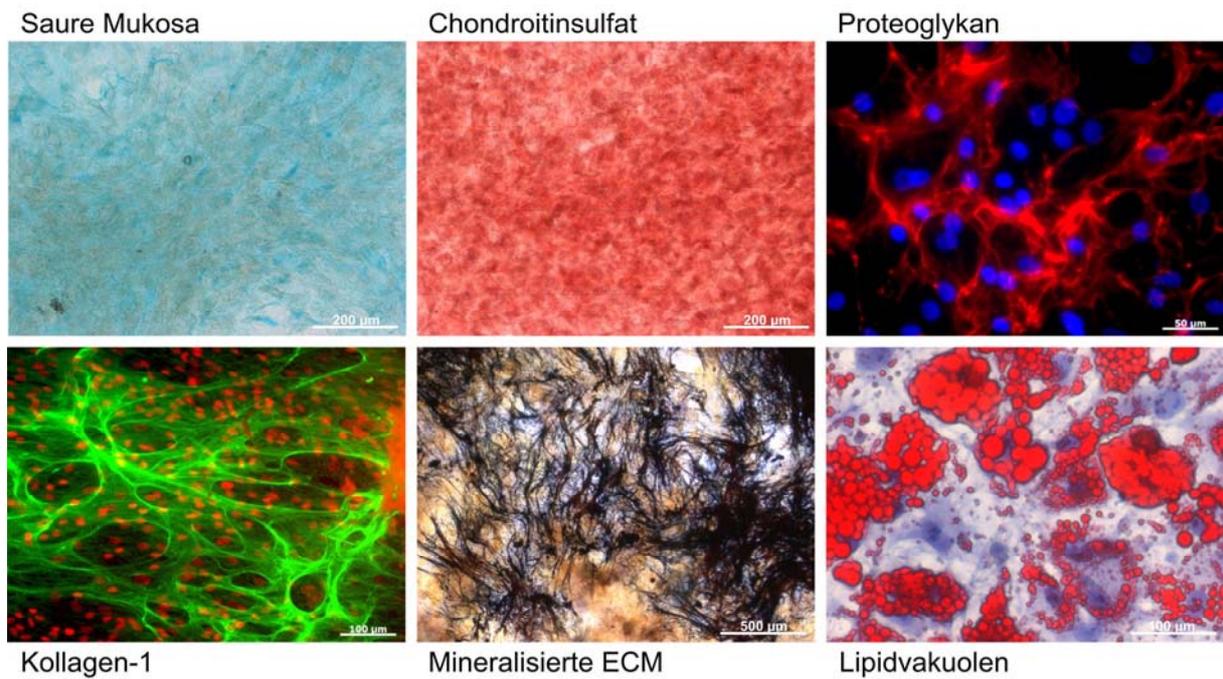


Abb. 79: Multipotente Differenzierung der BM-MSCs. Nach Differenzierung in Chondroblasten wurden eine dominante Expression saurer Mukosubstanzen (Alcianblau-Färbung, blau) und Chondroitinsulfat (Safranin O-Färbung, rot) nachgewiesen. Zur Veranschaulichung der faserartigen Struktur der Chondroblastenmatrix erfolgte die Darstellung von Proteoglykan mittels Immunfärbung (rot). Nachweis von fibrillärem Kollagen-1 mittels Immunfärbung (grün) in Osteoblasten und Mineralisierung der extrazellulären Matrix. In Adipozyten wurden Lipidvakuolen mit der Oil red O-Färbung (rot) dargestellt.

4. Diskussion

4.1 Grundlegende Charakterisierungen der Zellkulturen

Das Potential humaner mesenchymaler Stammzellen und humaner embryonaler Stammzellen ist Gegenstand intensiver Forschung. Die mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark stellen die am besten charakterisierte Population dar, aber MSCs können ebenfalls aus anderen, leichter zugänglichen Geweben, wie dem Fettgewebe oder dem Nabelschnurblut, isoliert werden. Auch wenn das Vermögen humaner mesenchymaler Stammzellen sich *in vitro* zu replizieren und multipotent zu differenzieren konsolidiert ist, ist das finale Potential dieser primären Zellkulturen von zahlreichen Faktoren abhängig und noch nicht abschließend geklärt. Des Weiteren ist die Forschung an embryonalen Stammzellen noch nicht so weit fortgeschritten wie an adulten Stammzellen, so dass ein größerer Bedarf an geeigneten Verfahren zur Kultivierung und gerichteten Differenzierung dieser Zellen besteht. Daher war es erforderlich die humanen mesenchymalen Zellkulturen aus dem Knochenmark, dem Fettgewebe und dem Nabelschnurblut sowie die embryonale Zelllinie H1 im Rahmen dieser Arbeit vergleichend zu charakterisieren. Es wurden Kulturprotokolle für die Differenzierung der hES H1-Zellen etabliert und das spezifische Potential der einzelnen Populationen untersucht, um die Basis für eine weiterführende Applikation zu schaffen.

Charakterisierung der adulten mesenchymalen Stammzellen

Die Grundlage der Arbeit bildete eine vergleichende Charakterisierung der BM-MSCs, AT-MSCs und CB-MSCs hinsichtlich ihres Phänotyps, der replikativen Kapazität und der Homogenität der Zellkulturen. Während die untersuchten BM-MSC- und AT-MSC-Kulturen vergleichbare Eigenschaften zeigten, demonstrierten die CB-MSC-Kulturen deutliche Abweichungen. BM-MSCs und AT-MSCs präsentierten den typischen fibroblastoiden Phänotyp, der in der Literatur beschrieben wird (Kern *et al.*, 2006). Zwar entsprachen die CB-MSCs ebenfalls diesem Phänotyp, doch die Zellen zeigten eine ausgeprägtere Polarität und wuchsen nicht konfluent (**vgl. Abschnitt 3.1.1**). Des Weiteren wurde eine eingeschränkte proliferative Kapazität der CB-MSCs im Vergleich zu BM-MSCs und AT-MSCs durch Bestimmung der Populationsverdopplungen im Kulturverlauf belegt (**vgl. Abschnitt 3.1.2**). Zwar zeigten die eigenhändig isolierten BM-MSCs eine größere Varianz, die vier untersuchten Chargen befanden sich am Tag 75 in der Populationsverdopplung 7 - 19, doch diese Chargenschwankungen lassen sich auf das Isolationsmaterial zurückführen. Die BM-MSCs wurden aus Hüftgelenkköpfen von Spendern nach einer totalen Hüftgelenksplastik isoliert. Zwar lagen keine Informationen über die pathologischen Befunde vor, die schlussendlich diese Eingriffe motiviert hatten, dennoch waren osteoskelettale Erkrankungen der Spendergewebe wahrscheinlich. Zudem variierte das Alter der Spender zwischen 59 Jahren und 83 Jahren. Diese beiden Parameter, der gesundheitliche Zustand sowie das Alter der Spender, haben einen Einfluss auf die Qualität der isolierten Stammzellen hinsichtlich der proliferativen Kapazität sowie der osteogenen Differenzierbarkeit (D'ippolito *et al.*, 1999, Quarto *et al.*, 1995, Di Girolamo *et al.*, 1999, Wagner *et al.*, 2009, Stenderup *et al.*, 2003). Demgegenüber demonstrierten die drei untersuchten Chargen AT-MSCs ein homogeneres Proliferationsvermögen, die Zellkulturen

befanden sich am Tag 75 in der 15 - 17 Populationsverdopplung. Es ist anzunehmen, dass die Isolation der AT-MSCs aus gesundem, gut proliferierendem Fettgewebe erfolgte und dass Patienten, die sich zu einer Liposuktion entschließen, jünger sind. Folglich waren pathologische Prozesse des Isolationsgewebes sowie ein fortgeschrittenes Alter des Donors nicht relevant. Interessanterweise wurde in den untersuchten CB-MSCs, denen aufgrund der Alterssituation der Spender ein hohes Potential zugesprochen wird, ein reduziertes Proliferationsvermögen von 2 - 8 Populationsverdopplungen am Tag 75 festgestellt. Eine mögliche Erklärung für die verminderte Proliferation der untersuchten CB-MSCs liegt wahrscheinlich in dem Zeitabstand zwischen der Entnahme der Nabelschnüre und der Isolation der CB-MSCs begründet. Die in dieser Arbeit untersuchten CB-MSCs wurden freundlicherweise von Dr. Bieback zur Verfügung gestellt, die dieses Phänomen bereits identifiziert hat (Bieback *et al.*, 2004).

Charakterisierung der embryonalen Stammzellen

Die in dieser Arbeit verwendeten hES H1-Zellen wurden in einem Kokultursystem mit wachstumshemmenden embryonalen Fibroblasten der Maus kultiviert. Dabei waren die hES H1-Zellen (**vgl. Abschnitt 3.1.3**) durch das klonale Wachstum der relativ kleinen und kompakten Zellen von den *feeder*-Zellen oder den MSCs (**vgl. Abschnitt 3.1.1**) zu diskriminieren. Die hES H1-Zellen wurden auf die Expression der pluripotenzassoziierten Marker SOX-2, Nanog, OCT-3/4 und auf die Expression der Alkalischen Phosphatase untersucht (Thomson *et al.*, 1998, Stojkovic *et al.*, 2004, Chambers *et al.*, 2009). Da die untersuchten Zellkulturen eine dominante Expression dieser Marker zeigte, war von einer hohen Qualität der Zellkulturen auszugehen und spontane Differenzierungsprozesse auszuschließen (**vgl. Abschnitt 3.1.3**). Die Expression der ALP, die ebenfalls als früherer Marker osteogener Differenzierung gewertet wird, war bei der Bewertung von den Differenzierungsexperimenten der hES H1-Kulturen kritisch zu berücksichtigen.

Neben einer spontanen Differenzierung embryonaler Stammzellkulturen ist das Phänomen der Ausbildung von *embryoid bodies* bekannt. Transferiert man Kolonien in eine Suspensionskultur, kommt es zur Ausbildung von hohlen Aggregatstrukturen, in denen die Differenzierung in die drei Keimblätter erfolgt. Dieser Prozess wird konventionell initial vor Differenzierungsexperimenten durchgeführt und ist abhängig von einer hohen Qualität der Kolonien (Wicell, 2006). Im EB erfolgt die Differenzierung in keimblattspezifische Zellen, die durch die Expression der entsprechenden Rezeptoren, Integrine und Signalmoleküle zur Interaktion mit den verwendeten Differenzierungsfaktoren befähigt sind. In der Literatur werden zahlreiche Techniken, wie z.B. eine Kultivierung im hängenden Tropfen oder in individuellen Kulturgefäßen, zur Formation von EBs beschrieben (Kurosawa, 2007). Die Formation von 3D-Sphäroiden erforderte relativ hohe Zellzahlen, weswegen eine Kultivierung in nicht adhäsiven Kulturflaschen auf einer Rotationsplattform gewählt wurde. Diese Technik war praktikabel und ließ sich durch die Verwendung unterschiedlich großer Kulturflaschen leicht an die erforderliche Zellzahl anpassen. Nach Ausbildung der EB-Struktur präsentierten die hES H1-Zellen nicht mehr den embryonalen Phänotyp. Sie wuchsen nicht mehr in Kolonien (**vgl. Abschnitt 3.1.8**) und die Untersuchung der Expression der pluripotenzassoziierten Marker OCT-3, SSEA-1 und TRA-81 war negativ, was eine voranschreitende Differenzierung der Zellen implizierte (**vgl. Abschnitt 3.1.4**).

Expressionsprofil MSC-assoziiertes Oberflächenmarker

Die Zellpopulationen wurden im Durchflusszytometer auf die Expression MSC-assoziiertes Oberflächenmarker untersucht, um die Homogenität der mesenchymalen Stammzellkulturen zu bestimmen. Des Weiteren sollte die Vordifferenzierung der humanen embryonalen Stammzellen im *embryoid body* in Zellen des mesenchymalen Keimblattes charakterisiert werden (**vgl. Abschnitt 3.1.5 und 7.3**).

Die adulten Stammzellen zeigten eine dominante Expression der MSC-assoziierten Oberflächenmarker CD44, CD73, CD90 und CD105, während keine Expression der hämatopoetischen Marker CD31, CD34 und CD45 nachgewiesen wurde (Satija *et al.*, 2007). Des Weiteren waren die adulten Stammzellen negativ für das Leukozyten Antigen HLA-DR (Augello *et al.*, 2010). Dies korrespondiert mit der in der Literatur beschriebenen nicht provozierten Immunogenität adulter mesenchymaler Stammzellen. Nach Transplantation oder Transfusion mesenchymaler Stammzellen werden keine Abstoßungsreaktionen beobachtet, vielmehr scheinen MSCs immunregulierend zu wirken (Nauta *et al.*, 2009, Giorando *et al.*, 2008).

Auch wenn die Kriterien eines MSC-assoziierten Expressionsprofils im Wesentlichen erfüllt wurden, waren die untersuchten CB-MSC-Kulturen heterogener als die BM-MSC- und AT-MSC-Kulturen. In den untersuchten CB-MSC-Kulturen zeigten max. 30% der Zellen einer Population chargenabhängige Abweichungen in der Expression einzelner Marker (CD105, CD90 oder CD73), während die BM-MSCs und AT-MSCs nahezu vollständig positiv waren. Dieses ist durch eine nicht optimale Reinheit der isolierten CB-MSCs sowie durch Seneszenzen bedingt durch die *in vitro* Expansion zu erklären. Eine Expression von CD271 und CD117, die in der Literatur mit einem gesteigerten osteogenen Potential in Verbindung gebracht werden (Bühring *et al.*, 2007, Huss *et al.* Moosmann 2002), wurde in den adulten Stammzellkulturen nicht nachgewiesen. Dabei soll an dieser Stelle explizit auf die erfolgreich induzierte osteogene Differenzierung dieser MSC-Kulturen verwiesen werden (**vgl. Abschnitt 3.1.6 und 3.1.9**). Diese Marker werden bereits kommerziell (www.miltenyibiotec.com) zur Separation von MSCs mit einem hohen proliferativen und osteogenen Potential vertrieben. An dieser Diskrepanz zu der in dieser Arbeit gezeigten osteogenen Differenzierung in CD117- und CD271-negativen MSCs wird deutlich, dass noch Forschungsbedarf zur Identifizierung geeigneter Marker besteht.

Um die Vordifferenzierung der hES H1-Zellen in Stamm- und Progenitorzellen des mesenchymalen Keimblattes zu untersuchen, erfolgte nach Kultivierung im EB ebenfalls eine Analyse des MSC-assoziierten Markerprofils. Da im EB eine Differenzierung in alle drei Keimblätter erfolgt, bestand grundsätzlich die Annahme einer heterogenen Population. Um den Einfluss der Kulturzeit im EB auf die Differenzierung in Zellen des mesenchymalen Keimblattes zu untersuchen, wurden EB-Kulturen nach 5 Tagen und 22 - 25 Tagen charakterisiert. Die Untersuchung der hES H1 nach Kultivierung im EB demonstrierte eine heterogene Expression der MSC-assoziierten Positivmarker, während die Expression der hämatopoetischen Marker negativ war. Insgesamt wurde keine Expression der Positivmarker CD105 und CD73 induziert, aber von CD90 und CD44. Interessanterweise demonstrierten die Zellen nach einer kurzen Kultivierung im EB einen höheren prozentualen Anteil an CD90- und CD44-positiven Zellen. In der Ontogenese erfolgt die Entwicklung des mesenchymalen Keimblattes erst nach der Ausbildung der zweiblättrigen Keimscheibe aus Endoderm und Ektoderm. Folglich sollte eine längere Kulturzeit im EB zu einem höheren Anteil an Zellen

des mesenchymalen Keimblattes führen. Diese Annahme wurde ausschließlich bei der Expression von CD271, welches mit einem gesteigerten osteogenen und proliferativen Potential von MSCs assoziiert wird, bestätigt (Jarocha *et al.*, 2008, Brühring *et al.*, 2007). Des Weiteren wurde unabhängig von der Kulturdauer eine leichte Induktion von CD117 (c-kit) demonstriert, welches neben hämatopoetischen ebenfalls mit osteogenen Differenzierungsprozessen assoziiert wird. Wie im Vorfeld bereits diskutiert, wurden diese Marker aber nicht in den untersuchten MSC-Populationen nachgewiesen.

Osteogene Differenzierung der MSCs und Darstellung im REM

Dass mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark, dem Fettgewebe und dem Nabelschnurblut das Potential besitzen in Osteoblasten zu differenzieren, ist allgemeiner Konsens (Barry *et al.*, 2004, Kern *et al.*, 2006). Da aber andererseits die bereits erwähnte Problematik von Chargenschwankungen sowie nicht standardisierter Kulturtechniken besteht, war eine grundlegende Identifikation des osteogenen Potentials der verwendeten Zellen notwendig. Begleitend zu dieser Arbeit wurden verschiedene Kompositionen und Konzentrationen osteogener Stimulantien getestet. Diese Untersuchungen dienten aber nur zur Etablierung des in dieser Arbeit angewendeten Differenzierungsprotokolls und wurden nicht detailliert aufgeführt (Hildebrandt *et al.*, 2009). Es bleibt zu vermerken, dass mit dem etablierten Protokoll BM-MSCs, AT-MSCs und CB-MSCs in 2D-Zellkulturen erfolgreich in Osteoblasten differenzierbar waren (**vgl. Abschnitt 3.1.6**).

Die Akkumulation von Hydroxylapatit in der Knochenmatrix wurde im Rasterelektronenmikroskop dargestellt (**vgl. Abschnitt 3.1.7**). Die REM-Aufnahmen und die korrespondierenden Daten der Elementanalyse zeigten membranassoziierte, plättchenartige Strukturen mit einem erhöhten prozentualen Anteil an Kalzium und Phosphat. Diese plättchenartige Struktur der Hydroxylapatitkristalle wurde *in vitro* bereits in mineralisierten Osteoblasten (Wood *et al.*, 2008) und Chondrozyten (Kim *et al.*, 1996) beschrieben. Dabei wurde neben individuellen Kristallen und Agglomeraten auch eine fibrilläre Organisation in Assoziation mit Kollagenfasern gezeigt (Rey *et al.*, 1995). Der Prozess der Kalzifizierung wird durch Matrixvesikel der äußeren Plasmamembran von Osteoblasten vermittelt, aber auch von Chondrozyten in der sog. Wachstumszone bei der Knochenneubildung *in vivo*. In der ersten Phase erfolgt die Kristallisation von Hydroxylapatit innerhalb der Vesikelmembranen. Anschließend erfolgt in der zweiten Phase die Exposition der Kristalle in den extrazellulären Raum (Anderson *et al.*, 1995, 2003). Zwar wurden diese Strukturen nicht im gleichen Umfang in den verschiedenen Zellkulturen, BM-MSCs, AT-MSCs und CB-MSCs, detektiert, dennoch lassen sich auf Basis der Bilddaten die verschiedenen Phasen der Mineralisierung nachvollziehen. Die osteogen stimulierten AT-MSCs befanden sich in der ersten Phase der Mineralisierung. Die Hydroxylapatitkristalle sind zum Großteil noch mit der Zellmembran assoziiert, während in den BM-MSCs die Kristalle extrazellulär akkumulieren und die zweite Phase des Mineralisierungsprozess repräsentieren. In den nativen AT-MSC-Kulturen wurden intrazellulär lokalisierte Vesikel detektiert. Aufgrund des Fettgewebsursprungs dieser Zellen, sowie dem bekannten Phänomen der spontanen Differenzierung in Adipozyten in stark konfluenten Zellkulturen, handelte es sich wahrscheinlich um Lipidvesikel.

Osteogene Differenzierung der hES H1

Um die hES H1-Zellkulturen in Osteoblasten zu differenzieren, wurden zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt. Der eine Ansatz basierte auf der konventionellen Subkultivierung im EB, wobei eine kurze und eine lange Kulturdauer im EB untersucht wurden. Der andere Ansatz zielte auf die direkte Differenzierung der hES H1-Kulturen ab (Kärner *et al.*, 2007, Karp *et al.*, 2006). In der Literatur werden üblicherweise 5 Tage Vordifferenzierung in einer EB-Kultur im Zusammenhang mit der osteogenen Differenzierung beschrieben (Bielby *et al.*, 2004, Tian *et al.*, 2008, Karp *et al.*, 2006), andererseits entwickelt sich das Mesoderm als letztes der drei Keimblätter. Bei dem Prozess der sog. *epithelial-mesenchymal transition* (EMT) transformieren Progenitorzellen des Epithels in mesenchymale Zellen (Shukla *et al.*, 2009). Um den Einfluss der Differenzierungsperiode im EB auf das osteogene Potential der Zellen zu charakterisieren, wurden EBs nach 5 Tagen und nach 22 Tagen dissoziiert und die resultierenden Einzelzellen adhären kultiviert und osteogen stimuliert (**vgl. Abschnitt 3.1.8**). Nach 25 Tagen in einer EB-Kultur präsentierten die Zellen eine fibroblastenähnliche Morphologie und waren in Osteoblasten differenzierbar. Nach osteogener Induktion wurden eine gesteigerte ALP-Aktivität, die Expression von Kollagen-1 und eine großflächige Mineralisierung demonstriert. Demgegenüber waren die Zellen nach 5 Tagen im EB negativ für ALP und zeigten auch keine Kalziumdeposition, exprimierten aber Kollagen-1. Zudem waren die nativen Zellkulturen heterogen und zeigten einen dominanten Anteil epithelähnlicher Zellen. Bei der direkten Differenzierung wurden zwar ebenfalls eine großflächige Mineralisierung und die Expression von Kollagen-1 induziert, doch waren die Zellkulturen heterogen mit teilweise hohlen 3D-Strukturen.

Das Ziel der untersuchten Kulturtechniken war eine Vorbereitung der hES H1-Zellen zur Aggregation und Differenzierung in 3D-Kulturen. Trotz großflächiger Expression mineralisierter ECM bei der direkten Differenzierung war dieses Verfahren nicht geeignet. Es war nicht möglich hohe Zellzahlen zu generieren, da die zelluläre Expansion ausschließlich über die zeitintensive Kultivierung von hES H1-Kolonien erfolgte. Daher wurden die hES H1-Zellen vor Differenzierungsexperimenten ca. 22 Tage im EB subkultiviert, wobei eine Zunahme der Zellmasse erfolgte.

Quantifizierung des Mineralisierungspotentials

Die Quantifizierung des osteogenen Potentials der embryonalen und adulten Stammzellkulturen erfolgte anhand der Mineralisierung der ECM. Dabei wurde der prozentuale Anteil der mineralisierten Kulturfläche nach Einfärben mit Alizarinrot bestimmt (**vgl. Abschnitt 3.1.9**). Des Weiteren wurde der Mineralisierungsprozess mit einem konventionellen Standardverfahren, dem Osteogenese-Assay, untersucht (**vgl. Abschnitt 3.1.10**). Die Ergebnisse spiegelten im Wesentlichen die optische Bewertung der Zellkulturen wieder. In allen untersuchten Zellkulturen wurden bereits nach 22 Tagen mineralisierte Areale demonstriert, wobei allerdings Unterschiede im Ausmaß der Mineralisierung gezeigt wurden. Während in den CB-MSC- und hES H1-Kulturen der Mineralisierungsprozess bereits nach 21 Tagen stark vorangeschritten war, demonstrierten BM-MSCs und AT-MSCs erst nach 28 Tagen eine vergleichbar starke Mineralisierung. Bewertet man die untersuchten Zellkulturen, hatten die CB-MSCs das größte Mineralisierungspotentials, gefolgt von hES H1, BM-MSCs und AT-MSCs.

4.1 Grundlegende Charakterisierungen der Zellkulturen

Die Einordnung dieser Ergebnisse in die Forschungsliteratur ist aufgrund der bereits diskutierten Problematik der Donorabhängigkeit und nicht standardisierten Kulturprotokollen schwierig und zeigt, dass kein Konsens über das Potential der unterschiedlichen MSC-Populationen besteht. Die Arbeit von Kern *et al.*, 2006 beschreibt keine signifikanten Unterschiede zwischen BM-MSCs, AT-MSCs und CB-MSCs, wobei allerdings nur eine qualitative Aussage bezüglich der Anzahl verschiedener Chargen mit induzierter Mineralisierung getroffen wurde, aber keine Quantifizierung der mineralisierten Bereiche erfolgte. Weitere Forschungsergebnisse stützen die Hypothese, dass zwischen den adulten Stammzellkulturen kein genereller Unterschied bezüglich des osteogenen Potentials besteht. Diese Arbeiten unterscheiden die verschiedenen Populationen anhand der adipogenen Differenzierung und beschreiben ein vermindertes adipogenes Potential in CB-MSCs (Kern *et al.*, 2006, Rebelatto *et al.*, 2008). In Anbetracht von Forschungsergebnissen, die ein positives adipogenes Potential in CB-MSCs beschreiben (Wagner *et al.*, 2005), sind generelle Aussagen kritisch zu betrachten.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte bewiesen werden, dass das osteogene Potential der hES H1-Zellen sehr hoch ist (Bielby *et al.*, 2004, Sottile *et al.*, 2003). Nach 22 Tagen osteogener Stimulation wurden typische osteogene Marker und eine großflächige Mineralisierung nachgewiesen (**vgl. Abschnitt 3.1.8**) und bei der vergleichenden Quantifizierung der Mineralisierung (**vgl. Abschnitt 3.1.9**) demonstrierten diese Zellen sogar eine frühere Expression klazifizierter ECM als die untersuchten BM-MSCs und AT-MSCs.

4.2 Etablierung eines trägerfreien 3D *in vitro* Modells für die osteogene Differenzierung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war eine vergleichende Charakterisierung der osteogenen Differenzierung in 2D und 3D *in vitro* Kulturmodellen. In der Literatur werden unterschiedliche trägerbasierte 3D *in vitro* Modelle für die osteogene Differenzierung beschrieben (Ohgushi *et al.*, 1999). Da aber materialspezifische Einflüsse die Zelladhäsion und Differenzierung beeinflussen (Dekker *et al.*, 2003), sollte das 3D-Modell trägerfrei sein.

Etablierung eines trägerfreien 3D *in vitro* Modells

Zur zellulären Aggregation und Kultivierung der Stammzellen in 3D wurden verschiedene Kulturtechniken getestet (**vgl. Abschnitt 3.2.1**). Neben der Eignung für eine Langzeitkultivierung und Differenzierung sollte die zelluläre Aggregation reproduzierbar sein. Dabei sollten die Aggregate regulär geformt und kompakt sein. Da die Aggregatgröße ebenfalls einen Einfluss auf die Nährstoffversorgung der inneren Zellen hat, war eine weitere Anforderung, dass die Aggregate eine vergleichbare Größe hatten.

Bei einer Kultivierung in einer Rotationskultur war die Zellaggregation heterogen und es kam zur Formation von multi-Aggregaten. Demgegenüber gewährleistete eine Zellaggregation im hängenden Tropfen zwar eine homogene Größenverteilung der Sphäroide, doch war eine Langzeitkultivierung in diesem System nicht möglich, da kein Mediumwechsel durchführbar war. Ein Transfer der Aggregate in ein anderes Kultursystem war mit einem Verlust von Sphäroiden verbunden, woraus die geringe Effizienz der Sphäroidaggregation resultierte. Mittlerweile sind spezielle Kulturplatten, z.B. von insphero (www.insphero.com), erhältlich, die einen Mediumwechsel im hängenden Tropfen ermöglichen. Dieses neuartige Kultursystem wurde aber im Rahmen dieser Arbeit nicht getestet. Es stellte sich heraus, dass eine Aggregation und Langzeitkultivierung in separaten Kulturgefäßen oder Kavitäten einer 96-well Platte besonders geeignet war, um individuelle Sphäroide verlustfrei zu kultivieren. Zudem war die Dimension der Sphäroide durch die eingesäte Zellzahl pro Kulturgefäß zu regulieren. Dabei erwies sich die Kultivierung in nicht adhäsiven 96-well Platten durch die einfache Handhabung als besonders geeignet für eine Kultivierung vieler paralleler Proben.

Charakterisierung der stammzellbasierten Sphäroide

Während der Langzeitkultivierung und Differenzierung der adulten stammzellbasierten Sphäroide wurde eine kontinuierliche Kondensation der Zellen beobachtet (**vgl. Abschnitt 3.2.2**). Der Durchmesser der Sphäroide reduzierte sich um bis zu 43%. Auch wenn die finale Dimension der Sphäroide einer Charge am Tag 21 maximal um 12% variierte, zeigte der direkte Vergleich der BM-MSC-, AT-MSC- und CB-MSC-basierten Sphäroide eine Größenverteilung von 350 µm - 500 µm bei einer Zellzahl von 20.000 Zellen pro Aggregat. Diese Größenunterschiede korrelierten mit dem morphologischen Erscheinungsbild der Zellkulturen bei der Expansion in 2D-Zellkulturen. Bei gleicher Zellzahl bildeten Chargen mit größeren und flächigeren Zellen ebenfalls größere Sphäroide aus, wobei aber keine Systematik bezüglich des Isolationsgewebes abzuleiten war. So war die Sphäroidgröße der

BM-MSCs bei der Untersuchung der Größenentwicklung und der metabolischen Aktivität kleiner als die der AT-MSCs (**vgl. Abschnitt 3.2.2, Abb. 39**), während bei der Impedanzcharakterisierung der stammzellbasierten Sphäroide das Größenverhältnis umgekehrt war (**vgl. Abschnitt 3.3.4, Tab. 5 und Abschnitt 3.3.5, Tab. 6**).

Die abnehmende metabolische Aktivität in den MSC-basierten Sphäroiden könnte an einer Unterversorgung der inneren Zellen liegen (Müller-Klieser, 1997, Desioze, 1998) oder an einer Kontaktinhibition der Zellproliferation. Dieses Phänomen tritt bei der Kultivierung von MSCs in 2D-Kulturen auf und wird durch eine frühzeitige Passage der Zellkulturen bei einem Konfluenzgrad von 70% - 90% umgangen (Majd *et al.*, 2009). Infolge dieses Prozesses wurde des Weiteren eine erhöhte Apoptoserate der MSCs in konfluenten Zellkulturen festgestellt (Song *et al.*, 2009). Die im Vergleich zu den nativen Sphäroiden höhere metabolische Aktivität der osteogen stimulierten Sphäroide war auf zelluläre Umbauprozesse infolge der Differenzierung zurückzuführen. So wurde in MSC-Kulturen nach osteogener Stimulation eine höhere metabolische Aktivität als in den Kontrollen nachgewiesen (Jørgensen *et al.*, 2004). Um zu untersuchen, ob die reduzierte metabolische Aktivität durch ein Absterben der Zellen bedingt war, wurde eine FDA/Pi-Färbung durchgeführt. Dabei wurde gezeigt, dass die Sphäroide vital waren. Jedoch konnten mit dieser Färbung nur die Zellen an der Oberfläche des Sphäroides erfasst werden (**vgl. Abschnitt 3.3.10, Abb. 66**).

Es bleibt festzustellen, dass allen untersuchten adulten Stammzellpopulationen, BM-MSCs, AT-MSCs und CB-MSCs, das Potential zur osteogenen Differenzierung auch in trägerfreien Zellaggregaten inhärent war. Im Einzelnen wurde zwar die Knochenformation nicht induziert, doch dieses war auf unsystematische Chargenschwankungen zurückzuführen. So belegen die im folgenden Kapitel diskutierten Daten der Impedanzcharakterisierung zweier unterschiedlicher Chargen AT-MSCs einmal ein positives und einmal ein negatives osteogenes Potential (**vgl. Abschnitt 3.3.5**).

Während die untersuchten adulten mesenchymalen Stammzellen tendenziell vergleichbar in ihrer Größenentwicklung, der metabolischen Aktivität und der osteogenen Differenzierung waren, bestand eine deutliche Diskrepanz zu den hES H1-basierten Sphäroiden (**vgl. Abschnitt 3.2.2**). Die hES H1-Zellen waren kleiner, wodurch die resultierenden Sphäroide ebenfalls eine geringere Dimension hatten. Dieses Phänomen wurde bei der Impedanzcharakterisierung durch eine Erhöhung der Zellzahl auf 20.000 Zellen pro Aggregat berücksichtigt. Des Weiteren lässt die Steigerung der metabolischen Aktivität im Aggregat auf eine Induktion komplexer zellulärer Prozesse schließen, vergleichbar wie im *embryoid body*. Diese These wird durch die inhomogene Zellverteilung untermauert, die eine Ähnlichkeit mit den Hohlstrukturen in den EBs hatte (**vgl. Abschnitt 3.2.3, Abb. 42**). Zudem wurde im Kulturverlauf eine Disaggregation der Kontrollen beobachtet und die geringe metabolische Aktivität sowie die Vitalitätsbestimmung mittels FDA/Pi-Färbung zeigten das Absterben der Zellen in den Kontrollsphäroiden. Im Gegensatz zu den adulten Stammzellaggregaten wurde in hES H1 keine osteogene Differenzierung demonstriert (**vgl. Abschnitt 3.2.3, Abb. 41 und Abschnitt 3.3.10, Abb. 70**). Die Expression von Kollagen-1 wurde immunhistologisch untersucht. Dabei war in stark kalzifizierten MSC-Sphäroiden keine Detektion von Kollagen-1 möglich (**vgl. Abschnitt 3.3.10, Abb. 67 und 68**). Es ist bekannt, dass die Kollagenfibrillen das Strukturgerüst für die Mineralisierung bilden (Wiesmann *et al.*, 2004). Wahrscheinlich war Kollagen-1 mit einer immunhistologischen Färbung nicht nachzuweisen, da die Kollagenfasern durch die Mineralisierung maskiert wurden. In

Sphäroiden eines nicht so fortgeschrittenen Differenzierungsstadiums erfolgte der Nachweis von Kollagen-1 (**vgl. Abschnitt 3.2.3, Abb. 40**).

Die quantifizierende Untersuchung der Expression osteoblastenspezifischer Gene mittels *real time* PCR demonstrierte insgesamt eine positive Induktion in den erfolgreich differenzierten Sphäroiden (**vgl. Abschnitt 3.2.4**). Die Untersuchung erfolgte an den impedanzspektroskopisch charakterisierten BM-MSC-, AT-MSC- und hES H1-basierten Sphäroiden, wobei das Expressionsmuster zwischen den untersuchten Populationen variierte. Ob die Variation spezifisch für die untersuchte Population oder chargenbedingt war, lässt sich aus den Daten nicht ableiten. Auf die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse wird bei der Diskussion der Impedanzdaten nochmals verwiesen.

4.3 Impedanzspektroskopische Charakterisierung der osteogenen Differenzierung in 3D

In einem Teil dieser Arbeit wurde untersucht, ob man den Prozess der osteogenen Differenzierung in dem etablierten trägerfreien 3D *in vitro* Modell mit Impedanzspektroskopie nicht invasiv messen kann. Es sollte untersucht werden, ob man anhand der gemessenen Impedanzspektren einen Parameter zur Bestimmung der osteogenen Differenzierung ermitteln kann. Die prinzipielle Eignung des in dieser Arbeit verwendeten kapillarbasierten Impedanzmesssystems zur Erfassung zellphysiologischer Prozesse in Sphäroiden wurde bereits erfolgreich demonstriert (Hildebrandt *et al.*, 2009, 2010, Thielecke *et al.*, 2001, Bartholomä *et al.*, 2005, Impidjati *et al.*, 2005). Eine reduzierte Vitalität in den stammzellbasierten Sphäroiden nach erfolgter Messung konnte durch FDA/Pi-Färbungen ausgeschlossen werden (**vgl. Abschnitt 3.3.10, Abb. 66**).

Untersuchung der Messeinflüsse

Vor der Impedanzcharakterisierung der stammzellbasierten Sphäroide wurden die systematischen und zufälligen Einflüsse auf die Messungen identifiziert und evaluiert, um die Reproduzierbarkeit der Messungen und die Vergleichbarkeit der einzelnen Messreihen zu determinieren. Die Daten der Größenbestimmung bei den jeweiligen Messungen (**vgl. Abschnitt 3.3.4 - 3.3.6, Tab. 5 - 8**) und der unter **Abschnitt 4.2** diskutierten grundlegenden Charakterisierungen belegten eindeutig, dass die Sphäroide einerseits während der Kultivierung weiter kondensierten und zudem chargenbedingte Größenunterschiede vorlagen. Um eine Messung unterschiedlich großer Sphäroide zu ermöglichen, war die Kapillare konisch erweitert. In dieser Kapillare wurden die Sphäroide positioniert, was zu einer unterschiedlichen Kompression der Sphäroide bei gleicher Positionierung führte. Des Weiteren waren die zu Kulturbeginn initial größeren Sphäroide nicht in der Kapillarmitte positionierbar und wurden in dem konisch erweiterten Messbereich vermessen. Daher wurden der Einflüsse der Sphäroidgröße und Kompression sowie die Positionierung innerhalb der Kapillare auf die gemessene Impedanz untersucht. Es zeigte sich, dass die Aggregatgröße einen Einfluss auf den gemessenen Betrag der Impedanz hatte, aber nicht auf den Phasengang. Bei einer vergleichbaren Positionierung in der Kapillare demonstrierten große Sphäroide höhere Werte im Betrag der Impedanz als kleinere Sphäroide (**vgl. Abschnitt 3.3.3**). Dies war darauf zurückzuführen, dass große, stark in der Kapillare komprimierte Aggregate einen hohen Abdichtwiderstand hatten. Außerdem resultierte aus der größeren Probendimension innerhalb der Kapillare ein längerer Weg des Stroms durch diesen Widerstand als bei einem kleineren Sphäroid. Des Weiteren war der gemessene Betrag der Impedanz positionsabhängig. Größere Sphäroide, die aufgrund ihrer Dimension im konisch erweiterten Teil der Kapillare vermessen wurden, demonstrierten geringere Werte im Betrag der Impedanz als kleinere Sphäroide, die in der Kapillarmitte vergleichsweise stark komprimiert wurden. Durch die Positionierung innerhalb der Kapillare wurde die Kompression der Sphäroide beeinflusst, so dass die bereits diskutierten Effekte, der Abdichtwiderstand und die Länge der Probe, zum Tragen kamen. In Anbetracht des Einflusses der Sphäroidgröße und der damit verbundenen Kompressionen auf den gemessenen Betrag der Impedanz folgert, dass dieser Parameter nur bedingt geeignet war, um den Prozess der osteogenen Differenzierung zu bestimmen. Des Weiteren wurde ein Einfluss des MSC-Kulturmediums auf den Betrag der Impedanz an unterschiedlichen

Messtagen gezeigt. Aufgrund von Chargenschwankungen variierte der Betrag der Impedanz des mit MSC-Kulturmedium befüllten Messsystems um bis zu 15% (**vgl. Abschnitt 3.3.2, Abb. 45**), so dass auch dieser Faktor bei dem Vergleich der Impedanzspektren zu berücksichtigen war. Demgegenüber war der gemessene Phasengang unabhängig von der Sphäroidgröße oder Chargenschwankungen des MSC-Kulturmediums und präsentierte somit einen geeigneten Parameter, um die osteogene Differenzierung frei von sekundären Einflüssen zu bestimmen.

Die Auftragsweise der Impedanz im Argand-Diagramm ergibt sich aus dem Betrag der Impedanz und der Phase. Folglich wurden die Ortskurven ebenfalls durch diese Messeinflüsse verändert.

Impedanzspektren der stammzellbasierten Sphäroide und biologische Charakterisierung

In den Impedanzspektren der MSC-basierten Sphäroide konnten bereits nach 7 Tagen osteogener Induktion charakteristische Änderungen gezeigt werden. In BM-MSCs (**vgl. Abschnitt 3.3.4**) und AT-MSCs (**vgl. Abschnitt 3.3.5**) wurden höhere Werte im Betrag der Impedanz und eine stärker ausgeprägte Dispersion im Phasengang demonstriert. Die Kurvenform des Phasengangs der nativen Sphäroide zeigte einen geraden Abfall, während mit zunehmender Differenzierung der osteogenen Sphäroide die Kurve s-förmig war. Im Argand-Diagramm demonstrierte die Ortskurve des Imaginärteils Z'' gegen den Realteil Z' die Präsenz eines stärker ausgeprägten zweiten Kreisbogens in den osteogenen Sphäroiden. Daraus lässt sich eindeutig die zunehmende Heterogenität der osteogenen Sphäroide ableiten. Homogene Systeme zeigen im Idealfall einen Kreisbogen, der auf einen einzigen Relaxationsprozess schließen lässt. Das Messmedium repräsentierte ein solches homogenes System, auch wenn die Ortskurve aufgrund der unterschiedlichen Komponenten (FKS, Proteine, Salze, Zucker) einen nicht absolut idealen Kreisbogen beschrieb. In heterogenen Systemen werden multiple Dispersionen detektiert, die durch Relaxationsprozesse der unterschiedlichen Komponenten des Systems hervorgerufen werden und sich teilweise überlagern. Dadurch zeigt der Kurvenverlauf des Argand-Diagramms mehrere nicht ideale Kreisbögen. Eine solche Überlagerung von multiplen Relaxationsprozessen wurde in den nativen und osteogenen Sphäroiden detektiert. Dabei beschrieb die Ortskurve prinzipiell zwei Bögen. Im Vergleich zum Messmedium demonstrierte der erste Kreisbogen eine Depression. In diesem Bereich war eine Trennung der Impedanzeigenschaften des Messmediums und der Sphäroide nicht möglich. In den Sphäroidspektren wurde ein weiteres Dispersionsgebiet detektiert, welches nicht von den Impedanzen des Messmediums überlagert wurde. Dieses war in den osteogenen Sphäroiden stärker ausgeprägt und indiziert, wie bereits erwähnt, die Heterogenität der osteogenen Sphäroide. Diese Heterogenität könnte durch strukturelle Änderungen, z.B. eine inhomogene Zellverteilung oder Nekrose sowie durch die Expression anderer biologischer Komponenten, z.B. einer ECM und deren Mineralisierung, verursacht worden sein. Dieser Sachverhalt wird später detailliert für jede Stammzellpopulation diskutiert.

Im weiteren Kultur- und Differenzierungsprozess wurde keine stärkere Ausprägung der charakteristischen Änderungen im Betrag der Impedanz oder im Argand-Diagramm beobachtet, aber im Phasengang. In der vorangegangenen Diskussion der verschiedenen Einflüsse auf die Impedanzmessungen, wie z.B. die Sphäroidgröße, Kompression und Positionierung oder chargenbedingte Schwankungen des Messmediums, wurde bereits der

Phasengang als unabhängiger Parameter identifiziert. Demgegenüber waren bei der Beurteilung des Betrags der Impedanz zwei Effekte zu berücksichtigen. Einerseits wurden die Sphäroide im Kulturverlauf kleiner, so dass keine vergleichbare Positionierung innerhalb der Kapillare zu realisieren war, zum anderen waren die osteogenen Sphäroide nach erfolgter Mineralisierung steifer. Bei den Impedanzmessungen wurden die Sphäroide bei der Positionierung am Tag 7 stärker in der Kapillare komprimiert und hatten folglich einen größeren Abdichtwiderstand als die steifen, nur geringfügig komprimierbaren osteogenen BM-MS-C-Sphäroide am Tag 21 (**vgl. Abschnitt 3.3.10, Abb. 67**) oder die bereits am Tag 14 mineralisierten AT-MS-C-Sphäroide (**vgl. Abschnitt 3.3.10, Abb. 68**). Aussagen über spezifische Änderungen des Betrags der Impedanz infolge osteogener Prozesse können nur relativ im direkten Vergleich zur jeweiligen Kontrolle getroffen werden, da diese Proben unter vergleichbaren Bedingungen hinsichtlich der Positionierung gemessen wurden. Der Betrag der Impedanz war in den osteogenen Sphäroiden höher als in den nativen Sphäroiden, obwohl die osteogenen Sphäroide kleiner und bei gleicher Positionierung weniger stark in der Kapillare komprimiert waren. Die geringere Größe bei identischer Zellzahl pro Sphäroid im Vergleich zu der nativen Kontrolle legt eine stärkere Kondensation der osteogenen Sphäroide nahe. Die Expression extrazellulärer Matrix und weiterer Struktur- und Zelladhäsionsproteine sowie die in 2D-Kulturen beschriebene Kondensation von 3D-Strukturen (*bone noddels*), in denen die Mineralisierung stattfindet (Wang *et al.*, 2009, Martino *et al.*, 2009, Kale *et al.*, 2000, Beresford *et al.*, 2005), indizieren eine höhere Dichte. Eine höhere Dichte würde den höheren Widerstand der osteogenen Sphäroide erklären.

Der Phasengang der osteogenen Sphäroide demonstrierte im Vergleich zu den nativen Sphäroiden eine stärkere Dispersion, aus der sich eine Zunahme der Heterogenität ableiten ließ. Dieser Parameter wurde durch eine beschreibende Regressionsanalyse des Kurvenverlaufs des Phasengangs untersucht und wird zu einem späteren Zeitpunkt detailliert erläutert. Biologisch konnte die Heterogenität der osteogen stimulierten Sphäroiden definitiv auf die Expression einer extrazellulären Matrix und deren Mineralisierung zurückgeführt werden, da eine Begutachtung der Aggregatschnitte eine homogene und dichte Zellverteilung ohne löchrige Strukturen oder Nekrosen zeigte (**vgl. Abschnitt 3.3.10**). Des Weiteren wurde ebenfalls eine Induktion verschiedener osteoblastenassoziierter Gene der extrazellulären Matrix (Kollagen-1, Kollagen-3, *bone sialoprotein 2*, Osteocalcin und Osteopontin) und der Transkriptionsfaktor RUNX2 mittels *real time* PCR nachgewiesen (**vgl. Abschnitt 3.2.4**). Es ist davon auszugehen, dass bei den MSC-basierten Sphäroiden die massiven Änderungen in der Expression der extrazellulären Matrix der maßgebliche Parameter für die gemessenen Impedanzänderungen war.

In einer Charge AT-MS-Cs wurde keine Expression kalzifizierter ECM induziert (**vgl. Abschnitt 3.3.10, Abb. 69**), zudem waren die Sphäroide negativ für die untersuchten osteoblastenassozierten Gene (**vgl. Abschnitt 3.2.4**). Die Impedanzspektren der „osteogenen“ Sphäroide demonstrierten einen anderen Verlauf als die nativen Kontrollen (**vgl. Abschnitt 3.3.5**). Welcher biologische Prozess diese Impedanzänderung induzierte, ist spekulativ. Es wurden eine ringförmige ALP-Expression sowie eine stärkere Expression von Kollagen-1 nach Kultivierung mit osteogenen Faktoren nachgewiesen, welche als Indizien für ein frühes Differenzierungsstadium gewertet werden könnten. Es ist anzunehmen, dass dieser Charge aufgrund von Seneszenzen ein vermindertes Differenzierungspotential inhärent war. Im Gegensatz zu den beiden anderen Chargen AT-MS-Cs wurde die Charge 3 als kryokonservierte Zellen bereitgestellt und es ist nicht auszuschließen, dass die

Kryokonservierung oder Temperaturschwankungen beim Transport zu einem verminderten Differenzierungspotential führten. Ein gewebespezifisches Phänomen ist auszuschließen, da eine andere Charge AT-MSCs bereits nach 14 Tagen terminal differenziert war (**vgl. Abschnitt 3.3.10, Abb. 68**).

In hES H1-Sphäroiden wurde sowohl nach osteogener Stimulation wie auch in den nativen Kontrollen eine vergleichsweise starke Dispersion im Phasengang demonstriert und die Ortskurve des Argand-Diagramms beschrieb die Präsenz eines zweiten Dispersionsgebietes (**vgl. Abschnitt 3.3.6**). Aufgrund der histologischen Befunde und der Ergebnisse der *real time* PCR konnten osteogene Differenzierungsprozesse definitiv ausgeschlossen werden. Es wurde keine ALP-Expression oder kalzifizierte ECM nachgewiesen (**vgl. Abschnitt 3.3.10, Abb. 70**). Da keine Genexpression von Kollagen-1 und Kollagen-3 mittels *real time* PCR demonstriert wurde (**vgl. Abschnitt 3.2.4**), erfolgte keine immunhistologische Untersuchung der translateralen Proteinexpression von Kollagen. Die Kryoschnitte der hES H1-Sphäroide hatten eine löchrige Struktur. Diese inhomogene Zellverteilung wurde in den Impedanzspektren detektiert.

Modellbildung

Zur quantitativen Bestimmung der spezifischen zellulären Parameter wurden verschiedene elektrische Gewebemodelle untersucht (**vgl. Abschnitt 3.3.7**). Nach Modellbildung waren die Daten unabhängig von zufälligen Einflüssen (z.B. chargenabhängige Medienimpedanz) oder gerätespezifischen Parametern (z.B. parasitäre Kapazitäten, Elektrodenimpedanz). Anhand des Impedanzspektrums des Messmediums wurden diese Parameter bestimmt und nachfolgend die spezifischen Gewebestrukturparameter aus den Sphäroidspektren berechnet. Prinzipiell wurden zwei unterschiedliche Modellansätze untersucht. Der eine Ansatz beschrieb den Sphäroid als homogene Einheit bestehend aus einem extrazellulären Widerstand, einem CPE-Element für die Kapazität der Zellmembran und einem intrazellulären Widerstand. Diese Gewebestrukturparameter wurden in unterschiedlicher Anordnung analysiert. Der andere Ansatz basierte auf der Annahme, dass die osteogene Differenzierung heterogen war, d.h. dass nicht alle MSCs vollständig zu Osteoblasten differenzierten bzw. die Expression der osteogenen Marker heterogen im Sphäroid verteilt war (**vgl. Abschnitt 3.3.10, Abb. 67 und 68**). Wie im vorangegangenen Abschnitt diskutiert, wurde diese Annahme einer heterogenen Differenzierung durch die Kurvenverläufe im Argand-Diagramm belegt. Um diese Heterogenität zu modellieren wurde ein Gewebemodell mit zwei Bereichen (jeweils bestehend aus einem extrazellulären Widerstand und einem CPE-Element für die Kapazität der Zellmembran) untersucht. Es zeigte sich, dass es zwar möglich war den gemessenen Impedanzverlauf mittels ZView2 äquivalent darzustellen, aber bei diesem Modell mit 4-freien Parametern konnten die einzelnen Parameter nur mit einem sehr großen Fehler bestimmt werden (z.B. R_{extra1} mit einem Fehler von 50,744%, CPE1-T mit 40,913% und CPE2-P mit 358,56%).

Die untersuchten homogenen Gewebemodelle bestehend aus 3-freien Parametern (extrazellulärer Widerstand, intrazellulärer Widerstand und CPE-Element) zeigten, dass der intrazelluläre Widerstand (0,259 k Ω) aufgrund des vergleichsweise hohen extrazellulären Widerstandes (33.272 k Ω) und des Messmediums (53.679 k Ω) nur mit einem Fehler von 100.000% bestimmbar war. Da der Impedanzverlauf mit einem einfachen Modell mit 2-freien Parametern (extrazellulären Widerstand und CPE-Element) mit einem geringen Fehler von

max. 11% darstellbar war, wurde dieses Modell zur quantitativen Auswertung verwendet (**vgl. Abschnitt 3.3.8**). Es wurde gezeigt, dass der extrazelluläre Widerstand der osteogenen MSC-Sphäroide sich signifikant ($p > 0,05$) von den Kontrollen des jeweiligen Kulturzeitpunktes unterschied. Dieses Ergebnis korrelierte mit den histologischen und molekularbiologischen Befunden. Der extrazelluläre Widerstand beschreibt das Verhältnis des extrazellulären zum intrazellulären Raum in einem Sphäroid. In den osteogenen Sphäroiden induzierte die Expression extrazellulärer Matrixkomponenten eine Änderung des extrazellulären Volumenanteils. Die ECM bildete eine gemeinsame Matrix für die Zellen und fungierte als zusätzlicher Widerstand. Die Zellmembran wurde nicht durch einen idealen Kondensator, sondern durch ein CPE-Element mit den Parametern CPE-T (Kapazität eines CPE-Elementes) und CPE-P (Dispersionsparameter) modelliert. Diese Parameter waren nicht geeignet zur Beurteilung des Differenzierungsprozesses, da nicht bei allen Messungen die Änderung signifikant war. Des Weiteren zeigten die nativen Sphäroide der Charge AT-MSCs mit dem negativen osteogenen Potential im Vergleich zu den anderen nativen und osteogenen Sphäroiden auffällig hohe Werte für die Membrankapazität CPE-T, wobei die Standardabweichung teilweise sehr hoch war (Tag 21: 78%). Die Beurteilung der histologischen Schnitte demonstrierte eine hohe Grundaktivität der membranassoziierten Alkalischen Phosphatase. Im Gegensatz zur ALP-Induktion infolge osteogener Differenzierung war die Expression nicht nur in den äußeren Bereichen des Sphäroides lokalisiert, sondern heterogen verteilt. Ob ein Zusammenhang besteht, ist spekulativ. Fakt ist, dass sich diese Probe biologisch aufgrund ihres nicht vorhandenen osteogenen Potentials von den anderen untersuchten MSCs unterschied und demzufolge ebenfalls die Impedanzeigenschaften anders waren.

Untersuchung der Heterogenität

Wie bereits diskutiert, war es nicht möglich den gemessenen Impedanzverlauf mit einem Gewebemodell darzustellen, welches die Heterogenität der Sphäroide berücksichtigte. Da der Phasengang unabhängig von der Sphäroidgröße und Positionierung war, stellte er einen geeigneten Parameter zur Beschreibung der Heterogenität der osteogenen Differenzierung dar. Historisch wird dieser Parameter mit der Flüssigkeitsverteilung und der Membranintegrität in Verbindung gebracht und wird bereits zur Diagnostik von Infektionen und Krebserkrankungen angewendet (Gupta *et al.*, 2004), wobei geringe Werte im Phasengang mit einer geringeren Zellintegrität assoziiert werden. Des Weiteren findet dieser Parameter bei der Bestimmung des Anteiles von Muskelfasern in infarkgeschädigten Myokardgewebe (Salazat *et al.*, 2004) oder zur Bestimmung des Anteiles von Körperfett und der Muskulatur innerhalb des Körpers Verwendung (Grimmes *et al.*, 2008). Untersuchungen an Knochen demonstrierten einen Zusammenhang des Phasenwinkels mit dem Wassergehalt oder der Dichte (Sierpowska *et al.*, 2007, 2003). Die Entstehung von Krebszellen innerhalb eines Gewebes sowie die Verteilung von Muskelfasern innerhalb von infarzierten Myokardgeweben und die Körperfettanalyse repräsentieren eine biologische Heterogenität dieser untersuchten Gewebe. Diese Prozesse sind vergleichbar zu der nicht vollständigen Differenzierung der Stammzellen zu Knochenzellen. MSCs werden als heterogene Zellpopulationen bestehend aus Stamm- und Progenitorzellen mit einem unterschiedlichen Differenzierungspotential beschrieben (Heng *et al.*, 2004, Colter *et al.*, 2002). Betrachtet man die histologischen Befunde der untersuchten 2D- und 3D-Zellkulturen,

wird eine heterogene Distribution der mineralisierten Bereiche und der ALP-Expression in den Zellkulturen demonstriert (**vgl. Abschnitt 3.1.6, Abb. 31, Abschnitt 3.2.3, Abb. 40 und Abschnitt 3.3.10, Abb. 67/68**). Und auch in der Literatur wird eine großflächige, aber keine 100%ige Differenzierung der Zellkulturen beschrieben (Kern *et al.*, 2006, Bieback *et al.*, 2004, Jørgensen *et al.*, 2004). Des Weiteren wird der Prozess der osteogenen Differenzierung nach Expression der mineralisierten ECM mit der Apoptose eines Großteils der Zellen abgeschlossen (Raiz, 1999, Bilezikian *et al.*, 1996) und apoptotische Prozesse oder ein Absterben der Zellen korrelieren mit einer reduzierten Membranintegrität.

Die Impedanzspektren der nativen Sphäroide demonstrierten in der halblogarithmischen Darstellung des Phasengangs im Frequenzbereich von 20 kHz - 500 kHz einen geraden Abfall, während die osteogen differenzierten Sphäroide einen gekrümmten Kurvenverlauf zeigten. Zur Beschreibung dieses Dispersionsverhaltens wurde eine Regressionsanalyse durchgeführt (**vgl. Abschnitt 3.3.9**). Anhand des Bestimmtheitsmaßes (Fehler) wurde die Stärke der Dispersion als Maß für die Heterogenität bestimmt. Im Kulturverlauf wurde eine Zunahme der Heterogenität in den osteogen differenzierten BM-MSCs und AT-MSCs nachgewiesen. Dieser Prozess korrelierte mit der Expression mineralisierter ECM. In den AT-MSC-basierten Sphäroiden, die bereits nach 14 Tagen terminal differenziert waren, wurde zu diesem Zeitpunkt bereits eine starke Dispersion im Phasengang mit einem gekrümmten Kurvenverlauf demonstriert, während in den BM-MSCs ein solcher Kurvenverlauf erst zum Zeitpunkt der Mineralisation am Tag 21 detektiert wurde. In den AT-MSCs mit dem negativen osteogenen Potential wurde ab Tag 14 eine stärkere Dispersion demonstriert als in den erfolgreich differenzierten AT-MSCs und BM-MSCs. Auch wenn diese Dispersion nicht mit der Expression mineralisierter ECM korrelierte, wurde eine ringförmige Distribution der ALP nachgewiesen. Es ist davon auszugehen, dass die Heterogenität dieser Probe auf ein nicht bekanntes zelluläres Ereignis zurückzuführen war. Da diesen Zellen wahrscheinlich aufgrund von Seneszenzen ein vermindertes osteogenes Potential inhärent war, könnte die Heterogenität in der Zunahme seneszenten Zellen begründet sein. Eine spontane Differenzierung, z.B. in Chondroblasten (Johnstone *et al.*, 1998), kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. In den hES H1-basierten Sphäroiden erstreckte sich das Dispersionsgebiet über einen größeren Frequenzbereich. Die Heterogenität der hES H1-Sphäroide wurde eindeutig auf die inhomogene Zelldistribution und nicht auf Differenzierungsprozesse zurückgeführt. Da ein anderer zellulärer Prozess und nicht die osteogene Differenzierung ursächlich für die Heterogenität der Sphäroide war, ist das Dispersionsgebiet verschoben. Demnach scheint es möglich zu sein, anhand des Spektrums des Phasengangs auf einen spezifischen zellulären Prozess zu schließen.

4.4 Charakterisierung der multipotenten Differenzierung mittels akustischer Mikroskopie

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurde untersucht, ob man Differenzierungsprozesse von Stammzellen in 2D und 3D *in vitro* Kulturen mittels akustischer Mikroskopie charakterisieren kann. Neben der Darstellung individueller Zellen und diskreter zellulärer Strukturen sollte untersucht werden, ob die mechanischen Eigenschaften einen geeigneten Parameter zur Beurteilung der Stammzellendifferenzierung darstellen. Um zu evaluieren, ob die mechanischen Eigenschaften spezifisch für die unterschiedlichen Differenzierungslinien sind, wurde die multipotente Differenzierung der BM-MSCs in Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten mittels akustischer Mikroskopie untersucht.

Darstellung zellulärer Strukturen in 2D und 3D *in vitro* Kulturen

Akustische Mikroskopie bei 1 GHz ermöglicht die Darstellung zellulärer Strukturen mit einer Auflösung von 1 μm . Im Gegensatz zur optischen Mikroskopie, die auf eine Darstellung von Oberflächenstrukturen beschränkt ist, durchdringt Ultraschall den Zelllayer und ermöglicht so die Darstellung von internen Strukturen. Die hohe Auflösung des hochfrequenten Ultraschalls beinhaltet aber eine Beschränkung der Durchdringungstiefe. Daher war dieses Verfahren bei 1 GHz für eine Untersuchung von Differenzierungsprozessen in 2D-Zellkulturen hochgradig geeignet, aber nicht zur Untersuchung von Sphäroiden. Osteogene Sphäroide wurden exemplarisch bei 400 MHz vermessen (**vgl. Abschnitt 3.4.3**). Dabei wurden an der Sphäroidoberfläche fibrilläre Strukturen abgebildet, die anhand der korrespondierenden Kollagen-1-Immunfärbung (**vgl. Abschnitt 3.3.10, Abb. 67**) als Kollagenfasern identifiziert wurden. Im Inneren der Sphäroide wurden zwar Reflexionen detektiert, aber eine Zuordnung war nicht möglich. Die Sphäroide waren heterogen und exprimierten einen hohen Anteil an Kollagen und weiteren Strukturproteinen der ECM (**vgl. Abschnitt 3.2.4**), demzufolge war das Reflexionsmuster entsprechend komplex. Des Weiteren war die Durchdringungstiefe auch bei 400 MHz nicht ausreichend, um das Substratecho zu detektieren. Folglich war eine Bestimmung der mechanischen Eigenschaften der Sphäroide nicht möglich. Es werden mathematische Verfahren benötigt, um komplexe Rückstreuereignisse (*backscatter*) aufzulösen und spezifischen zellulären Strukturen zuzuordnen. Die Entwicklung solcher Verfahren und Signaltheorien ist Gegenstand der aktuellen Forschung, insbesondere bei der Beschreibung apoptotischer Prozesse in Tumormodellen (Strom et Kolios, 2009).

Zur Darstellung individueller Zellen und spezifischer zellulärer Strukturen in 2D-Zellkulturen war das Verfahren geeignet. Neben der Abbildung von Zellorganellen, wie z.B. Nuklei mit den Nucleoli oder Lipidvesikel, konnten die spezifischen Strukturen der ECM in Chondroblasten und Osteoblasten dargestellt werden (**vgl. Abschnitt 3.4.1**). In den Osteoblastenkulturen wurden relativ dicke fibrilläre Strukturen exprimiert, die aufgrund der korrespondierenden histologischen Färbungen als Kollagen-1 identifiziert wurden. Demgegenüber wurden in den Chondroblastenkulturen unterschiedliche fibrilläre Strukturen abgebildet. In Osteoblasten ist Kollagen-1 mit 90% das häufigste Strukturprotein der organischen extrazellulären Matrix. Chondroblasten hingegen exprimieren verschiedene Kollagene und elastische Faserproteine, wie z.B. Proteoglykane und saure Mukosubstanzen, die auch histologisch in den untersuchten Zellkulturen nachgewiesen wurden (**vgl. Abschnitt 3.4.5**). Durch das granuläre Erscheinungsbild der Kollagenfibrillen in den

Osteoblastenkulturen konnte sogar auf die Einlagerung von Hydroxylapatitkristallen geschlossen werden. Dieses wurde durch die korrespondierende von Kossa-Färbung bestätigt (**vgl. Abschnitt 3.4.5**).

Charakterisierung der zellmechanischen Eigenschaften bei der multipotenten Differenzierung

Ultraschall basiert auf einer Diskriminierung von Geweben und Organen aufgrund ihrer unterschiedlichen mechanischen Eigenschaften. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die für die mechanischen Eigenschaften relevanten zellulären Strukturparameter in den differenzierten BM-MSC-Kulturen untersucht. Die mechanischen Eigenschaften von Zellen und Geweben werden maßgeblich durch die Struktur des Zytoskeletts und der Zusammensetzung der Zellmembran bestimmt (Tiushkin *et Cho*, 2007, Boutin *et al.*, 2009). Des Weiteren sind die Komposition der extrazellulären Matrix, aber auch intrazelluläre Organellen, z.B. Lipidvesikel, und der relative Zytoplasmagehalt relevant für die mechanischen Eigenschaften von Zellen und Geweben (Wang *et Ingber*, 1994, Rowlands *et al.*, 2008, Weiss *et al.*, 2007, Guilak *et Mow*, 2000, Kundu *et al.*, 2006). Eine histologische Charakterisierung des Aktinzytoskeletts und verschiedener Strukturparameter der ECM (**vgl. Abschnitt 3.4.4 und 4.4.5**) demonstrierte spezifische Änderungen infolge der Differenzierung in die adipogene, chondrogene und osteogene Richtung. Die Lipidzusammensetzung der Zellmembran, die die Membranfluidität bestimmt, und der Zytoplasmagehalt der Zellen konnten mit den gegebenen Mitteln nicht untersucht werden.

Neben der Frage, ob die mechanischen Eigenschaften spezifisch für unterschiedliche Differenzierungsrichtungen sind, stellt sich die Frage nach der biologischen Relevanz dieses Parameters. Die spezifischen mechanischen Eigenschaften von Zellen korrespondieren mit der Funktionalität *in vivo* (Ingber, 2003, Huang *et Ingber*, 2000). Die Funktion von Knochen oder Knorpel für die strukturelle Integrität des Skelettes und die elastische Dämpfung mechanischer Kräfte ist obligatorisch. Aber auch Fettzellen sind nicht nur Energiespeicher, sondern wichtig zur viskosen Lagerung der Organe. Konventionelle analytische Methoden zur Charakterisierung von Stammzellen untersuchen oftmals die Geninduktion oder Expression einiger Proteine. Offen bleibt, ob die Expression einiger Differenzierungsmarker notwendigerweise den Beweis darstellt, dass die *in vitro* differenzierten Zellen die gleiche Funktionalität aufweisen wie Zellen *in vivo*. Neben dem Vorteil der nicht invasiven Charakterisierung werden im Ultraschall die für die physiologische Funktionalität grundlegenden mechanischen Eigenschaften dargestellt. Dieser Ansatz, die mechanischen Eigenschaften von hES-Zellen oder MSCs als funktionalen Marker von Differenzierungsprozessen zu verstehen, gewinnt in den letzten Jahren an Bedeutung (Ofek *et al.*, 2009, Darling *et al.*, 2008, Rowlands *et al.*, 2008, Pan *et al.*, 2005). Die Charakterisierung der mechanischen Eigenschaften von Zellen und Geweben wird dabei mit verschiedenen Verfahren durchgeführt, die eine mechanische Kraft direkt auf die Zellen applizieren, wie z.B. dem Rasterkraftmikroskop oder Deformationsmessungen bei Aspiration in eine Kapillare. Diese Arbeit präsentiert den ersten Versuch, die mechanischen Eigenschaften von MSCs bei der Differenzierung in Adipozyten, Chondroblasten und Osteoblasten nicht invasiv und unter vitalen Bedingungen mittels akustischer Mikroskopie bei 1 GHz zu charakterisieren. Um die Hypothese zu untersuchen, dass die spezifischen zellmechanischen Eigenschaften einen nicht invasiven Marker für die Differenzierung von

Stammzellen darstellen, wurden die beschreibenden Echos für die Viskosität und Steifigkeit der Zellen quantifiziert.

Interessanterweise waren die Adipozyten die Zellen mit der höchsten Steifigkeit und der geringsten Viskosität. Lipide (zur Orientierung: Glycerin = 14.100 Poison, Olivenöl = ca. 1.000 Poison) weisen eine physikalisch höhere Viskosität auf als Wasser (10 Poison bei 20°C) (Tipler *et* Mosca, 2009). In Anbetracht, dass das Zytoplasma als wässrige Flüssigkeit aufgefasst werden kann (zur Orientierung: Blutplasma = 11 - 13 Poison bei 37°C; Kesmarky *et al.*, 2008), hätte man eine hohe Viskosität dieser Zellen erwartet. Orientiert man sich an der Viskosität verschiedener lipidähnlicher Substanzen, wird deutlich, dass die Viskosität der eingelagerten Lipide im Vergleich zu den Zellmembranen mit 10^7 - 10^{10} Poison gering ist (Rand, 1968). Die detektierten zellmechanischen Eigenschaften der Adipozyten stehen in direkter Korrelation mit den histologischen Befunden und den physikalischen Eigenschaften von Lipiden. Die Zellen waren prall gefüllt mit zahlreichen Lipidvesikeln und wiesen ein eng strukturiertes Aktinzytoskelett (**vgl. Abschnitt 3.4.4**) zur mechanischen Stabilisierung auf. Dies erklärt die vergleichsweise hohe Steifigkeit der Zellen. Die geringe Viskosität dieser Zellen ist auf die eingelagerten Lipide mit vergleichsweise geringer Viskosität in Bezug zu anderen biologischen Komponenten zurückzuführen.

Im Vergleich zu den Adipozyten waren die untersuchten Chondroblasten viskose Zellen mit einer geringeren Steifigkeit. Diese gemessenen mechanischen Eigenschaften lassen sich auf die Expression elastischer Strukturproteine, z.B. Elastin oder Kollagene, und der Einlagerung und Bindung von Wasser zurückführen. Insbesondere die Hydratisierung von Proteoglykanen und Hyaluron ermöglicht die gleitende Beweglichkeit der ECM-Strukturproteine (Culav *et al.*, 1999). Es ist zwar Konsens, dass Knorpelgewebe starker mechanischer Belastung standhält, aber andererseits ist auch bekannt, dass die Stabilität von der Zusammensetzung verschiedener Strukturproteine und deren Vernetzung abhängt, die erst infolge der mechanischen Belastung organisiert wird. Es ist wahrscheinlich, dass *in vitro* differenzierte Chondroblasten nicht die gleiche Funktionalität aufweisen wie körpereigene Zellen.

Die untersuchten Osteoblasten unterschieden sich hinsichtlich der Viskosität nur geringfügig von den Chondroblasten. Auch wenn die Viskosität der Zelllayer annähernd gleich war, waren die Osteoblasten von den Chondroblasten durch die höhere Steifigkeit der Zellen zu diskriminieren. Ein direkter Vergleich ist schwierig, dennoch korrespondiert dieser Sachverhalt prinzipiell mit einer bereits veröffentlichten Untersuchung der mechanischen Eigenschaften von MSCs mittel *atomic force microscopy*. Dort wird eine höhere Steifigkeit von Osteoblasten im Vergleich zu Chondroblasten beschrieben (Darling *et al.*, 2008).

4.5 Kapitelübergreifende Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das osteogene Differenzierungspotential der humanen mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark, dem Fettgewebe und dem Nabelschnurblut mit der humanen embryonalen Stammzelllinie hES H1 vergleichend charakterisiert. Die Untersuchungen erfolgten an 2D und 3D *in vitro* Kulturmodellen, wobei nicht invasive Methoden verwendet und hinsichtlich der Eignung zur Messung von Differenzierungsprozessen evaluiert wurden.

Die Charakterisierung des osteogenen Potentials in 2D-Kulturen zeigte, dass alle untersuchten MSC-Populationen und hES H1 *in vitro* in Osteoblasten differenzierten. Die quantitativen Analysen demonstrierten dabei Unterschiede in dem Ausmaß der Mineralisierung (**vgl. Abschnitt 3.1.9 und 3.1.10**). Die MSCs aus dem Knochenmark und dem Fettgewebe demonstrierten ein vergleichbares osteogenes Potential, während CB-MSCs und hES H1 schneller differenzierten. Trotz des hohen osteogenen Potentials der hES H1 in 2D-Zellkulturen (**vgl. Abschnitt 3.1.8 und 3.1.9**) und des unbeschränkten Replikationsvermögens (Thomson *et al.*, 1998) erscheinen diese Zellen aufgrund der aufwendigen Kultivierung nur eingeschränkt geeignet für Applikationen, die hohe Zellzahlen erfordern. Ein weiteres Bewertungskriterium für das Potential der unterschiedlichen MSC-Populationen war das Proliferationsvermögen. BM-MSCs und AT-MSCs waren *in vitro* expandierbar und es konnten große Zellzahlen erzeugt werden (**vgl. Abschnitt 3.1.2**). Dabei zeigten die vier untersuchten Chargen BM-MSCs aufgrund von Altersunterschieden der Spender und pathologischen Prozessen im Isolationsmaterial Unterschiede in der Proliferation (Stenderup *et al.*, 2003). Aufgrund der eingeschränkten Proliferation *in vitro* waren CB-MSCs nicht geeignet, um größere Zellzahlen zu erzeugen. Daher mussten diese Zellen von der impedanzspektroskopischen Untersuchung ausgeschlossen werden. Die in dieser Arbeit verwendeten CB-MSCs hatten wahrscheinlich aufgrund einer nicht optimalen Isolation ein eingeschränktes Potential (Bieback *et al.*, 2004).

Um die Charakterisierung der osteogenen Differenzierung der Stammzellkulturen in 3D zu ermöglichen, musste ein geeignetes *in vitro* Modell etabliert werden. Da bekannt ist, dass materialspezifische Einflüsse die Zelladhäsion und Differenzierung beeinflussen (Dekker *et al.*, 2003, Ohgushi *et al.*, 1999, Mauney *et al.*, 2004), sollten die Untersuchungen an einem trägerfreien Modell erfolgen. Ein wichtiges Bewertungskriterium war neben der osteogenen Differenzierung und der Vitalität, die Reproduzierbarkeit der zellulären Aggregation. Die Aggregate sollten eine definierte Geometrie aufweisen und homogen in ihrer Größe sein, da Faktoren wie die Aggregatgröße beispielsweise die Nährstoffversorgung beeinflussen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden gezeigt, dass mit einem einfachen Kulturverfahren kompakte, runde Aggregate (Sphäroide) gleicher Größe (max. Standardabweichung 12%) erzeugt werden konnten. Dieses wurde durch die Kultivierung einer definierten Zellkonzentration in nicht adhäsiven 96-well Kulturplatten realisiert (**vgl. Abschnitt 3.2.1 und 3.2.2**). Es existieren nur wenige Arbeiten zur osteogenen Differenzierung in trägerfreien 3D *in vitro* Modellen (Muraglia *et al.*, 2003, Kale *et al.*, 2000, Wang *et al.*, 2009). Die Arbeit von Muraglia *et al.*, 2003 beschreibt dabei die Ausbildung runder Aggregate, die zuerst mit chondrogenen Differenzierungsfaktoren und dann mit osteogenen Differenzierungsfaktoren behandelt werden, um die Mineralisierung zu induzieren. Die Aggregation und Differenzierung erfolgt in 15 ml Reaktionsgefäßen aus Polypropylen. Dieses Kultursystem wurde im Rahmen dieser Arbeit getestet, wobei die

osteogene Differenzierung erfolgreich induziert wurde, ohne dass eine Vordifferenzierung in Chondroblasten durchgeführt wurde. Dieses Kultursystem war aber aufgrund der hohen Zellzahlen nicht geeignet, um einen hohen Parallelisierungsgrad zu ermöglichen. Während in der Arbeit von Kale *et al.*, 2000 die Sphäroide irregulär geformt sind, wird die Formation homogener und regulär geformter Sphäroide von Wang *et al.*, 2009 demonstriert, wobei keine Untersuchung der Sphäroidgröße und Bestimmung der Standardabweichung erfolgte. Dabei wurde ein mikrostrukturiertes Glassubstrat benutzt, während in dieser Arbeit kommerziell erhältliche Kulturplatten verwendet wurden.

Alle untersuchten MSC-Populationen differenzierten auch im Sphäroidmodell in Osteoblasten, wie die Expression mineralisierter ECM demonstrierte (**vgl. Abschnitt 3.2.3**). Dabei erfolgte bereits nach 21 Tagen eine großflächige Mineralisierung der Sphäroide, während BM-MSCs und AT-MSCs in 2D-Zellkulturen zu diesem Zeitpunkt nur eine geringfügige Mineralisierung zeigten. Es ist bekannt, dass in 3D-Kulturen komplexe Interaktionen der Zellen untereinander und mit der ECM physiologische Bedingungen imitieren und zelluläre Prozesse, wie z.B. Proliferation oder Differenzierung, beeinflussen (Berrier *et al.*, 2007). In diesen Sphäroidkulturen nehmen die Zellen ihre natürliche Form an, während in 2D-Kulturen eine künstliche Zellgeometrie und flächige Ausbreitung der Zellen die zellulären Eigenschaften verändern (Rossi *et al.*, 2005). Demzufolge ist das im Rahmen dieser Arbeit etablierte trägerfreie Kulturmodell hochgradig geeignet, um die osteogene Differenzierung der MSCs unter reproduzierbaren Bedingungen zu untersuchen.

Im Gegensatz zu den mesenchymalen Stammzellen demonstrierten die hES H1-Zellen keine osteogene Differenzierung im Sphäroid (**vgl. Abschnitt 3.2.3 und 3.3.10**). Die Tatsache, dass embryonale Stammzellen eine geringere Entwicklungsstufe präsentieren als MSCs, könnte eine mögliche Erklärung darstellen. Dem widerspricht aber, dass in 2D-Kulturen bereits nach 21 Tagen eine großflächige Mineralisierung demonstriert wurde und folglich eine Differenzierung dieser Zellen in reife Osteoblasten prinzipiell induzierbar war. Ob dieses Phänomen eine zufällige Chargenabhängigkeit widerspiegelt, an der prinzipiellen Ähnlichkeit der Sphäroide zum EB begründet war oder an einer Unterversorgung der Zellen im Inneren der Aggregate lag, ist spekulativ. Zur Klärung dieses Sachverhaltes sind weitere Untersuchungen angezeigt. Es sollten andere Zellchargen und zusätzliche Differenzierungsfaktoren, wie z.B. BMP-2, sowie alternativ eine Kultivierung auf Trägermatrices untersucht werden. Zudem sollte die Zellproliferation, z.B. mittels Ki67-Färbung, sowie apoptotische Prozesse in den Sphäroidkulturen untersucht werden, um die Ursache der geringen metabolischen Aktivität (**vgl. Abschnitt 3.2.2**) und der toten Zellen im Inneren der Sphäroide (**vgl. Abschnitt 3.3.10, Abb. 66**) zu bestimmen. Da ebenfalls eine spontane Differenzierung nicht auszuschließen ist, wäre eine Untersuchung auf andere Gewebemarker, z.B. mittels eines DNA-*microarray*, hochgradig interessant.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde anhand der etablierten 2D- und 3D-Kulturmodelle untersucht, inwiefern sich mit nicht invasiver Impedanzspektroskopie und akustischer Mikroskopie der osteogene Differenzierungsprozess charakterisieren lässt. Beide Verfahren wurden bislang noch nicht für diese Fragestellung eingesetzt. Daher war es zuerst notwendig zu evaluieren, ob man mit diesen Verfahren Differenzierungsprozesse messen und anhand der erhaltenen Daten einen definierenden Parameter bestimmen kann. Zur Interpretation der gemessenen Spektren war es initial notwendig, die Randbedingungen und Messeinflüsse, wie z.B. die Sphäroidgröße und Positionierung oder das Kulturmedium (**vgl. Abschnitt**

3.3.3), auf die Impedanzmessungen zu evaluieren. Dabei zeigte sich, dass im Gegensatz zum Betrag der Impedanz der Phasengang ein unabhängiger Parameter war und folglich geeignet zur Beschreibung osteogener Prozesse. Die Impedanzspektren der nativen und osteogenen BM-MS- und AT-MS-basierten Sphäroide wurden kulturbegleitend am Tag 7, Tag 14 und Tag 21 ermittelt (**vgl. Abschnitt 3.3.4 und 3.3.5**). Auf Basis der gemessenen Impedanzspektren konnte eindeutig belegt werden, dass die osteogene Differenzierung mit charakteristischen Änderungen der Impedanzspektren korrelierte. Dabei war insbesondere die Änderung des Dispersionsverlaufs des Phasengangs von besonderer Bedeutung, da dieser Parameter geometrieunabhängig war. In den osteogenen Sphäroiden wurde bereits nach 7 Tagen eine stärkere Dispersion detektiert als in den nativen Sphäroiden, aber erst zum Zeitpunkt der Mineralisierung kam es zu einer Veränderung der Kurvenform. Diese Dispersion wurde durch unterschiedliche Relaxationsprozesse in den Sphäroiden verursacht. Dabei indizierte diese Änderung in der Ausprägung und Form des Phasengangs, dass in den osteogen differenzierten Sphäroiden andere bzw. zusätzliche Gewebeparameter zur Systemantwort beitrugen als in den nativen Kontrollen. Die Sphäroide waren heterogen und diese Heterogenität konnte durch eine Regressionsanalyse des Kurvenverlaufs beschrieben werden (**vgl. Abschnitt 3.3.9**). Da die Kurvenform mineralisierter Sphäroide spezifisch war, scheint dieser Gewebestrukturparameter geeignet zu sein, osteogene Prozesse auch ohne den direkten Vergleich zu einer nativen Kontrolle zu beurteilen.

In den hES H1-basierten Sphäroiden, die eine heterogene Zelldistribution mit großen Hohlstrukturen aufwiesen, aber nicht in Osteoblasten differenzierten, wurde ebenfalls ein nicht gerader Dispersionsverlauf im Phasengang nachgewiesen (**vgl. Abschnitt 3.3.9**). Dieses Dispersionsgebiet erstreckte sich aber über einen größeren Frequenzbereich als das Dispersionsgebiet der differenzierten MS-Sphäroide. Es ist davon auszugehen, dass das Dispersionsgebiet charakteristisch für die Art der Heterogenität der Proben ist. Zum Vergleich sollten die Impedanzspektren nekrotischer Sphäroide ermittelt werden. Geeignet wären beispielsweise 3D-Tumorzellaggregate, da in diesen Modellen das Auftreten eines nekrotischen Kerns bereits charakterisiert ist (Mueller-Klieser, 1997, Kelm *et al.*, 2002).

Konventionell erfolgt die Auswertung von Impedanzspektren anhand elektrischer Gewebemodelle. Dabei werden die Einflüsse der zugrunde liegenden Gewebestrukturparameter, z.B. die Membrankapazität sowie der intra- und der extrazelluläre Widerstand, auf die gemessenen Impedanzen untersucht (Fricke *et* Morse, 1925, Grimnes *et* Martinsen, 2008). Ein Nachteil dieser Art der Auswertung war, dass die Ergebnisse von der Sphäroidgeometrie beeinflusst wurden. Dies resultierte aus der Tatsache, dass neben dem größenunabhängigen Phasengang ebenfalls der Kurvenverlauf des Betrags der Impedanz relevant für die Berechnung der Modellparameter mittels LabVIEW2 war. Die Heterogenität der Sphäroide konnte mit diesem Verfahren nicht bestimmt werden, da elektrische Modelle mit mehr als 2-freien Parametern zu hohen Fehlern führten (**vgl. Abschnitt 3.3.7**). Die Änderung der Impedanzspektren in den osteogenen Sphäroiden wurde maßgeblich durch den extrazellulären Widerstand induziert (**vgl. Abschnitt 3.3.8**). Dieser Befund korrelierte mit den histologischen Untersuchungen, welche die Expression mineralisierter ECM belegen. Änderungen des extrazellulären Widerstandes der Proben durch eine inhomogene Zellverteilung konnten ausgeschlossen werden. In nicht erfolgreich differenzierten Sphäroiden waren die Änderungen des extrazellulären Raums auf eine inhomogene Zellverteilung zurückzuführen, wie z.B. bei hES H1, oder nicht signifikant. Dass Änderungen des extrazellulären Raums maßgeblich die gemessenen Impedanzen verursachen, steht in

Konsens mit den biologischen Prozessen. Die Expression einer kollagenhaltigen ECM und der Mineralisierungsprozess gelten als die funktionalen Charakteristika von Osteoblasten (Heng *et al.*, 2004, Caplan, 1991). Dies unterstreicht die Eignung des Verfahrens zur nicht invasiven Überwachung und Charakterisierung spezifischer zellulärer Veränderungen.

Im Vergleich zur Impedanzspektroskopie hatte das ultraschallbasierte Verfahren den Vorteil, dass zelluläre Strukturen mit einer hohen Auflösung abgebildet wurden. Dabei wurden nicht nur Zellen und subzelluläre Strukturen, z.B. Nuklei, Nucleoli, Lipidvakuolen und fibrilläre ECM, dargestellt, sondern es konnte sogar die Mineralisierung fibrillärer ECM gezeigt werden (**vgl. Abschnitt 3.4.1**). Dabei ist das Auflösungsvermögen von akustischer Mikroskopie frequenzabhängig und steht reziprok zur Durchdringungstiefe. Während 2D-Zellkulturen in ihrer gesamten Tiefe charakterisiert wurden, war dieses Verfahren auf eine Abbildung diskreter Strukturen auf der Sphäroidoberfläche beschränkt bzw. auf eine Detektion komplexer Reflexionen der Kollagenmatrix in tieferen Schichten des Sphäroides (**vgl. Abschnitt 3.4.3**). Dabei beruht die Reflektivität des Schalls auf den mechanischen Eigenschaften von Zellen und Geweben. Wenn dieses Verfahren die Diskriminierung unterschiedlicher Gewebe *in vivo* leistet, sollte dieses Prinzip auch auf zellulärer Ebene anzuwenden sein. Dabei ist akustische Mikroskopie bereits ein anerkanntes Verfahren zur Untersuchung der mechanischen Eigenschaften von Zellen (Strom *et al.*, 2009, Kundu *et al.*, 2000, 2006). Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Eignung von akustischer Mikroskopie zur Charakterisierung von Differenzierungsprozessen untersucht werden. Dieser Ansatz basiert auf der Annahme, dass die mechanischen Eigenschaften von Zellen spezifisch sind und folglich als Differenzierungsmarker dienen können (Darling *et al.*, 2008, Ofek *et al.*, 2009). Um dies zu untersuchen, wurden die mechanischen Eigenschaften der BM-MSCs nach Differenzierung in Osteoblasten, Chondroblasten und Adipozyten bestimmt (**vgl. Abschnitt 3.4.2**). Dabei wurden spezifische Änderungen der Viskosität und zellulären Steifigkeit demonstriert und die zugrunde liegenden zellulären Strukturänderungen untersucht. Die mechanischen Eigenschaften von Zellen werden durch verschiedene Faktoren bestimmt, wie beispielsweise dem Zytoskelett oder der ECM (Wang *et Ingber*, 1994, Guilak, 2000, Pan *et al.*, 2005). Dass insbesondere die Expression einer gewebespezifischen ECM mit dem Differenzierungsprozess der BM-MSCs korreliert, ist obligatorisch und wurde im Rahmen dieser Arbeit durch histologische Färbungen gezeigt (**vgl. Abschnitt 3.4.5**). Aber auch das Zytoskelett wird infolge der Differenzierung umorganisiert (Tikushkin *et Cho*, 2007, Rodriguez *et al.*, 2004) und eine Untersuchung des Aktinzytoskelettes demonstrierte spezifische Änderungen bei der Differenzierung in Adipozyten, Chondroblasten und Osteoblasten (**vgl. Abschnitt 3.4.4**). Die mittels akustischer Mikroskopie detektierten zellmechanischen Eigenschaften stehen in Korrelation mit diesen intra- und extrazellulären Strukturänderungen. Dabei stellt der Ansatz der Zellmechanik die Funktionalität der spezialisierten Zellen in den Vordergrund. Bei pathologischen Prozessen, z.B. Osteoarthritis, wurde eine geringere Elastizität im Vergleich zu gesundem Knorpelgewebe festgestellt, welche primär durch eine Änderung des Aktinzytoskelettes hervorgerufen wurde (Steklov *et al.*, 2009). Daher wäre es interessant, die mechanischen Eigenschaften der *in vitro* differenzierten Zellen mit denen von primären Gewebezellen zu vergleichen.

Ein direkter Vergleich von Impedanzspektroskopie und akustischer Mikroskopie zeigt, dass beide nicht invasive Verfahren sekundäre Parameter bei der Stammzellendifferenzierung nachweisen. Mit Impedanzspektroskopie wurden die Änderungen der dielektrischen Eigenschaften erfasst. Dabei waren in den Impedanzspektren der osteogenen Sphäroide

bereits nach 7 Tagen charakteristische Änderungen im Vergleich zu den nativen Sphäroiden zu erkennen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die zugrundeliegenden zellulären Parameter untersucht, wobei die Heterogenität der Sphäroide bestimmt wurde. Des Weiteren wurde mittels elektrischer Modellbildung eine Erhöhung des extrazellulären Widerstands infolge der Expression einer osteoblastentypischen extrazellulären Matrix nachgewiesen. Mit diesem Verfahren war es demzufolge möglich, bereits nach 7 Tagen Aussagen über den Differenzierungsprozess zu treffen. Es bleibt aber zu bedenken, dass mittels konventioneller Methoden, wie z.B. die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte *real time* PCR, ebenfalls zu diesem frühen Zeitpunkt die Regulation osteoblastentypischer Gene nachweisbar war. Mittels akustischer Mikroskopie wurden die zellmechanischen Eigenschaften erfasst, die durch verschiedene Parameter wie das Zytoskelett oder die ECM beeinflusst wurden. Dieses Verfahren hatte den Vorteil, dass spezifische zelluläre Strukturen auch innerhalb eines Zelllayers abgebildet wurden. Dabei charakterisiert akustische Mikroskopie die Zellen aufgrund morphologischer Aspekte. Demnach können entwicklungsbiologische Prozesse erst nach erfolgter Expression der relevanten Strukturparameter nachgewiesen werden und sind folglich ebenfalls mit konventionellen Methoden nachweisbar.

Das Ziel dieser Arbeit war eine Charakterisierung der Stammzellen in 2D- und 3D-Zellkulturen. Für die nicht invasive Charakterisierung der 3D-Sphäroide war das impedanzspektroskopische Verfahren hochgradig geeignet. Dieses Verfahren war schnell und ermöglichte eine Untersuchung vieler paralleler Proben, wodurch eine potentielle Applikation im *screening* verschiedener Differenzierungsfaktoren oder pharmakologischer Substanzen eröffnet wird. Mit dem akustischen Mikroskop wurden im Rahmen dieser Arbeit hauptsächlich 2D-Zellkulturen untersucht, da die verwendete akustische Linse mit einer Mittenfrequenz von 1 GHz zu hochauflösend für die Untersuchung der Sphäroide war. Dieses stellte aber keine generelle Limitation des Systems dar, da die akustischen Linsen sehr einfach ausgetauscht werden konnten. Bei einer Frequenz von 400 MHz wurde fibrilläre ECM in osteogenen BM-MSK-basierten Sphäroiden abgebildet, wobei die mechanischen Eigenschaften auch bei dieser Frequenz nicht bestimmbar waren. Für diese Applikation sollte eine 200 MHz Linse getestet werden, die eine höhere Durchdringungstiefe ermöglicht.

Eine abschließende Betrachtung der Ergebnisse zeigt, dass die Zielsetzung der Arbeit erfüllt wurde. Es wurde ein trägerfreies *in vitro* Modell etabliert, welches die Charakterisierung der osteogenen Differenzierung der Stammzellkulturen unter reproduzierbaren Bedingungen ermöglichte. Die Heterogenität als beschreibender Parameter für Differenzierungsprozesse in den Sphäroiden konnte mittels Impedanzspektroskopie bestimmt werden, ohne dass eine Charakterisierung der Sphäroidgröße als Maß für die Zellzahl notwendig war. Dabei wurde gezeigt, dass die AT-MSK-basierten Sphäroide schneller differenzierten, als die BM-MSK-basierten Sphäroide. In einem vergleichbaren Kulturzeitraum wurde in diesem 3D *in vitro* Modell keine Differenzierung von hES H1 induziert, obwohl diese Zellen in 2D-Kulturen erfolgreich differenzierbar waren. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass akustische Mikroskopie geeignet war zur Charakterisierung von Entwicklungsprozessen der Stammzellen in 2D-Kulturen und eine hochauflösende Abbildung zellulärer Strukturen ermöglichte.

5. Zusammenfassung

1. Humane mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark, dem Nabelschnurblut und dem Fettgewebe wurden hinsichtlich der proliferativen Kapazität und des osteogenen Differenzierungspotentials in konventionellen 2D-Zellkulturen charakterisiert. Die untersuchten MSC-Populationen demonstrierten ein hohes osteogenes Potential. Nach einer Stimulationsperiode von 21 - 24 Tagen mit löslichen Differenzierungsfaktoren wurden eine gesteigerte Aktivität der Alkalischen Phosphatase, die Expression einer Kollagen-1-haltigen extrazellulären Matrix und deren Kalzifizierung nachgewiesen. Die proliferative Kapazität der CB-MSCs war im Vergleich zu den BM-MSCs und AT-MSCs stark eingeschränkt.

2. Für die Kultivierung und osteogene Differenzierung der hES H1-Zellen wurden geeignete Kulturverfahren etabliert. Untersucht wurde der Einfluss der Kultivierungsdauer in einer EB-Kultur im Vergleich zu einer direkten Differenzierung der Zellen. Es wurde demonstriert, dass eine längere Kulturdauer im EB die Differenzierung in mesenchymale Vorläuferzellen positiv beeinflusste. Nach ca. 22 Tage Subkultivierung im EB hatten die Zellen ein höheres osteogenes Potential als nach 5 Tagen. hES H1-Kulturen, die direkt differenziert wurden, bildeten heterogene Zellschichten aus mit EB-artigen Strukturen. Eine direkte Differenzierung der hES H1-Kulturen war prinzipiell möglich, dabei erfolgte die Expansion des Ausgangsmaterials ausschließlich durch die zeitintensive Kokultivierung der hES H1-Kolonien mit den *feeder*-Zellen. Da bei der Kultivierung im EB eine Zunahme der Zellmasse erfolgte, war diese Methode geeigneter, um größere Zellzahlen zu generieren.

3. Gegenstand dieser Arbeit war die Etablierung eines trägerfreien 3D *in vitro* Modells für die osteogene Differenzierung der Stammzellen. Neben der Vitalität und der osteogenen Differenzierbarkeit der Aggregate in dem Kultursystem sollte die zelluläre Aggregation reproduzierbar sein. Die Aggregate sollten sphärikal sein und homogen in ihrer Dimension. Durch eine Kultivierung im hängenden Tropfen konnten homogene Sphäroide generiert werden. Diese Methode ermöglichte aber keinen Mediumwechsel und war daher nicht geeignet zur Langzeitkultivierung und Differenzierung. Nach Transfer in eine Rotationskultur wurde die Formation von multi-Aggregaten mit einer reduzierten Vitalität beobachtet. Das Phänomen der multi-Aggregation konnte in einer Gelkultur mit Methylcellulose unterbunden werden. Da aber die Zellaggregation im hängenden Tropfen durchgeführt und die Sphäroide anschließend in die Gelkultur transferiert wurden, war dieses Kultursystem nur eingeschränkt praktikabel. Besonders geeignet waren Kultursysteme, bei denen die Aggregation in individuellen, nicht adhäsiven Kulturgefäßen erfolgte. Eine Kultivierung in U-förmigen, nicht adhäsiven 96-well Platten erfüllte alle Spezifikationen.

4. Durch die Kultivierung einer Zellsuspension in U-förmigen, nicht adhäsiven 96 well Zellkulturplatten wurde die Formation von spherikalen Aggregaten induziert. Die MSC-basierten Sphäroide demonstrierten unabhängig von der Gewebepopulation, BM-MSCs, AT-MSCs und CB-MSCs, prinzipiell ein gleichartiges Verhalten. Im Kulturverlauf von 21 Tagen wurde eine Reduktion der metabolischen Aktivität beobachtet. Es ist davon auszugehen, dass durch 3D-Interaktionen der Zellen die Proliferation inhibiert wurde (Kontaktinhibition),

da keine Zunahme der Zellmasse erfolgte, sondern eine fortschreitende Kondensation der Sphäroide beobachtet wurde. Insgesamt war die metabolische Aktivität der osteogenen Sphäroide höher als die der nativen Sphäroide, wahrscheinlich aufgrund der Induktion zellphysiologischer Prozesse infolge der Differenzierung. In den MSC-basierten Sphäroidkulturen wurde die Formation von kalzifiziertem Knochengewebe nachgewiesen.

5. Ein Transfer der Kulturmethode für die 3D-Kultivierung der hES H1-Zellen war nicht erfolgreich. In den hES H1-basierten Sphäroiden wurde keine osteogene Differenzierung induziert. Zudem bildeten diese Zellen inhomogene Aggregate mit löchrigen Strukturen aus. hES H1-basierte Sphäroide, die ohne den zusätzlichen Stimulus der osteogenen Differenzierungsfaktoren kultiviert wurden, demonstrierten eine Disaggregation im Kulturverlauf.

6. Zur nicht invasiven Charakterisierung der osteogenen Differenzierung in den stammzellbasierten Sphäroiden wurde ein kapillarbasierter Impedanzmessaufbau verwendet. Der innere Kapillardurchmesser betrug 300 μm . Die Messungen erfolgten bei einer konstanten Spannung von 50 mV. Erfasst wurde ein Frequenzspektrum von 100 Hz - 10 MHz in einer 2-Elektroden Anordnung. Zur Auswertung der experimentellen Impedanzspektren wurde ein LabVIEW-basiertes Programm erstellt.

7. Zur Evaluation nicht spezifischer Messeinflüsse wurden der Einfluss der Sphäroidgröße und des Kulturmediums untersucht. Aufgrund von Chargenschwankungen des Kulturmediums demonstrierte die Basisimpedanz eine Varianz von 15%. Dieser Effekt war bei der Interpretation von Impedanzspektren unterschiedlicher Versuchstage relativ zu berücksichtigen. Des Weiteren war der gemessene Betrag der Impedanz größenabhängig, während der Phasengang einen geometrieunabhängigen Parameter darstellte.

8. Der Prozess der osteogenen Differenzierung in den stammzellbasierten Sphäroiden wurde kulturbegleitend nach 7 Tagen, 14 Tagen und 21 Tagen impedanzspektroskopisch charakterisiert. Die Aufnahme der Impedanzspektren ermöglichte bereits nach 7 Tagen osteogener Induktion eine Diskriminierung von den nativen Kontrollen. In den osteogenen Sphäroiden waren ein höherer Betrag der Impedanz und eine stärker ausgeprägte Dispersion im Phasengang charakteristisch. Des Weiteren wurde im Argand-Diagramm ein stärker ausgeprägter zweiter Kreisbogen demonstriert.

9. Da der Phasengang größenunabhängig war, war er ein geeigneter Parameter zur Bestimmung der osteogenen Differenzierung. Es wurde demonstriert, dass die Kurvenform des Phasengangs spezifisch für Mineralisierungsprozesse war. Während die nativen Sphäroide einen geraden Abfall zeigten, bildete sich mit zunehmendem Differenzierungsgrad ein gekrümmter Kurvenverlauf aus.

10. Nach Interpretation der Impedanzspektren mittels elektrischer Modellbildung wurde als relevanter Gewebestrukturparameter für die Impedanzänderungen der extrazelluläre Widerstand identifiziert. Die histologischen Befunde demonstrierten einen eindeutigen Zusammenhang mit der Expression einer osteoblastenspezifischen extrazellulären Matrix.

11. Ein ultraschallbasiertes Verfahren wurde zur Charakterisierung der osteogenen Differenzierung im Sphäroid angewendet. Es wurden fibrilläre Strukturen der ECM auf der Oberfläche der Sphäroide bei 400 MHz dargestellt, aber aufgrund starker Streureflexionen der ECM war eine Auflösung der inneren Strukturen nicht möglich.

12. Die multipotente Differenzierung der BM-MSCs in Adipozyten, Chondroblasten und Osteoblasten wurde mittels akustischer Mikroskopie bei 1 GHz untersucht. Abgebildet wurden spezifische zelluläre Strukturen, wie der Zellkörper, fibrilläre ECM und deren granuläre Veränderung infolge der Mineralisierung. Intrazelluläre Strukturen, wie z.B. Nuklei mit den Nucleoli und adipozytenspezifische Lipidvakuolen, waren ebenfalls darstellbar.

13. Die Veränderungen der zellmechanischen Eigenschaften bei der multipotenten Differenzierung wurden mittels akustischer Mikroskopie charakterisiert. Die untersuchten Adipozyten, Chondroblasten und Osteoblasten unterschieden sich in ihrer Steifigkeit und Viskosität.

6. Ausblick

Mit dem hier vorgestellten Impedanzmesssystem können zelluläre Prozesse in stammzellbasierten Gewebemodellen nicht invasiv untersucht werden. Es werden folgende Forschungs- und Entwicklungsarbeiten zur weiteren Optimierung des Messsystems und zur weiterführenden Charakterisierung der Zellkulturen empfohlen:

1. Es wurde gezeigt, dass bei gleicher Zellzahl die Sphäroide aufgrund chargenbedingter Heterogenitäten und einer fortschreitenden Aggregation im Kulturverlauf in ihrer Größe variierten. Um eine Positionierung der unterschiedlich großen Sphäroide in dem kapillarbasierten Impedanzmessaufbau zu ermöglichen, war der Messbereich konisch erweitert. Dabei wurde demonstriert, dass die Kompression der Sphäroide einen Einfluss auf den Betrag der Impedanz ausübte. Einerseits durch den Abdichtwiderstand und andererseits durch die resultierende Probenlänge innerhalb der Kapillare. Eine automatische Positionierung und Messung der einwirkenden hydrodynamischen Kraft würde reproduzierbare Bedingungen hinsichtlich der Probenkompression auch bei variierender Sphäroidgröße gewährleisten.

2. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Programm erstellt, welches die Aufbereitung der gemessenen Rohdaten für die nachfolgende Modellbildung sowie die Auswertung der Impedanzspektren im Bode-Diagramm und Argand-Diagramm ermöglichte. In weiterführenden Arbeiten sollte eine direkte Datenerfassung des Messsystems in das Auswertungsprogramm integriert werden. Zusätzliche Funktionen zur Signalanalyse sollten implementiert werden, um relative Änderungen der Impedanzverläufe, Dispersionen, Betrag der Impedanz, Verlauf der Ortskurve im Argand-Diagramm verschiedener Gruppen auszuwerten und Einflüsse der Messapparatur und des Messmediums auf die gemessenen Sphäroidspektren zu bestimmen. Eine Implementierung einer Schnittstelle für ZView2 zur Modellbildung und Parametrisierung der Daten ist ebenfalls angezeigt.

3. Die charakterisierenden Impedanzspektren der osteogenen Sphäroide wurden analysiert. Dabei wurden die Impedanzänderungen auf eine Änderung des extrazellulären Widerstandes infolge der Expression einer osteoblastenassoziierten extrazellulären Matrix zurückgeführt. Um zu evaluieren, ob die gemessenen Spektren spezifisch für die osteogene Differenzierung sind, müssen noch weitere Differenzierungsrichtungen untersucht werden. Insbesondere die chondrogene Differenzierung, die ebenfalls mit der Expression extrazellulärer Strukturproteine korreliert, wäre diesbezüglich von Interesse. Als Positivkontrolle sollten Impedanzspektren von primären Osteoblasten und Chondroblasten analysiert werden. Des Weiteren sollten andere zelluläre Prozesse die ebenfalls Änderungen des extrazellulären Raums induzieren, wie z.B. Apoptose oder Nekrose, als Referenz untersucht werden.

4. Das im Rahmen dieser Arbeit etablierte trägerfreie 3D *in vitro* Modell zielt primär auf eine Applikation im Bereich des Substanz-*screening*. Für einen Einsatz in der regenerativen Medizin sind die Sphäroide zu klein, zudem ist für die Rekonstruktion von Knochen und

Knorpel ein stabilisierendes Trägerkonstrukt zu vorzuziehen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der osteogene Differenzierungsprozess, aber keine klassische Substanzapplikation untersucht. Es sollten Substanzen aus dem Bereich osteoskelettaler Pharmazeutika an diesem Modell getestet werden, um festzustellen ob dieses stammzellbasierte Gewebemodell für diese Applikation geeignet ist. Da eine Vielzahl von Medikamenten über komplexe Stoffwechselwege wirken, ist nicht auszuschließen, dass dieses monozelluläre System nur für toxikologische Tests geeignet ist. Um die Komplexität realer Gewebe zu imitieren, sollten *in vitro* Modelle bestehend aus unterschiedlichen Zelltypen etabliert werden.

5. Für *screening*-Applikationen besteht die Anforderung eines hohen Parallelisierungsgrades, um einen großen Probendurchsatz zu ermöglichen. Dazu sollte das Messsystem in einen *array* mit multiplen Messeinheiten integriert werden. Die Konzeption des *array* sollte Substanzzugaben und Medienwechsel ermöglichen, um einerseits unmittelbare Effekte zu detektieren und um andererseits Langzeitstudien durchzuführen. Der *array* sollte sich an den klassischen Zellkulturgefäßen orientieren. Die Messeinheiten sollten in individuellen Vertiefungen integriert sein. Diese sollten durch eine Membran oder einem Zellsieb vom Medienraum separiert sein, um Probenverluste beim Mediumwechsel zu vermeiden. Ideal wäre ein Probenabstand, der den Zugang mit einer Mehrkanalpipette ermöglicht.

6. Die Integration des impedanzbasierten Messsystems in einem Bioreaktor bietet die Möglichkeit zur zeitkontinuierlichen Prozesskontrolle für die Generierung großer trägerbasierter Zellkonstrukte für die regenerative Medizin. Vorab müssen die Einflüsse des Trägersubstrates, z.B. poröse Kalziumphosphate oder Kollagen, auf die gemessenen Impedanzen charakterisiert werden.

7. Im Rahmen dieser Arbeit war es nicht möglich, die osteogene Differenzierung von hES H1 im Sphäroid zu induzieren. Es müssen additive Stimulantien getestet werden, z.B. BMP-2 oder Calciferol, und eine Verlängerung der Induktionsperiode auf mindestens 30 Tage untersucht werden. Eine trägerbasierte Kultivierung scheint angezeigt, da integrinvermittelte Interaktionen mit knochenähnlichen Substraten osteogene Entwicklungsprozesse fördern. Durch eine trägerbasierte Kultivierung könnte ebenfalls die Problematik der Disaggregation der nativen Kontrollsphäroide behoben werden.

Mit akustischer Mikroskopie können die zellmechanischen Eigenschaften einer 2D-Zellkultur nicht invasiv zu charakterisiert werden. Außerdem werden zelluläre Strukturen innerhalb eines Zelllayers mit hoher Auflösung abgebildet. Es werden folgende weiterführende Forschungsarbeiten zur Evaluation dieses Verfahrens vorgeschlagen:

8. Um zu Evaluieren, ob die zellmechanischen Eigenschaften einen potentiellen und nicht invasiven Marker für Differenzierungsprozesse darstellen, müssen mehr Daten erhoben werden. Die Daten wurden nur an zwei unterschiedlichen Chargen BM-MSCs, jeweils in Doppelbestimmung, generiert. Es müssen weitere Chargen BM-MSCs und auch andere Stammzellpopulationen, wie AT-MSCs und CB-MSCs, untersucht werden.

9. Als Referenz müssen die zellmechanischen Eigenschaften von primären Gewebezellen charakterisiert werden, um eine Aussage über die Qualität der *in vitro* differenzierten Zellen treffen zu können. Insbesondere ein Vergleich mit Zellen aus gesundem Gewebe und aus Geweben mit pathologischen Veränderungen ist interessant.

10. Das akustische Mikroskop kann dieselben Bereiche einer Zellkultur im Phasenkontrast, mittels Fluoreszenz und im Ultraschall darstellen. Zudem kann durch Kombination mit einem Fluidiksystem ein Flüssigkeitsaustausch oder eine Substanzapplikation ermöglicht werden. Zur Interpretation der dargestellten Strukturen im Ultraschall muss der Nachweis spezifischer Marker ebenfalls *in vitro* realisiert werden. Es muss getestet werden, ob zumindest eine kurzzeitige Fluoreszenzmarkierung von Kollagen oder Proteoglykan in vitalen Zellen möglich ist. Erfahrungswerte zeigen, dass eine Fixierung der Zellkulturen mit Formaldehyd die Zellen unspezifisch homogenisiert, so dass nur vitale Zellkulturen untersucht werden konnten. Falls eine Markierung vitaler Zellkulturen nicht möglich sein sollte, müssen andere Fixierungsmethoden, z.B. Ethanol, getestet werden. Verfahren zum *in vitro tracking*, z.B. Kernfärbung mittels Acridin orange oder Calcein zur Markierung der Mineralisierung, stellen eine Alternative dar.

11. Die Zellkulturen verändern ihre Morphologie infolge der Expansion *in vitro*. Die Zellen entwickeln Seneszenzen, die mit einer breiten und flächigen Morphologie korrelieren. Ist es mit akustischer Mikroskopie möglich, diesen Prozess frühzeitig zu detektieren?

7. Anhang

7.1 Material, Geräte und Lösungsformulierungen

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte sowie die Zellkulturmedien und Lösungen aufgelistet.

Chemikalien

Reagenzien und Kits	Hersteller
Agarose	Peqlab, Erlangen
Alizarinrot	Millipore, Schwalbach
Alexa Fluor 568 Phalloidin, A12380	Invitrogen, Karlsruhe
Alkalische Phosphatase Kit, 86R-1kt	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Alpha-MEM	Invitrogen, Karlsruhe
Alcianblau 8GX	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Aceton	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
bFGF	Invitrogen, Karlsruhe
β -Glycerolphosphat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
β -Mercaptoethanol, getestet für die Zellkultur	Invitrogen, Karlsruhe
BMP-2	Natutec, Frankfurt
BSA, Fraktion V	PAA, Marburg
Chloroform	Merck, Darmstadt
3,3-dihexyloxacarbocyanine iodid ($\text{DiOC}_6(3)$)	D-273, Invitrogen, Karlsruhe
DEPC	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dexamethason	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
DMEM, 4,5 mg/ml Glucose	Invitrogen, Karlsruhe
DMEM/F12	Invitrogen, Karlsruhe
DMSO	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
EDTA	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Einbettmedium (<i>tissue tec</i>)	Jung, Leica Instruments GmbH, Wetzlar
Eindeckelmedium mit DAPI (<i>Vectashield</i>)	Axxora, Lörrach
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol (absolut)	Merck, Darmstadt
FACS-Flow, -Clean, -Rinse	Becton Dickinson, Heidelberg
Fixierungs-/Permeabilisierungs Kit	Becton Dickinson, Heidelberg
Formalin, 37%	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Formamid, deionisiert	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Fötales Kälberserum (FKS), Lot075K3396	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Gelatine	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Glucose	Merck, Darmstadt
Glyzerin	Serva, Heidelberg
Hematoxylin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
HEPES, 1 M	Invitrogen, Karlsruhe
IBMX	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
IGF-1	Natutec, Frankfurt
Indomethazin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
iQ SYBR Green Supermix	Biorad, München
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Isoton Coulter Diluent	Beckman Coulter, Krefeld

Reagenzien und Kits	Hersteller
ITS	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
<i>Knock Out Serum Replacer</i>	Invitrogen, Karlsruhe
Kollagenase Typ IV	Invitrogen, Karlsruhe
L-Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
L-Glutarimine (200 mM)	Invitrogen, Karlsruhe
L-Prolin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Methanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Methylcellulose	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Mycoplasmen Detection Kit	Minerva Biolabs (VenorGem)
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat, 100 mM	Invitrogen, Karlsruhe
Nicht essentielle Aminosäuren (100x)	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Nuclear Fast Red</i>	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Oil red O, Adipogenesis Assay kit	Millipore, Schwalbach
Osteogenese-Assay Kit	Millipore, Schwalbach
PBS	Invitrogen, Karlsruhe
Penizillin/Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Poly-2-hydroxyethyl methacrylate (Poly-HEMA)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
QuantiTect Primer-Assay	Qiagen, Hilden
QuantiTect RT Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Safranin O	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Silbernitrat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
SYBR fast PCR Kit	Biorad, München
TGF- β 3	Natutec, Frankfurt
Tris-Base (Tris-hydroxymethyl-aminoethan)	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypsin/EDTA (10x)	Invitrogen, Karlsruhe
WST-1 Kit	Roche, Mannheim
Ziegenserum	Invitrogen, Karlsruhe

Allgemeine Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
15 ml, 50 ml Röhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Deckgläser	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Dentalschaber	Braun, Melsungen
Einmalpipetten, verschiedene Größen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Eppendorf-Reaktionsgefäße, verschiedene Größen	Eppendorf, Hamburg
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
Filtereinheiten Steriflip	Millipore, Schwalbach
Glaskulturgefäße (<i>Cultureslides</i>)	Becton Dickinson, Heidelberg
Glaskulturgefäße, Lab Tec II	Nunc, Langenselbold
Glaswaren	Schott, Mainz
Kanülen	B. Braun, Melsungen
Kryoröhrchen (2 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen

7.1 Material, Geräte und Lösungsformulierungen

Material	Hersteller
Kulturgefäß mit Glasboden (ELISA-Platten)	Becton Dickinson, Heidelberg
Küvetten, UVette 220-1600 nm	Eppendorf, Hamburg
Lochplatten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Nicht adhäsive Zellkulturflaschen	Corning, Amsterdam, Niederlande
Nicht adhäsive, 96-well Platten, U-Förmig	Nunc, Langenselbold
Objektträger, silanisiert	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Parafilm	American National Can Co., Chicago (USA)
Perfusorleitungen	Braun, Melsungen
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Plastikpetrischalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Präparationsbesteck	Braun, Melsungen
Serologische Pipetten	Corning, Amsterdam, Niederlande
Spritzen, verschiedene Größen	Braun, Melsungen
U-förmige, nicht adhäsive 96-well Platten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturgefäße	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturgefäße, 4 well-Platten	Nunc, Langenselbold
Zellsiebe	Becton Dickinson, Heidelberg

Geräte

Gerät	Hersteller
Analysenwaage, CP64	Sartorius, Göttingen
Apotom, Durchlichtmikroskop mit Phasenkontrast- und Fluoreszenzfilter	Zeiss, Jena
Autoklav, 550 EL	Tuttnauer, Breda, Niederlande
Axiophot, Durchlichtmikroskop mit Phasenkontrast- und Fluoreszenzfilter	Zeiss, Jena
Begasungsbrutschrank, BBD6220	Thermo Scientific, Langenselbold
Durchflusszytometer, FACS Calibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Faxitron x-ray, Model 43855D	Faxitron (USA), Vertrieb Rohde und Schwarz, Köln
Fireboy	Integra Biosciences, Fernwald
Gefriermikrotom, CM3050	Leica, Wetzlar
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr, Biberach a. d. Riss
Gefrierträger (<i>Mr. Frosty</i>)	Nalgene Labware, Roskilde, Dänemark
Highlight 3001, Beleuchtungseinheit	Olympus, Hamburg
Impedanzanalyser, Agilent 4294A	Agilent, Böblingen
IX81, inverses Durchlichtmikroskope mit Phasenkontrast- und Fluoreszenzfilter und SIS	Olympus, Hamburg
CC12 CLR Farbkamera, automatischer Probenstisch	
Klimakammer, Typ IX81	Solent scientific, Segenworth, UK
Kolbenpumpe, CellTram vario	Eppendorf, Hamburg
Kühlschrank (4 °C)	Liebherr, Biberach a. d. Riss
Lineareinheit des SASAM, PiezoWalk	Physik Instrumente, Karlsruhe
Mehrkanalpipetten	Eppendorf, Hamburg
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank Klasse2	BDK, Sonnenbühl-Genkingen
Mikrobiologischer Brutschrank, BK4029	Ehret, Emmendingen
Mikroskopkamera	Olympus, Hamburg

Gerät	Hersteller
Mikroskopkamera Olympus SZ-STU2	Olympus, Hamburg
Monitor, Trinitron	Olympus, Hamburg
Motorisierter Mikroskoptisch	Merzhäuser, Wetzlar
Multisizer II, Coulter-Zähler	Beckman Coulter, Krefeld
Orbitalschüttler Polymax 1040	Heidolph, Kelheim
PCR Detektionssystem, MyiQ	Biorad, München
PCR Thermoblock, UNO II	Biometra, Göttingen
Photometer, Bio	Eppendorf, Hamburg
Pieziscanner, PXY D12	PiezoJena, Jena
Präzisionskolbenpumpe CellTram Oil	Eppendorf, Hamburg
Rotationsschüttler Rotimax	Heidolph, Kelheim
SASAM, akustisches Mikroskop, IX81 basiert	Fraunhofer-IBMT, Saarbrücken/ Olympus, Hamburg
SASAM, akustisches Mikroskop/1GHz Linse	kibero GmbH, Saarbrücken
Schüttel-/Mischgerät, REAX top	Heidolph instruments, Schwabach
Schwingungsgedämpfter Tisch, IsoStation	Newport Spectra-Physics, Darmstadt
SLT <i>Rainbow</i> (Spektrometer)	Tecan, Crailsheim
Spannungsquelle, PP 3000	Biometra, Göttingen
Spektrometer, SpectraFluor	Tecan, Crailsheim
Stereomikroskop SMZ 8000 (Binokular)	Nikon, Düsseldorf
Stickstofftank, 35 VHC	Tec Lab, Königstein
Thermocycler, UNO II	Biometra, München
Thermomixer, Compact 5350	Eppendorf, Hamburg
Tiefkühlschrank (-80 °C), HFU 486 HERA freeze	Thermo Scientific, Langenselbold
Wasserbad	Julabo Labortechnik, Seelbach
Zentrifuge, 3K18	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Zentrifuge, Biofuge Pico	Thermo Scientific, Langenselbold
Zentrifuge, Biofuge R	Thermo Scientific, Langenselbold

Steuerungssoftware und Computerprogramme

Computer-Software	Hersteller
<i>Acoustic Researcher</i>	kibero, Saarbrücken
<i>Acoustic Investigator</i>	kibero, Saarbrücken
AnalySIS Pro 5.1. und CellP	Olympus-SIS, Hamburg
Axiovision rel.4.5	Zeiss, Jena
CellQuest Pro	Becton Dickinson, Heidelberg
Gnuplot	Gnuplot, open source
LabVIEW	National Instruments, München
MyiQ, <i>optical system software</i>	Biorad, München
OriginPro	OriginLab Corporation, USA
<i>Vision Development Module</i>	National Instruments, München
xFluor	Tecan, Crailsheim
ZView2 3.1c	Scribner Associates Inc., USA

7.1 Material, Geräte und Lösungsformulierungen

Tab. 12: Verwendete Antikörper bei der Durchflusszytometrie (FACS).

Antigen	Isotyp, Wirt	Konjugation	Angaben zur Verwendung	Hersteller, Bestellnummer
CD31	IgG1, Maus	PE	1:100	BD, 555446
CD44	IgG2b, Maus	PE	1:100	BD, 555479
CD45	IgG1, Maus	PE	1:100	BD, 555483
CD73	IgG1, Maus	PE	1:100	BD, 550257
CD90	IgG1, Maus	PE	1:100	BD, 555596
CD105	IgG1, Maus	PE	1:100	BD, 560839
CD117	IgG1, Maus	PE	1:100	Abcam, ab11290
CD271	IgG1, Maus	PE	1:100	BD, 557196
MHC1	IgG1, Maus	PE	1:100	BD, 555553
OCT-3/4	IgG1, Maus	PE	1:100	BD, 560181
SSEA-3	IgG1, Maus	PE	1:100	BD, 560237
TRA-81	IgG1, Maus	PE	1:100	BD, 560161
Isotyp-Kontrolle	IgG1, Maus	PE	1:100	BD, 555749
Isotyp-Kontrolle	IgG2b, Maus	PE	1:100	BD, 555743

Tab. 13: Verwendete primäre Antikörper bei der qualitativen Immunhistologie.

Antigen	Wirt	Verdünnung	Hersteller, Bestellnummer
OCT-3/4	Maus, monoklonal	1:100	Millipore, mab4401
SOX-2	Maus, monoklonal	1:100	Millipore, mab4343
Nanog	Kaninchen, monoklonal	1:100	abcam, ab21603-100
Proteoglykan	Maus, monoklonal	1:100	Chemicon, MAB2015
Kollagen-1	Maus, monoklonal	1:100	Sigma-Aldrich, C2456
Kollagen-3	Maus, monoklonal	1:100	Sigma-Aldrich, C7808

Tab. 14: Verwendete sekundäre Antikörper bei der qualitativen Immunhistologie.

Antigen	Isotyp, Wirt	Konjugation	Verdünnung	Hersteller, Bestellnummer
anti-Maus	IgG1, Ziege	Alexa Fluor 488	1:200	Invitrogen, A11001
anti-Maus	IgG1, Ziege	Alexa Fluor 568	1:200	Invitrogen, A11004
anti-Kaninchen	IgG1, Ziege	Alexa Fluor 488	1:200	Invitrogen, A11008

Tab. 15: Verwendete Primer bei der quantitativen *real time* PCR. Alle Primer wurden von Qiagen, Hilden bezogen.

Gen	Gensequenz	Hersteller
β -Tubulin	NM000478	QT00089775
Kollagen-1, Typ A1	NM000088	QT00037793
Kollagen-3, Typ A1	NM000090	QT00058233
Osteopontin (OPN)	NM000582	QT01008798
Osteocalcin (OC)	NM199173	QT00232771
<i>Bone Sialoprotein</i> 2 (BSP)	NM004967	QT00093709
RUNX2	NM001015051	QT00020517

Medien, Lösungen und Pufferzusammensetzungen

Medien der Zellkultur

hES H1-Kulturmedium

- 200 ml DMEM-F12
- + 50 ml *Knockout Serum Replacer*
- + 1,25 ml L-Glutamine
- + 1,75 μ l β -Mercaptoethanol
- + 2,5 ml nicht essentielle Aminosäuren (100x)
- + 1 μ g bFGF

EB-Kulturmedium

- DMEM-F12
- + 100 U/ml Penizillin
- + 100 μ g/ml Streptomycin
- + 15% *Knockout Serum Replacer*
- + 15% FKS
- + 1% L-Glutamine
- + 1% nicht essentielle Aminosäuren (100x)

7.1 Material, Geräte und Lösungsformulierungen

MEF-Medium

DMEM

- + 100 U/ml Penizillin
- + 100 µg/ml Streptomycin
- + 10% FKS
- + 1% L-Glutamine

MSC-Kulturmedium

Alpha-MEM

- + 50 U/ml Penizillin
- + 50 µg/ml Streptomycin
- + 15% FKS

Osteogenes Differenzierungsmedium

MSC-Kulturmedium

- + 100 nM Dexamethason
- + 0,3 mM L-Ascorbinsäure
- + 10 mM β-Glycerolphosphat

Adipogenes Differenzierungsmedium

MSC-Kulturmedium

- + 10 nM Dexamethason
- + 5 µM IBMX
- + 200 µM Indomethazin
- + 100 µM IGF-1

Chondrogenes Kontrollmedium

DMEM (4,5 mg/ml Glucose)

- + 50 U/ml Penizillin
- + 50 µg/ml Streptomycin
- + 1 mM Natriumpyruvat
- + 40 µg/ml L-Prolin
- + 10% FKS

Chondrogenes Differenzierungsmedium

Chondrogenes Kontrollmedium

+ 100 nM Dexamethason

+ 0,3 mM L-Ascorbinsäure

+ 1x ITS Supplement

+ 10 ng/ml TGF- β 3

Lösungen und Reagenzien für die Zellkultur

DiOC-Lösung

DiOC₆(3) 1 mg/ml (w/v)

in Ethanol, Lagerung unter Lichtausschluss bei 4°C

Gelatinelösung

Gelatine 0,1% (w/v)

in PBS (pH7,4), 2 h unter Rühren lösen

hES H1-Kryomedium

DMSO 10% (v/v)

hES Kulturmedium 45% (v/v)

FKS 45% (v/v)

Kollagenaselösung

30 mg Kollagenase Typ IV

in 30 ml DMEM/F13 lösen und steril filtrieren

Poly-HEMA

Poly-HEMA 2% (w/v)

Aceton 50% (v/v)

Ethanol 50% (v/v)

Trypsin/EDTA

1ml 10x Trysin/EDTA

in 9 ml PBS

WST-1-Arbeitslösung

10 µl WST-1-Reagenz

+ 90 µl MSC-Kulturmedium

Lösungen für die Histologie

Alcianblau-Färbelösung

Alcianblau 1% (w/v)

in Essigsäure 3% (v/v)

Alizarinrot-Färbelösung

Alizarinrot 2% (w/v)

in dH₂O

pH 4,3 mit Natriumhydroxid (2 M) einstellen

FACS-Fix

Paraformaldehyd 1% (w/v)

NaCl 0,85% (w/v)

in PBS lösen, pH 7,4 einstellen

Formalinlösung

4% Formaldehyd in PBS

Oil red O-Färbelösung

Oil red O 0,3% (w/v)

in Isopropanol

7. Anhang

Phalloidin (200 U/ml)

Phalloidin Alexa Fluor 568 300U

in 1,5 ml Methanol lösen, Stocklösung lagern bei -20°C

Reduktionslösung (von Kossa)

Formaldehyd 9% (v/v)

Natriumcarbonat 5% (w/v)

in dH₂O

Safranin O-Lösung

Safranin O 2% (w/v)

in 50% Ethanol

Silbernitratlösung (von Kossa)

Silbernitrat 5% (w/v)

in dH₂O

Puffer für die PCR

DEPC-Wasser

DEPC 0,1% (v/v)

in dH₂O bei RT für 12 h inkubieren, anschließend 15 min bei 121 °C autoklavieren

TE-Puffer (1x)

Tris-HCL 10 mM

EDTA 1 mM

in dH₂O lösen, pH 7,5 einstellen

TE-Puffer (10x)

Tris-HCL 400 mM

EDTA 10 mM

in dH₂O lösen, pH 8,1-8,5 einstellen

7.2 Programm zur Auswertung der Impedanzspektren

Um die gemessenen Rohdaten anzuzeigen, auszuwählen und zu gruppieren wurde ein LabVIEW-basiertes Programm erstellt. Dieses Programm ermöglichte die Mittelwertbildung und Berechnung der Standardabweichung der Gruppen. Die Graphen können über eine implementierte *gnuplot*-Funktion exportiert werden. Eine ASCII-Exportfunktion macht die Daten allgemein zugänglich und ermöglicht die Modellbildung mittels ZView2.

Bedienung des Programms

Das Programm hat vier verschiedene Ansichten, die über einen Reiter oben links ausgewählt werden (**Abb. 80**). Die einzelnen Ansichten heißen „Groups“, „Single Group“, „Single Group Average“ und „Metagroups“. Das Importieren der Rohdaten ist über die Funktion *Select Data* auf der Registerkarte „Groups“ möglich.

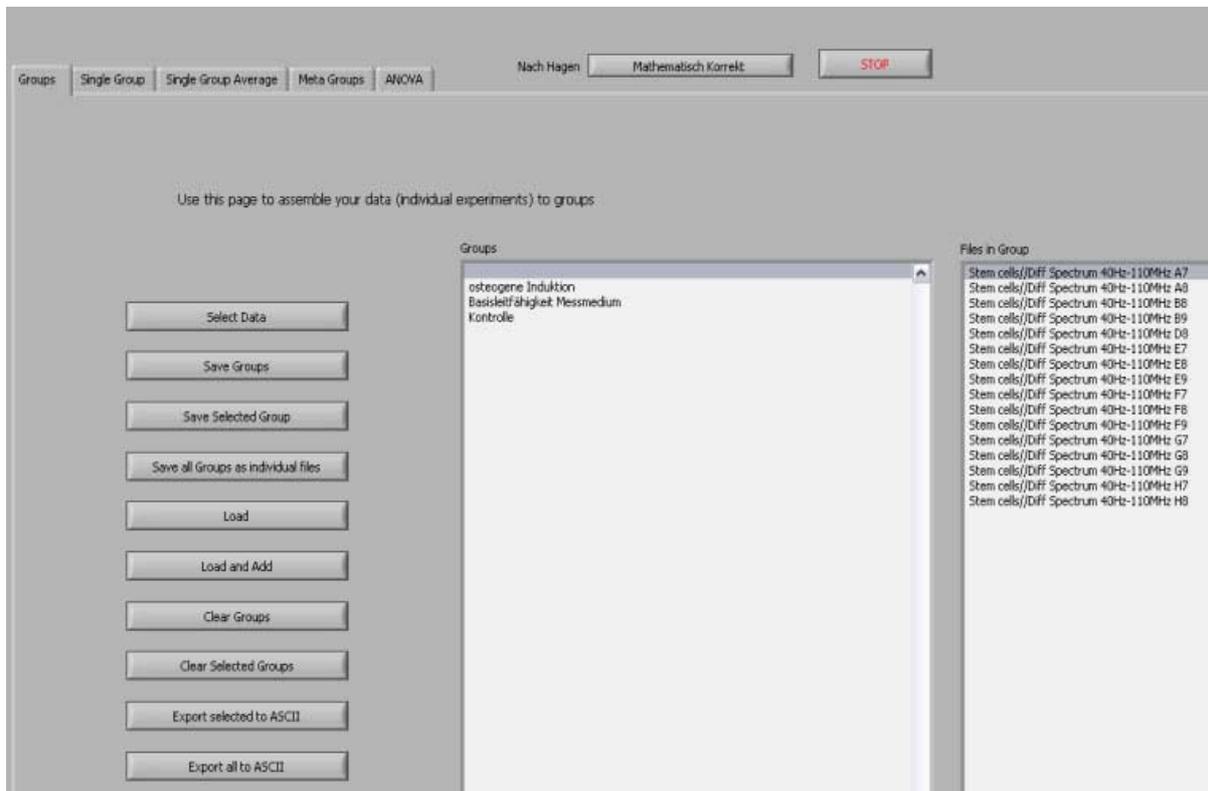


Abb. 80: Nutzeroberfläche: Ansicht „Groups“ zur Verwaltung der Gruppen.

Die Ansicht „Groups“ dient dazu, die einzelnen Daten in den Gruppen zu verwalten. Dazu steht eine Reihe von Funktionen zur Verfügung, die durch die einzelnen Schaltknöpfe auf der linken Seite ausgewählt werden. Die wichtigste Funktion ist „*Select Data*“. Es wird ein Auswahldialog aufgerufen (**Abb. 81**), über den die individuellen Impedanzspektren eines Experiments ausgewählt und zu einer Gruppe zusammengefasst werden. Zusätzlich können über die Schaltflächen „*Save Groups*“ und „*Load*“ die ausgewählten und gruppierten Daten im LabVIEW-Dateiformat gespeichert und wieder geladen werden. Die erstellten Gruppen

werden in der Liste „Groups“ angezeigt. Wird eine dieser Gruppen ausgewählt, erscheinen die individuellen Dateinamen der in der Gruppe zusammengefassten Impedanzspektren in einer weiteren Liste „Files in Group“.

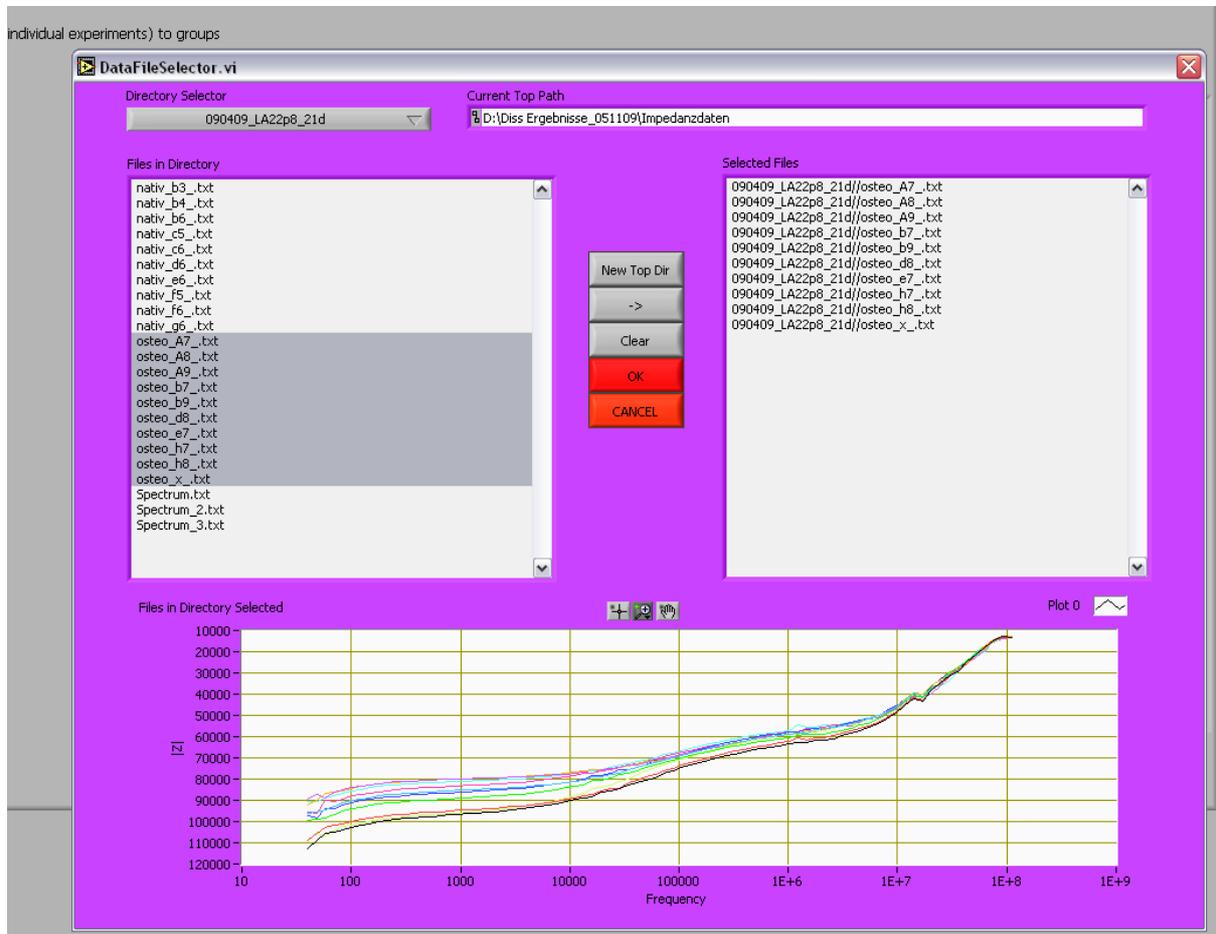


Abb. 81: Nutzeroberfläche: Auswahl Dialog zum Laden der einzelnen Messwerte einer Gruppe.

Die Rohdaten müssen im „txt“ Format gespeichert sein. In dem Auswahldialog (**Abb. 81**) wird über den „Directory Selector“ ein Unterverzeichnis innerhalb eines einstellbaren Hauptverzeichnisses ausgewählt und in der linken Liste „Files in Directory“ angezeigt. In dieser Liste können eine oder mehrere Dateien ausgewählt werden und mit der „->“-Schaltfläche zu der aktuellen Gruppe hinzugefügt werden. Zusätzlich wird eine Vorschau der ausgewählten Daten in einem Graphen angezeigt. Wird der aktuelle Auswahldialog mit der „OK“-Schaltfläche beendet, so werden die in der rechten Liste angezeigten Daten in das Hauptprogramm übernommen. Zusätzlich kann noch ein Name für die neu erstellte Gruppe vergeben werden.

Die weiteren Ansichten „Single Group“, „Single Group Average“ und „Metagroups“ (**Abb. 82 - 84**) sind alle gleich aufgebaut. Links befindet sich eine Liste in der alle vorhandenen Gruppen angezeigt werden und eine oder mehrere Gruppen ausgewählt werden können. Daneben wird das Argand-Diagramm der ausgewählten Daten angezeigt. Rechts befinden

7.2 Programm zur Auswertung der Impedanzspektren

sich die Bode-Darstellung der Daten mit der jeweiligen Auftragung des Betrags der Impedanz und der Phase über die Frequenz. Über zusätzliche Schaltflächen können die Daten im ASCII-Format exportiert oder an *gnuplot* übergeben werden, um Graphen von hoher Qualität zu erzeugen.

Je nach Ansicht werden in den Graphen unterschiedliche „Dinge“ angezeigt. In der Ansicht „*Single Group*“ (**Abb. 82**) werden die einzelnen Impedanzspektren innerhalb einer Gruppe zusammen in den Graphen dargestellt. Die Mittelwerte einer Gruppe mit Fehlerbalken, die der Standardabweichung entsprechen, werden in der Ansicht „*Single Group Average*“ (**Abb. 83**) angezeigt. Um die Daten verschiedener Messungen miteinander vergleichen zu können, können in der Ansicht „*Metagroups*“ (**Abb. 84**) mehrere Gruppen ausgewählt werden. Es werden dann die Mittelwerte mit Fehlerbalken der ausgewählten Daten zusammen angezeigt.

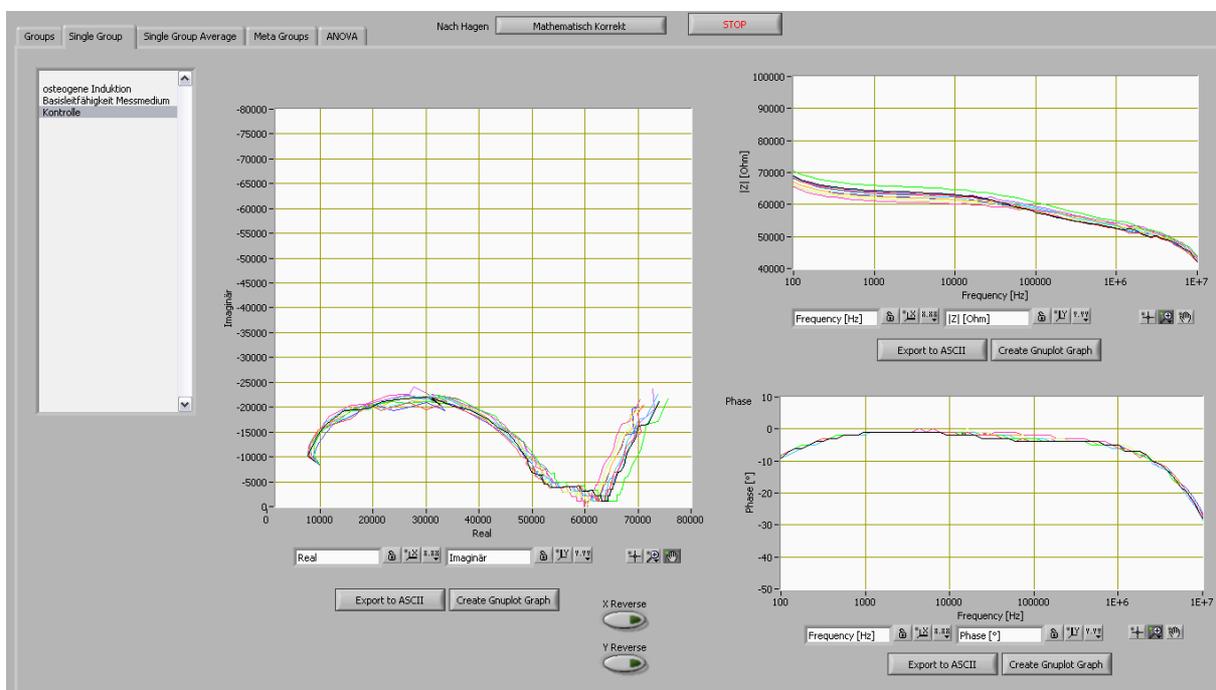


Abb. 82: Nutzeroberfläche: Ansicht „*Single Group*“ zur Darstellung der einzelnen Spektren einer Gruppe.

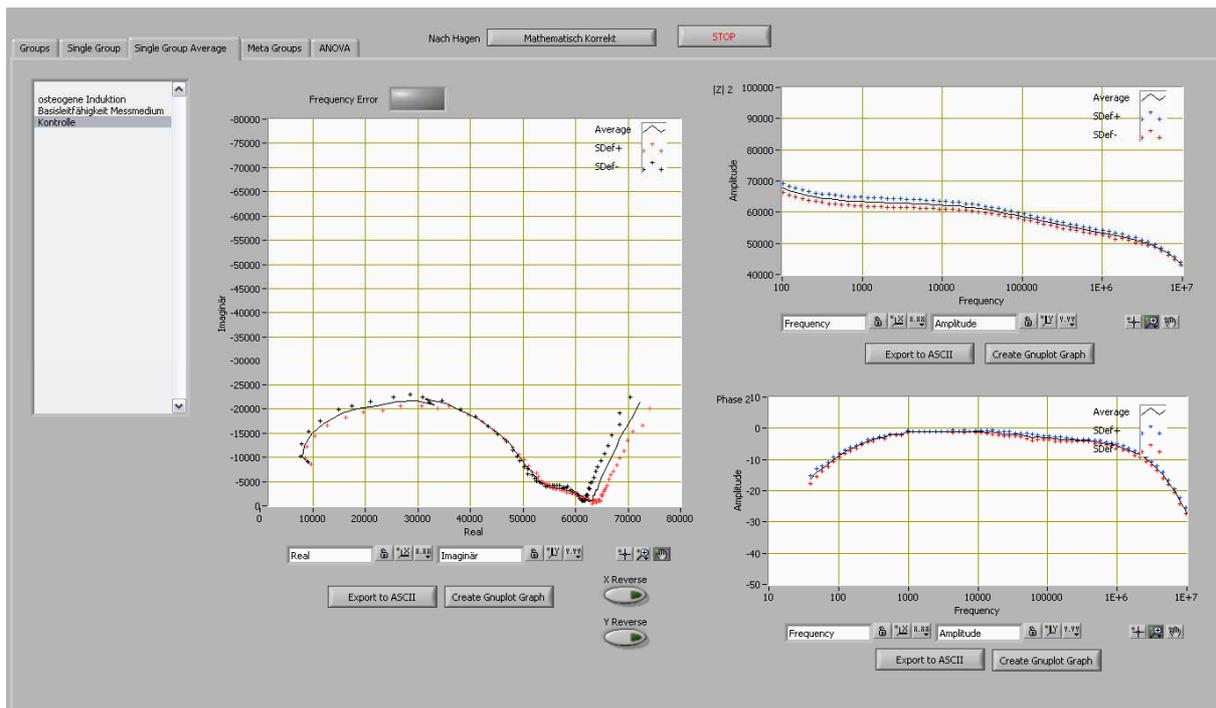


Abb. 83: Nutzeroberfläche: Ansicht „Single Group Average“ zur Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen einer Gruppe.

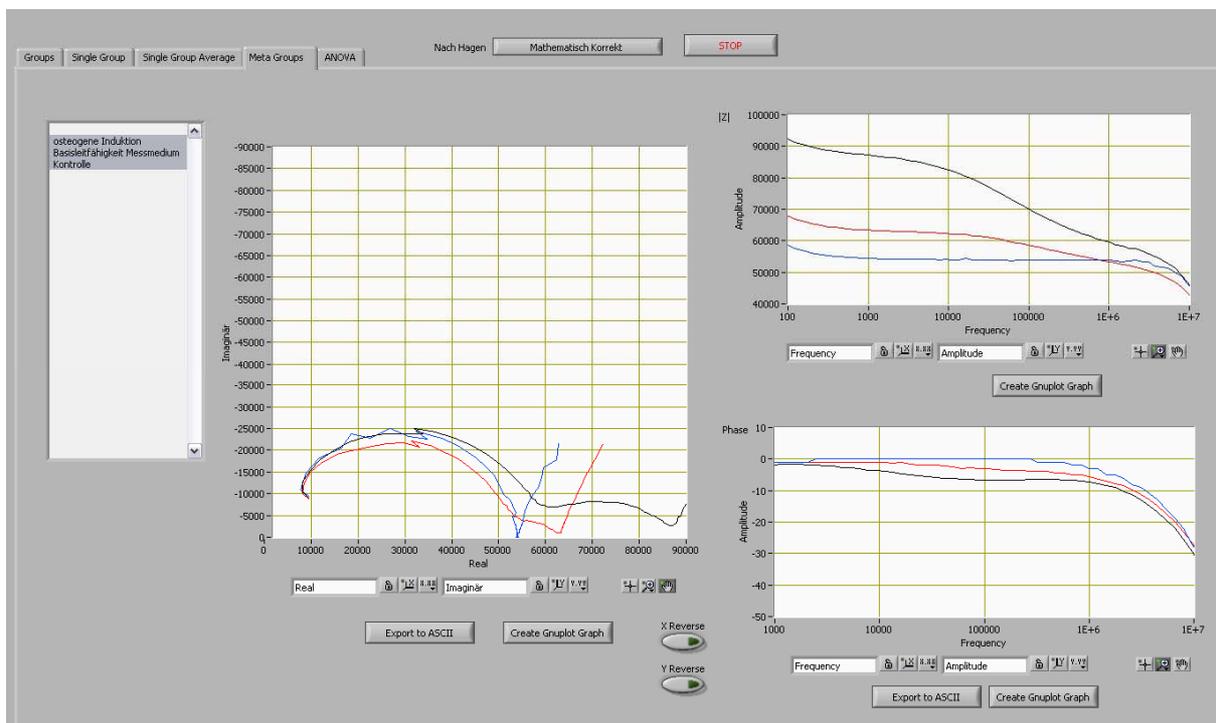


Abb. 84: Nutzeroberfläche: Ansicht „Metagroups“ zum Vergleich von Mittelwerten verschiedener Gruppen.

7.3 Durchflusszytometrie

In **Abschnitt 3.1.5** wurden die Expressionsprofile von jeweils drei Chargen BM-MSCs, AT-MSCs, CB-MSCs und hES H1 vergleichend untersucht. Im Folgenden sind die Histogramme der Messungen aufgeführt.

7. Anhang

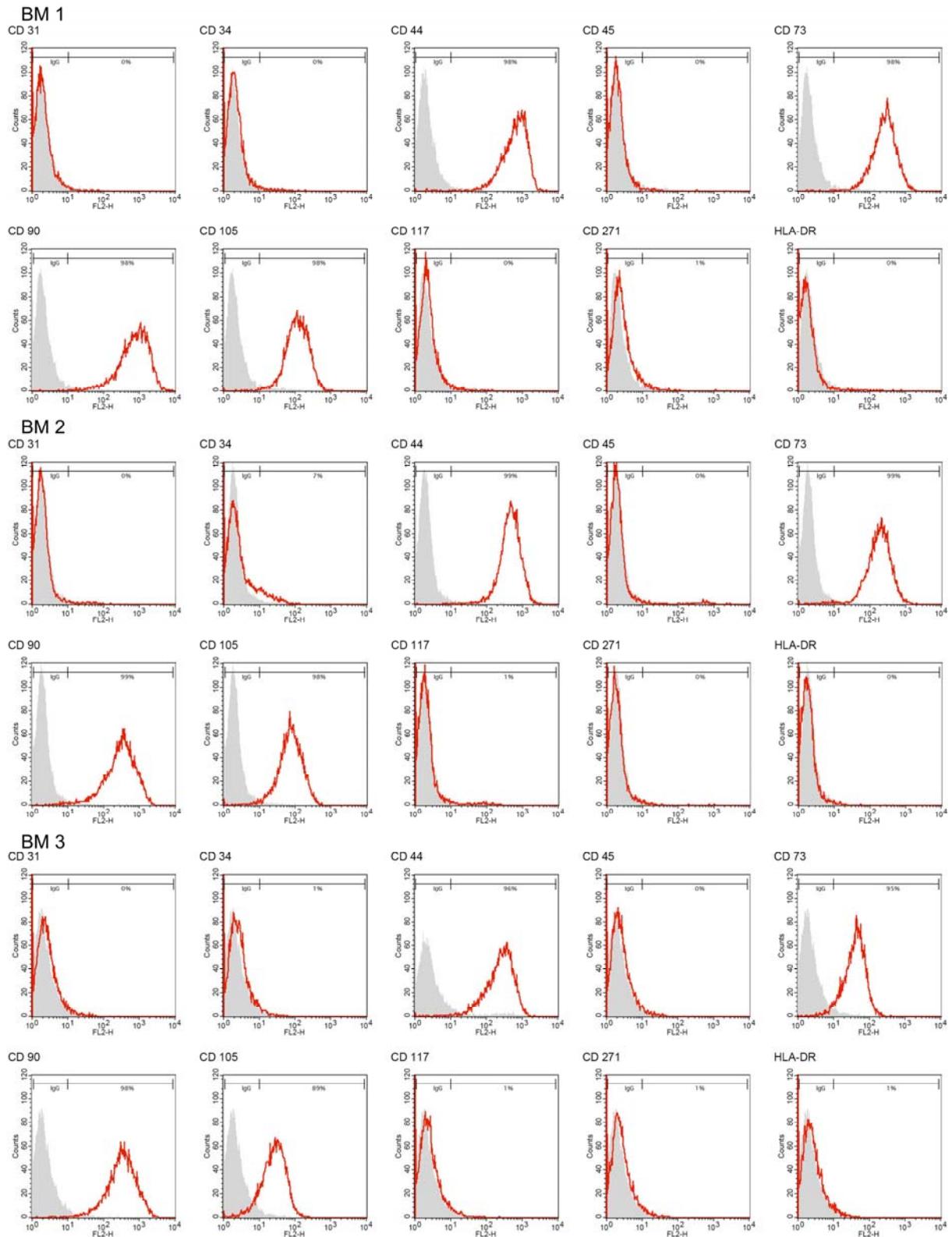


Abb. 85: Darstellung der Expression von MSC-assoziierten Oberflächenmarkern in BM-MSCs mittels Durchflusszytometrie. Gezeigt werden die Daten von drei Chargen BM-MSCs (BM 1, BM 2 und BM 3). In den Histogrammen sind die jeweiligen Isotyp-Kontrollen in grau und die spezifischen Oberflächenproteine in rot abgebildet.

7.3 Durchflusszytometrie

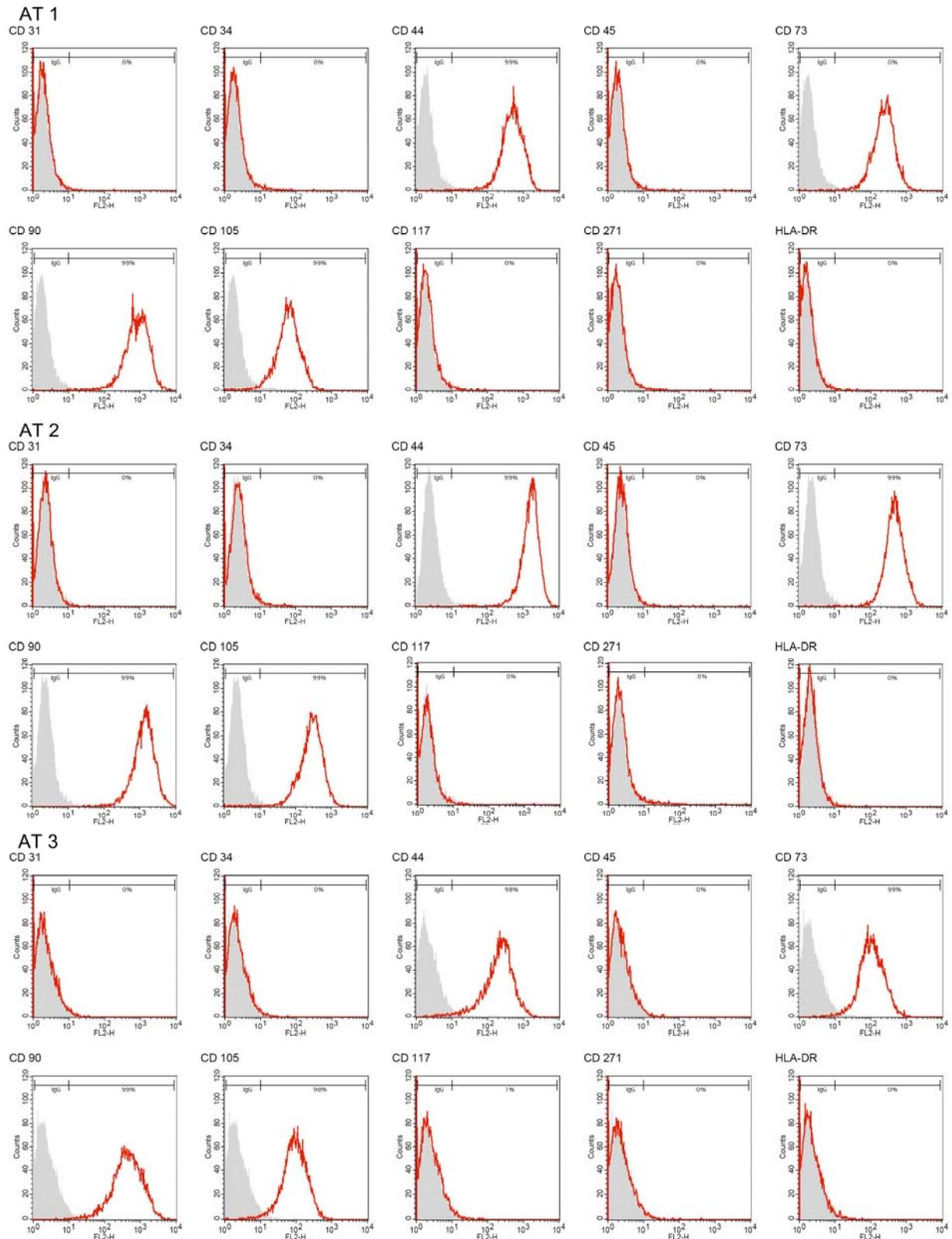


Abb. 86: Darstellung der Expression von MSC-assoziierten Oberflächenmarkern in AT-MSCs mittels Durchflusszytometrie. Gezeigt werden die Daten von drei Chargen AT-MSCs (AT 1, AT 2 und AT 3). In den Histogrammen sind die jeweiligen Isotyp-Kontrollen in grau und die spezifischen Oberflächenproteine in rot abgebildet.

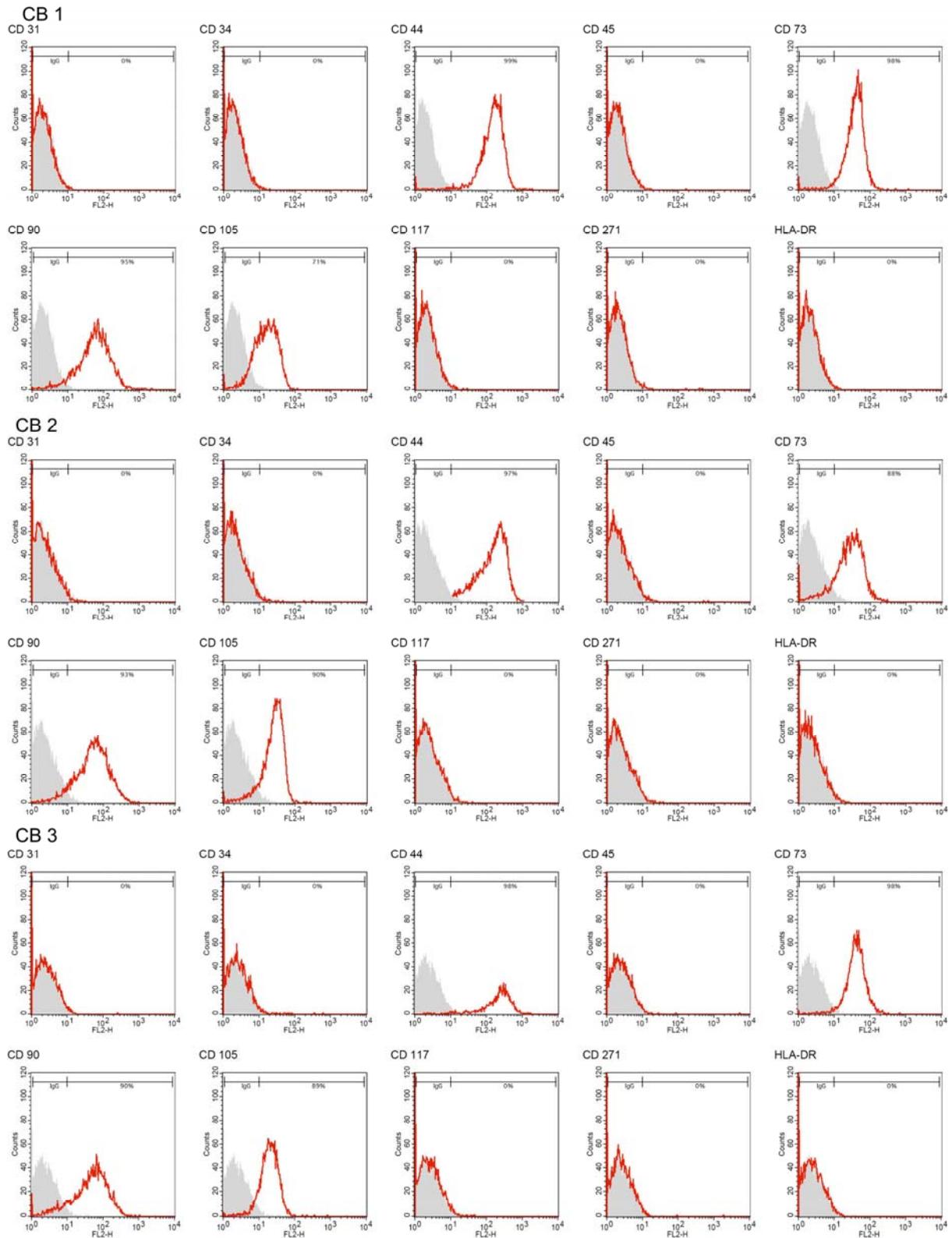


Abb. 87: Darstellung der Expression von MSC-assoziierten Oberflächenmarkern in CB-MSCs mittels Durchflusszytometrie. Gezeigt werden die Daten von drei Chargen CB-MSCs (CB 1, CB 2 und CB 3). In den Histogrammen sind die jeweiligen Isotyp-Kontrollen in grau und die spezifischen Oberflächenproteine in rot abgebildet.

7.3 Durchflusszytometrie

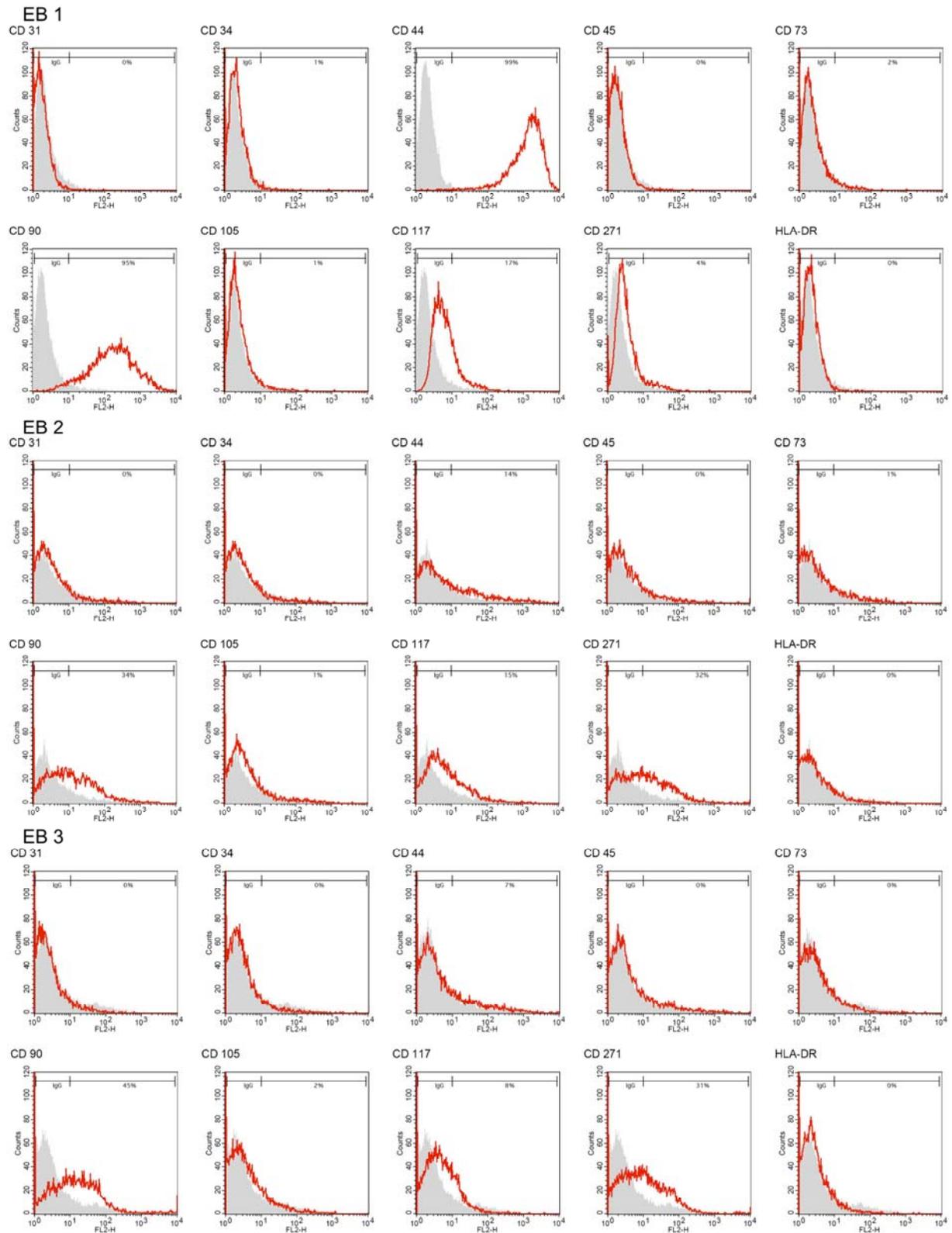


Abb. 88: Darstellung der Expression von MSC-assoziierten Oberflächenmarkern in hES H1 mittels Durchflusszytometrie. Gezeigt werden die Daten von drei Chargen hES H1 nach erfolgter Kultivierung im EB (EB 1, EB 2 und EB 3). In den Histogrammen sind die jeweiligen Isotyp-Kontrollen in grau und die spezifischen Oberflächenproteine in rot abgebildet.

7.4 Modellbildung

In **Abschnitt 3.3.8** wurden mittels elektrischer Modellbildung die Änderungen der Gewebestrukturparameter untersucht. Die Ergebnisse für die Messgruppen wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Im Folgenden sind die Messergebnisse der individuellen Sphäroide aufgeführt. Dargestellt wurde die Membrankapazität CPE-T bzw. der Dispersionsparameter CPE-P jeweils gegen den extrazellulären Widerstand.

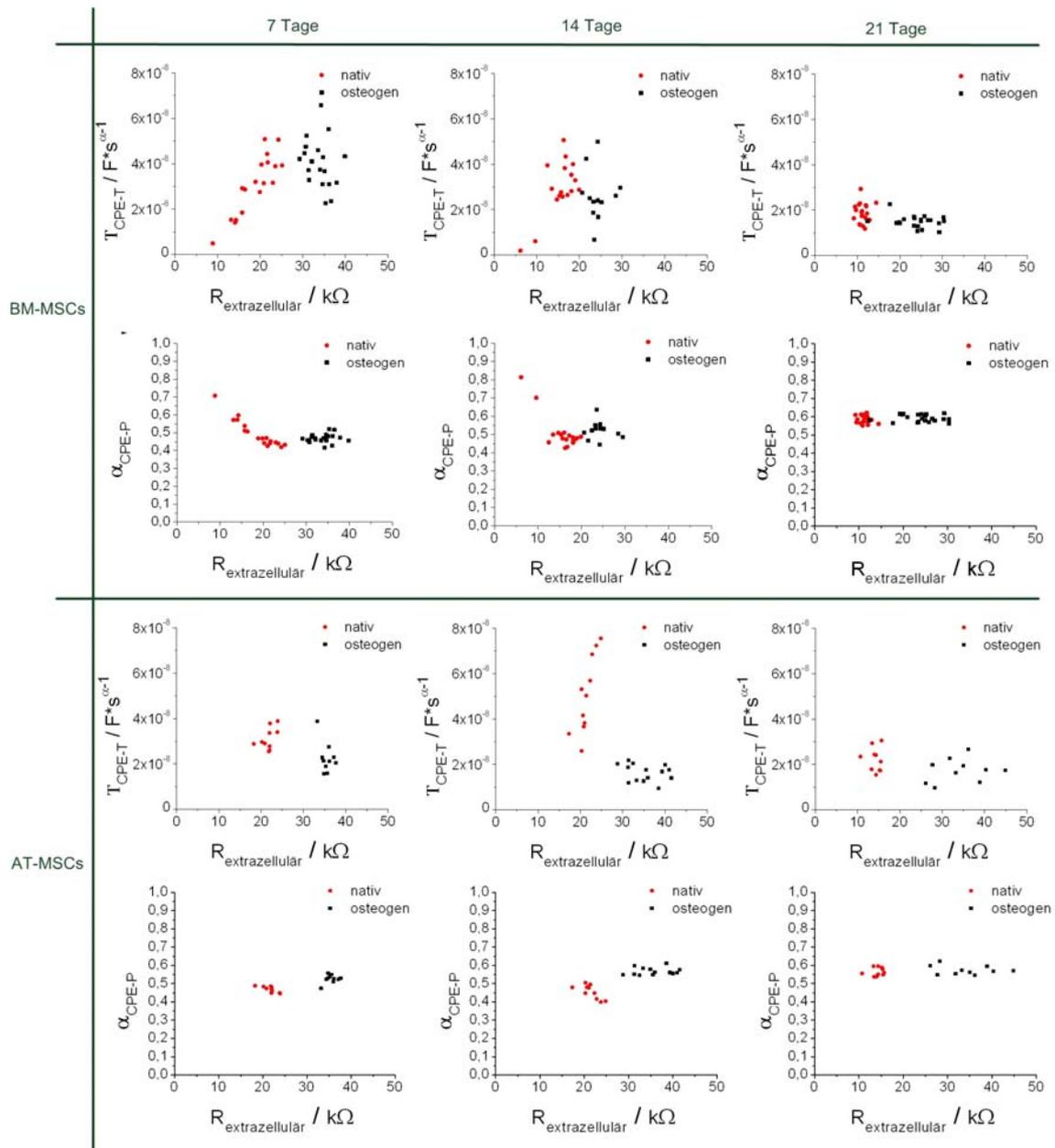


Abb. 89: Darstellung der Membrankapazität als Funktion des extrazellulären Widerstandes in BM-MSCs und AT-MSCs. Aufgetragen wurden der Dispersionsparameter CPE-P bzw. die elektrische Kapazität CPE-T gegen den extrazellulären Widerstand $R_{\text{extrazellulär}}$ der individuellen Sphäroide. Diese Auftragsweise spiegelt die Umlaufzeit der Ortskurve im Argand-Diagramm wieder, da gilt: $\tau = RC$.

7.4 Modellbildung

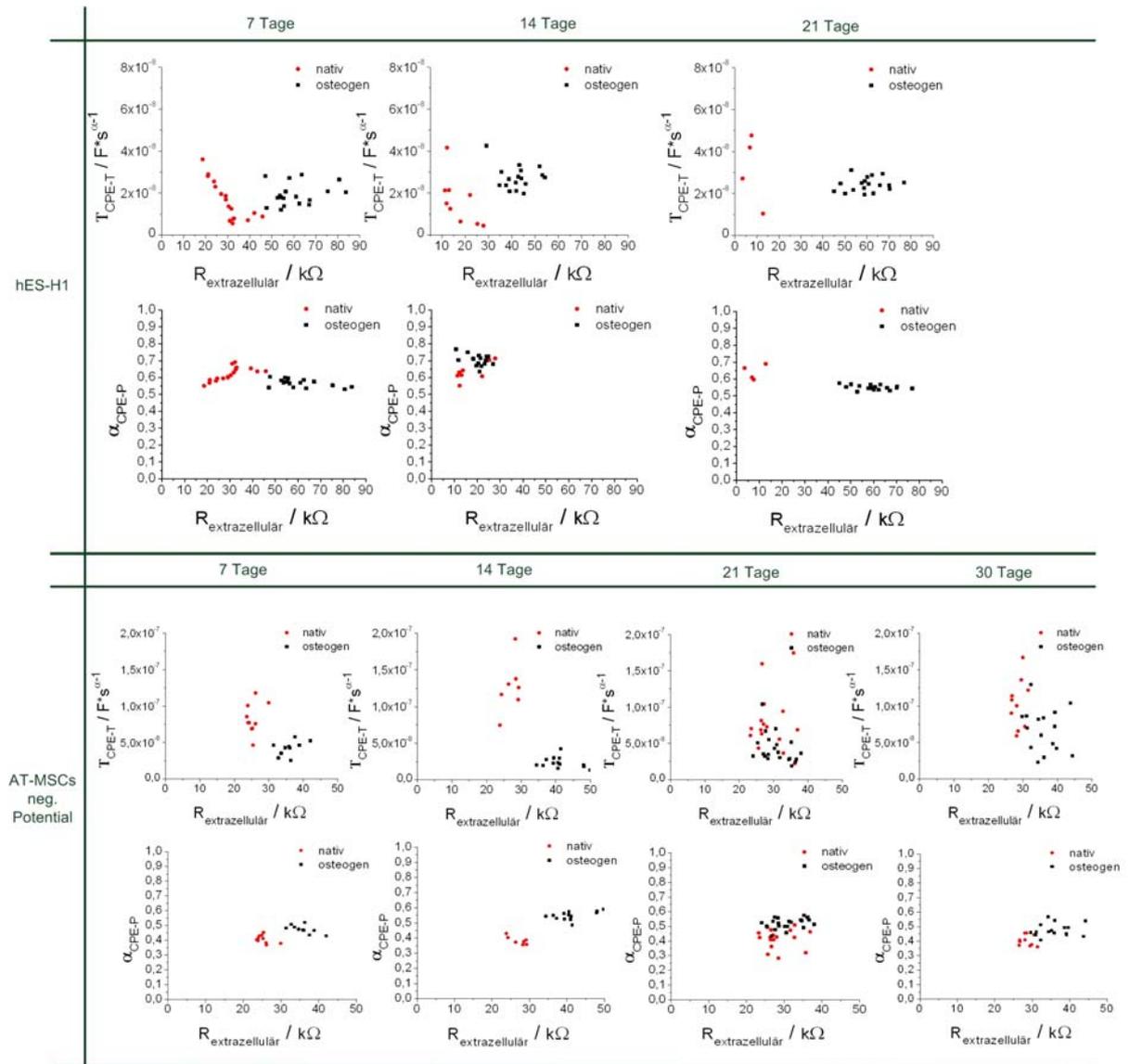
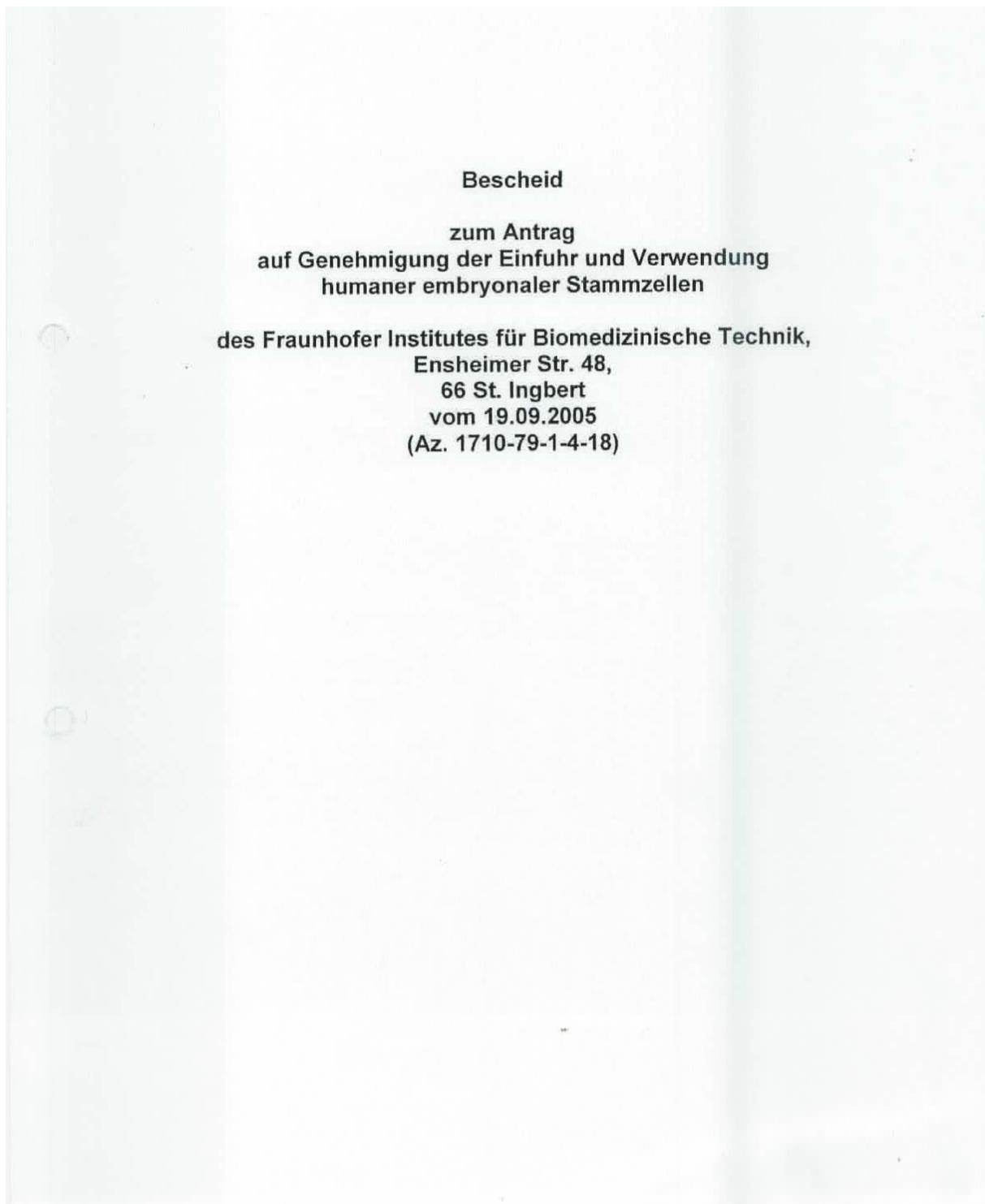


Abb. 90: Darstellung der Membrankapazität als Funktion des extrazellulären Widerstandes in hES H1 und AT-MSCs (negatives osteogenes Potential). Aufgetragen wurden der Dispersionsparameter CPE-P bzw. die elektrische Kapazität CPE-T gegen den extrazellulären Widerstand $R_{\text{extrazellulär}}$ der individuellen Sphäroide. Diese Auftragungsweise spiegelt die Umlaufzeit der Ortskurve im Argand-Diagramm wieder, da gilt: $\tau = RC$.

7.5 Genehmigung zur Verwendung humaner embryonaler Stammzellen



Auf den Antrag auf Genehmigung der Einfuhr und Verwendung humaner embryonaler Stammzellen des Fraunhofer Institutes für Biomedizinische Technik, Ensheimer Straße 48, 66386 St. Ingbert, eingegangen am 27.09.2005 (Az. 1710-79-1-4-18) und ergänzt durch die nachgereichten Antragsunterlagen vom 12.05.2006, 15.05.2006, 24.05.2006, 30.05.2006 und 08.06.2006, hat das Robert Koch-Institut (RKI), Nordufer 20 in 13353 Berlin, gemäß § 6 Stammzellgesetz (StZG) vom 28. Juni 2002 (BGBl I S. 2277) wie folgt entschieden:

I. Genehmigung

Dem Antragsteller wird gemäß § 6 StZG die Genehmigung zum Import und zur Verwendung der unter Punkt I.1.1. benannten humanen embryonalen Stammzellen (vgl.) für das beantragte und nachfolgend beschriebene Forschungsvorhaben (vgl. Punkt I.1.2.) unter den unter II. aufgeführten Nebenbestimmungen erteilt. Der Import humaner embryonaler Stammzellen der Stammzell-Linie H1 wurde dem Antragsteller bereits mit Bescheid vom 27.06.2006 (AZ 1710-79-1-4-22) genehmigt.

I.1. Gegenstand der Genehmigung

I.1.1. Die Genehmigung erstreckt sich auf die folgenden Stammzell-Linien:

Hersteller-Code	NIH-Register-Code	Registeranmelder	Exporteur
I6	TE06	J. Itskovitz-Eldor, Rambam Medical Center, Universität Haifa, ISRAEL	Technion Research and Development Foundation Ltd., Haifa, ISRAEL
H1	WA01	Wisconsin Alumni Research Foundation (Wicell Research Institute, Inc.)	Wicell Research Institute

I.1.2. Die Genehmigung erstreckt sich auf folgendes Forschungsvorhaben:

- a) Kultivierung von hES-Zellen und die Bestimmung der Integrität von hES-Zellen unter Nutzung etablierter Standardverfahren, d.h. dem Nachweis des Vorhandenseins von für hES-Zellen charakteristischen mRNAs und Proteinen.
- b) Generierung von *embryoid bodies* (EBs) aus hES-Zellen.
- c) Induzierung der osteogenen Differenzierung nach etablierten Protokollen im 2-dimensionalen und 3-dimensionalen System. Die osteogene Differenzierung wird mit und ohne Kultivierung der Zellen auf *scaffolds* durchgeführt.
- d) Anpassung der beim Antragsteller etablierten Impedanzmeßsysteme an hES-Zellen und an EBs.
- e) Messung von Impedanzspektren während der osteogenen Differenzierung von hES-Zellen. Dies schließt die Impedanzmessung an undifferenzierten hES-Zellen sowie an frühen EBs zur Bestimmung der Ausgangssituation ein. Die Messung erfolgt vorzugsweise zerstörungsfrei.
- f) Korrelierung der Impedanzmesswerte mit osteogener Differenzierung unter Nutzung etablierter Marker zum Nachweis der osteogenen Differenzierung mit Standardmethoden sowie durch die Bestimmung biophysikalischer Parameter von Zellen wie z.B. der Zellgeometrie, des Kern-Plasma-Verhältnisses und des Anhaftverhaltens.

- g) Vergleichende Bewertung der Impedanzspektren mit den bei der osteogenen Differenzierung mesenchymaler Stammzellen gemessenen Spektren

Bei dem Forschungsvorhaben wird mit einer voraussichtlichen Dauer von 3 Jahren gerechnet.

I.1.3. Persönlicher Geltungsbereich der Genehmigung

Inhaber der Genehmigung ist das Fraunhofer Institute für Biomedizinische Technik, St. Ingbert.

Die Genehmigung schließt die Befugnis zur Weitergabe der Stammzell-Linien an weitere Einrichtungen ein, soweit dies zum Zwecke der Identitätsbestimmung erfolgt.

Hinweis:

Es wird darauf hingewiesen, dass die Abgabe von humanen ES-Zellen an außerhalb des Projektes tätige Personen / Institutionen sowie sonstige, nicht vom Bescheid umfasste Verwendungen durch den Genehmigungsinhaber selbst (z.B. im Rahmen von wissenschaftlichen Kooperationen) einer erneuten Genehmigung durch das RKI bedürfen.

I.2. Vorgehensweise

Für die Durchführung des Forschungsvorhabens sind die im Antrag gemachten Angaben verbindlich, soweit nicht in den nachfolgenden Nebenbestimmungen anderes bestimmt wird.

II. Nebenbestimmungen

2.1.

Eine Kopie des Genehmigungsbescheides ist vor Ort bereitzuhalten.

2.2.

Die im Genehmigungsbescheid und im Antrag enthaltenen Regelungen sind dem an dem Vorhaben beteiligten wissenschaftlichen Personal des Antragstellers sowie den gegebenenfalls im Rahmen des genehmigten Projektes beteiligten Kooperationspartnern bekannt zu geben.

Hinweis:

Es wird darauf hingewiesen, dass gemäß § 12 StZG wesentliche nachträglich eintretende Änderungen, die die Zulässigkeit der Einfuhr oder der Verwendung der humanen embryonalen Stammzellen betreffen, dem RKI unverzüglich anzuzeigen sind.

Dies betrifft auch die spätere Beteiligung von Kooperationspartnern an Teilaufgaben des genehmigten Projekts, soweit humane embryonale Stammzellen weitergegeben werden sollen und die Kooperation vor Genehmigung nicht bereits mitgeteilt war, und zwar unabhängig davon, ob der Kooperationspartner unter der Verantwortung des Genehmigungsinhabers tätig sein oder unabhängig arbeiten soll. Name, berufliche Anschrift und Art der übernommenen Teilaufgaben des Kooperationspartners sind dem RKI bei Änderungen jeweils mitzuteilen.

Eine Änderung der beruflichen Anschrift ist mitzuteilen.

III. Begründung der Nebenbestimmungen

Die Genehmigung kann unter Auflagen und Bedingungen erteilt werden, soweit dies zur Erfüllung oder fortlaufenden Einhaltung der Genehmigungsvoraussetzungen nach § 6 Abs.4 StZG erforderlich ist, § 6 Abs. 6 Satz 1 StZG.

zu 2.1. (Vorhaltung Genehmigungsbescheid)

Die Auflage soll gewährleisten, dass bei Bedarf die Prüfung des Genehmigungsstatus kurzfristig möglich ist.

zu 2.2. (Unterweisung)

Die Unterweisung soll sicherstellen, dass der Inhalt des Genehmigungsbescheides und seine Grenzen den im Zusammenhang mit dem genehmigten Forschungsvorhaben Tätigen bewusst sind.

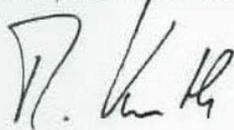
IV. Kosten

Die Kostenentscheidung ergeht mit gesondertem Bescheid.

V. Rechtsbehelfsbelehrung

Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Bekanntgabe Widerspruch beim Robert Koch-Institut, Nordufer 20 in 13353 Berlin, schriftlich oder zur Niederschrift erhoben werden.

Berlin, den 25.07.2006



Prof. Dr. Reinhard Kurth

7.6 Liste der Veröffentlichungen

Beiträge in begutachteten Zeitschriften

HILDEBRANDT, C., BÜTH, H., THIELECKE, H.: „Influence of Cell Culture Media Conditions on the Osteogenic Differentiation of Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells”. *Ann Anat.* 191, 23--32, 2009.

HILDEBRANDT, C., BÜTH, H., CHO, S., IMPIDJATI, THIELECKE, H.: „Detection of the Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells in 2D and 3D Cultures by Electrochemical Impedance Spectroscopy”. *J Biotechnol.* 148, 83--90, 2010.

HILDEBRANDT, C., BÜTH, H., THIELECKE, H.: „A 3D in vitro model for Osteogenesis in Mesenchymal Stem Cells”. *Tissue Cell.* 43, 91--100, 2011.

HILDEBRANDT, C., THIELECKE, H.: „Characterization of the electrical properties in a Stem Cell-based in vitro Model for Osteogenic Differentiation by Impedance Spectroscopy”. *Biosensors and Bioelectronics*, submitted, Jan., 2011.

Beiträge in Tagungsbänden

SUCK, K., KASPER, C., HILDEBRANDT, C., DIEDRICHS, S., FISCHER, M., SCHEPER, T.: Cultivation cells of different origin for 3D bone constructs considering physiological conditions. In: Smith, R. (Ed): *ESACT Proceedings, Cell Technology Processes for Cell Products*. Springer (ISBN: 978-1-4020-5475-4), 303--311, 2007.

WEISS, E.C., ANASTASIADIS, P., HILDEBRANDT, C., GORJUP, E., LEMOR, R.: „Characterization of Adipogenic, Chondrogenic and Osteogenic Differentiation with Time-Resolved Acoustic Microscopy”. *IEEE Ultrasonics Symposium Proceeding* (ISBN: 978-1-4244-1384-3), 809--812, Oct., 2007.

HILDEBRANDT, C., IMPIDJATI, THIELECKE, H.: „Non invasive Characterization of the Osteogenic Differentiation of hMSCs in 3D by Impedance Spectroscopy”. In: Dössel, O., Schlegel, W. (Eds): *IFMBE Proceedings Vol. 25/10, Biomaterials, Cellular and Tissue Engineering, Artificial Organs*. Springer (ISBN: 978-3-642-03899-0), 81--84, 2009.

Zeitschriftenartikel

HILDEBRANDT, C., THIELECKE, H.: „Technologien für die Zellforschung und Zelltherapie“. *Fachartikel für Bio World*, Vol. 3, 2--4, 2006.

Vorträge auf internationalen Konferenzen

SUCK, K., KASPER, C., HILDEBRANDT, C., DIEDRICHS, S., FISCHER, M., SCHEPER, T., VAN GRIENSVEN, M.: „Cultivating cells of different origin for 3D bone constructs considering physiological conditions“. Vortrag auf der 19th ESACT PROC: Cell Technology Processes for Cell Products, 2005.

WEISS, E.C., ANASTASIADIS, P., HILDEBRANDT, C., GORJUP, E., LEMOR, R.: „Characterization of Adipogenic, Chondrogenic and Osteogenic Differentiation with Time-Resolved Acoustic Microscopy“. Vortrag anlässlich des Internationalen Ultrasonic Symposiums in New York, October 2007.

MALTHAN, D., HUCHLER, R., BRANDENBURG, A., THIELECKE, H., HILDEBRANDT, C., ZÜHLKE, D.: „Life cell monitoring-development of an automated cell cultivation and monitoring system“. Vortrag anlässlich der International Conference on Laboratory Automation (LabAutomation) in Palm Springs (Kalifornien, USA), Januar 2008.

WEISS, E.C., HILDEBRANDT, C., LEMOR, R.: „Acoustic microscopy of individual cells and cell clusters“. Vortrag anlässlich der Convention des AIUM/ JUM, USA, April 2009.

HILDEBRANDT, C., IMPIDJATI, THIELECKE, H.: „Non-invasive Characterization of the Osteogenic Differentiation of hMSCs in 3D by Impedance Spectroscopy“. Vortrag anlässlich des 11th International Congress of the IUPESM Medical Physics and Biomedical Engineering World Congress 2009 in München (Bayern), 07.-12.09.2009.

HILDEBRANDT, C., BOST, W., THIELECKE, H., LEMOR, R. M.: „In vitro Characterization of Mechanical Properties of Human Mesenchymal Stem Cells by Time-resolved Acoustic Microscopy“. Vortrag anlässlich der 8th International Conference on the Ultrasonic Measurement and Imaging of Tissue Elasticity in Vlissingen, Zeeland (Niederlande), 14.-17.09.2009.

HILDEBRANDT, C., WEISS, E.C., THIELECKE, H., LEMOR, R.: „Non-invasive Characterization of Multilineage Differentiation of hMSCs by Acoustic Microscopy“. Vortrag anlässlich der 4th World Conference on Regenerative Medicine in Leipzig (Sachsen), 29. - 31.10.2009.

HILDEBRANDT, C., WEISS, E.C., LEMOR, R.: „Non invasive Observation of the Ultrastructure and the Mechanical Properties in hMSCs by Acoustic Microscopy“. Vortrag anlässlich der 5th World Conference on Reventive and Regenerative Medicine in Hannover (Niedersachsen), 05. - 07.10.2010.

Poster

SUCK, K., HILDEBRANDT, C., KASPER, C., DIEDRICHS, S., VAN GRIENSVEN, M.: „Development of bone constructs taking into account physiological aspects”. Poster auf dem Congress Regenerative Medicine in Leipzig (Sachsen), Oct., 2005.

HILDEBRANDT, C., THIELECKE, H., LEMOR, R.: „In vitro Characterization of Mechanical Properties during Multilineage Differentiation of hMSCS by Acoustic Microscopy”. Poster anlässlich des 3rd International Workshop Multipotent Stromal Cells (MSCs) for Regenerative Medicine and Immune Regulation, Frankfurt University Hospital in Frankfurt (Hessen), 12.-13.06.2009.

HILDEBRANDT, C., IMPIDJATI, BÜTH, H., THIELECKE, H.: „Application of Non Invasive Impedance Spectroscopy for the Characterization of the Osteogenic Differentiation of hMSC in scaffold free 3D in Vitro Model”. Poster anlässlich des 3rd International Workshop Multipotent Stromal Cells (MSCs) for Regenerative Medicine and Immune Regulation, Frankfurt University Hospital in Frankfurt (Hessen), 12.-13.06.2009.

7.7 Literatur

Standardwerke

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2004), Molekularbiologie der Zelle, *Wiley VCH Verlag*, 4. Ed.

Bilezikian J.P, Raiz, L.G., Rodan, G.A. (1996), Principles of bone biologie, Vol1, *Akademic Press*.

Briggs, A. (1992), Acoustic Microscopy, *Oxford University Press, United Kingdom*.

Boal, D. (2002), Mechanics of the Cell, *Cambridge University press*.

Deetjen, P., Speckmann, E.J., Hescheler, J. (2005), Physiologie, *Elsevier, München*

Foster, K.R. (1995), Dielectric Properties of Tissues, The Biomedical Engineering Handbook (ed.: Bronzino, J.D) *CRC Press*, pp. 1385-1394.

Grimnes, S., Martinsen, O.G. (2008), Bioimpedance and bioelectricity Basics, sec. Ed, *Academic press*.

Leonhardt, H. (1981), Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen, *Georg Thieme Verlag Stuttgart*.

Stryer, I., Berg, J.M., Tymoczko, L. (2003), Biochemie, *Spektrum Akademischer Verlag*.

Tipler, P.A., Mosca, G. (2009), Physik, Spektrum Akademischer Verlag, 6. Auflg.

Zitierte Dissertationen

Impidjati, 2006. Untersuchungen zur minimal-invasiven Charakterisierung von 3D-Zellverbänden mit Hilfe der Impedanzspektroskopie. Dissertationsschrift Naturwissenschaftliche-Technische Fakultät II, Physik und Mechatronik, Universität des Saarlandes.

Thieleke, H., 2002. Untersuchungen im Rahmen einer Konzeption und Entwicklung eines neuen biohybriden Mikrosystems für den Einsatz im pharmazeutischen Screening. Dissertationsschrift Naturwissenschaftliche-Technische Fakultät II, Physik und Mechatronik, Universität des Saarlandes. Fraunhofer IRB Verlag.

Weiss, E.C., 2007. Zeitaufgelöste Mikroskopie an individuellen Zelle. Dissertationsschrift Naturwissenschaftliche-Technische Fakultät II, Physik und Mechatronik, Universität des Saarlandes.

Handbücher

Adipogenesis Assay, ECM950, Chemicon, 2004.

LabVIEW User Manual, Edition April 2003, Nr. 320999E-01

WiCell: From Human Embryonic Stem Cells to Embryoid Bodies: A First Step in Lineage Restriction and Differentiation. Course Manual. 2006

WiCell: Human pluripotent Stem cell Methods. Course Manual, 2006.

NSCB Basic hES Cell Culture Protocols. SOPs der National Stem cell Bank. Erhältlich unter www.nationalstemcellbank.org bzw. WiCell.org/techsupport

Zitierte Internetquellen

<http://clinicaltrials.gov>

http://grants.nih.gov/stem_cells/registry/current.htm

www.emcel.com

www.gnuplot.com

www.hescereg.eu

www.insphero.com

www.miltenyi_biotec.com

www.osiristx.com

www.pluristem.com

www.xcell-center.de

Publikationen

Amit, M. & Itskovitz-Eldor, J. (2006), 'Maintenance of human embryonic stem cells in animal serum- and feeder layer-free culture conditions.', *Methods Mol Biol* **331**, 105--113.

Amit, M. & Itskovitz-Eldor, J. (2002), 'Derivation and spontaneous differentiation of human embryonic stem cells.', *J Anat* **200**(Pt 3), 225--232.

Amit, M.; Shariki, C.; Margulets, V. & Itskovitz-Eldor, J. (2004), 'Feeder layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells.', *Biol Reprod* **70**(3), 837--845.

Anderson, H. C. (2003), 'Matrix vesicles and calcification.', *Curr Rheumatol Rep* **5**(3), 222--226.

Anderson, H. C. (1995), 'Molecular biology of matrix vesicles.', *Clin Orthop Relat Res*(314), 266--280.

Anker, in't, P. S.; Noort, W. A.; Scherjon, S. A.; van der Keur, C. K.; Kruisselbrink, A. B.; van Bezooijen, R. L.; Beekhuizen, W.; Willemze, R.; Kanhai, H. H. H. & Fibbe, W. E. (2003), 'Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential.', *Haematologica* **88**(8), 845--852.

Asphahani, F. & Zhang, M. (2007), 'Cellular impedance biosensors for drug screening and toxin detection.', *Analyst* **132**(9), 835--841.

Augello, A., Kurth, T. B. & Bari, C. D. (2010), 'Mesenchymal stem cells from development to postnatal joint homeostasis, aging, and disease.', *Birth Defects Res C Embryo Today* **90**(4), 257--271.

Baaijens, F. P. T.; Trickey, W. R.; Laursen, T. A. & Guilak, F. (2005), 'Large deformation finite element analysis of micropipette aspiration to determine the mechanical properties of the chondrocyte.', *Ann Biomed Eng* **33**(4), 494--501.

Baldewsing, R. A.; Danilouchkine, M. G.; Mastik, F.; Schaar, J. A.; Serruys, P. W. & van der Steen, A. F. W. (2008), 'An inverse method for imaging the local elasticity of atherosclerotic coronary plaques.', *IEEE Trans Inf Technol Biomed* **12**(3), 277--289.

Banfi, A.; Bianchi, G.; Notaro, R.; Luzzatto, L.; Cancedda, R. & Quarto, R. (2002), 'Replicative aging and gene expression in long-term cultures of human bone marrow stromal cells.', *Tissue Eng* **8**(6), 901--910.

7.7 Literatur

- Barker, J. N.; Davies, S. M.; DeFor, T.; Ramsay, N. K.; Weisdorf, D. J. & Wagner, J. E. (2001), 'Survival after transplantation of unrelated donor umbilical cord blood is comparable to that of human leukocyte antigen-matched unrelated donor bone marrow: results of a matched-pair analysis.', *Blood* **97**(10), 2957--2961.
- Barry, F. P. & Murphy, J. M. (2004), 'Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization.', *Int J Biochem Cell Biol* **36**(4), 568--584.
- Bartholomä, P.; Impidjati; Reininger-Mack, A.; Zhang, Z.; Thielecke, H. & Robitzki, A. (2005), 'A more aggressive breast cancer spheroid model coupled to an electronic capillary sensor system for a high-content screening of cytotoxic agents in cancer therapy: 3-dimensional in vitro tumor spheroids as a screening model.', *J Biomol Screen* **10**(7), 705--714.
- Baxter, M. A.; Wynn, R. F.; Jowitt, S. N.; Wraith, J. E.; Fairbairn, L. J. & Bellantuono, I. (2004), 'Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion.', *Stem Cells* **22**(5), 675--682.
- Bennett, J. H.; Joyner, C. J.; Triffitt, J. T. & Owen, M. E. (1991), 'Adipocytic cells cultured from marrow have osteogenic potential.', *J Cell Sci* **99 (Pt 1)**, 131--139.
- Bereiter-Hahn, J. (1995), 'Probing biological cells and tissues with acoustic microscopy.', *Advances in Acoustic Microscopy*, Plenum Publ. Comp. New York pp. 79-115.
- Bereiter-Hahn, J.; Karl, I.; Lüers, H. & Vöth, M. (1995), 'Mechanical basis of cell shape: investigations with the scanning acoustic microscope.', *Biochem Cell Biol* **73**(7-8), 337--348.
- Beresford, J. N.; Bennett, J. H.; Devlin, C.; Leboy, P. S. & Owen, M. E. (1992), 'Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures.', *J Cell Sci* **102 (Pt 2)**, 341--351.
- Beresford, J. N.; Graves, S. E. & Smoothy, C. A. (1993), 'Formation of mineralized nodules by bone derived cells in vitro: a model of bone formation?', *Am J Med Genet* **45**(2), 163--178.
- Berrier, A. L. & Yamada, K. M. (2007), 'Cell-matrix adhesion.', *J Cell Physiol* **213**(3), 565--573.
- Bieback, K.; Kern, S.; Klüter, H. & Eichler, H. (2004), 'Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood.', *Stem Cells* **22**(4), 625--634.
- Bielby, R. C.; Boccaccini, A. R.; Polak, J. M. & Buttery, L. D. K. (2004), 'In vitro differentiation and in vivo mineralization of osteogenic cells derived from human embryonic stem cells.', *Tissue Eng* **10**(9-10), 1518--1525.
- Bobis, S.; Jarocha, D. & Majka, M. (2006), 'Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications.', *Folia Histochem Cytobiol* **44**(4), 215--230.
- Boskey, A. L.; Gadaleta, S.; Gundberg, C.; Doty, S. B.; Ducy, P. & Karsenty, G. (1998), 'Fourier transform infrared microspectroscopic analysis of bones of osteocalcin-deficient mice provides insight into the function of osteocalcin.', *Bone* **23**(3), 187--196.
- Boutin, C.; Roche, Y.; Millot, C.; Deturche, R.; Royer, P.; Manfait, M.; Plain, J. M.; Jeannesson, P.; Millot, J.-M. & Jaffiol, R. (2009), 'High heterogeneity of plasma membrane microfluidity in multidrug-resistant cancer cells.', *J Biomed Opt* **14**(3), 034030.
- Briggs, G. A.; Wang, J. & Gundle, R. (1993), 'Quantitative acoustic microscopy of individual living human cells.', *J Microsc* **172**(Pt 1), 3--12.
- Bruder, S. P.; Jaiswal, N.; Ricalton, N. S.; Mosca, J. D.; Kraus, K. H. & Kadiyala, S. (1998), 'Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration.', *Clin Orthop Relat Res*(355 Suppl), S247--S256.

- Bruder, S. P.; Fink, D. J. & Caplan, A. I. (1994), 'Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy.', *J Cell Biochem* **56**(3), 283--294.
- Bruder, S. P.; Jaiswal, N. & Haynesworth, S. E. (1997), 'Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation.', *J Cell Biochem* **64**(2), 278--294.
- Bühring, H.-J.; Battula, V. L.; Treml, S.; Schewe, B.; Kanz, L. & Vogel, W. (2007), 'Novel markers for the prospective isolation of human MSC.', *Ann N Y Acad Sci* **1106**, 262--271.
- Can, A. & Karahuseyinoglu, S. (2007), 'Concise review: human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells.', *Stem Cells* **25**(11), 2886--2895.
- Cancedda, R.; Bianchi, G.; Derubeis, A. & Quarto, R. (2003), 'Cell therapy for bone disease: a review of current status.', *Stem Cells* **21**(5), 610--619.
- Cancedda, R.; Dozin, B.; Giannoni, P. & Quarto, R. (2003), 'Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone.', *Matrix Biol* **22**(1), 81--91.
- Caplan, A. I. (2007), 'Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine.', *J Cell Physiol* **213**(2), 341--347.
- 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.
- Caplan, A. I. & Bruder, S. P. (2001), 'Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century.', *Trends Mol Med* **7**(6), 259--264.
- Castro-Malaspina, H.; Gay, R. E.; Resnick, G.; Kapoor, N.; Meyers, P.; Chiarieri, D.; McKenzie, S.; Broxmeyer, H. E. & Moore, M. A. (1980), 'Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny.', *Blood* **56**(2), 289--301.
- Chambers, I. & Tomlinson, S. R. (2009), 'The transcriptional foundation of pluripotency.', *Development* **136**(14), 2311--2322.
- Chang, Y.-J.; Tseng, C.-P.; Hsu, L.-F.; Hsieh, T.-B. & Hwang, S.-M. (2006), 'Characterization of two populations of mesenchymal progenitor cells in umbilical cord blood.', *Cell Biol Int* **30**(6), 495--499.
- Chang, S., Chen, W. & Yang, J. (2009), 'Another formula for calculating the gene change rate in real-time PCR.', *Mol Biol Rep*, **36**(8), 2165--2168.
- Chen, S. L.; Fang, W. W.; Ye, F.; Liu, Y.-H.; Qian, J.; Shan, S. J.; Zhang, J. J.; Chunhua, R. Z.; Liao, L. M.; Lin, S. & Sun, J. P. (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.
- Choo, A.; Ngo, A. S.; Ding, V.; Oh, S. & Kiang, L. S. (2008), 'Autogenic feeders for the culture of undifferentiated human embryonic stem cells in feeder and feeder-free conditions.', *Methods Cell Biol* **86**, 15--28.
- Cole K.S. and Cole R.H. (1941), 'Dispersion and absorption in dielectrics, I. Alternating current Characteristics.', *J. Chem. Phys.*, Vol. 9, pp. 341--351.
- 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.
- Coppi, P. D.; Bartsch, G.; Siddiqui, M. M.; Xu, T.; Santos, C. C.; Perin, L.; Mostoslavsky, G.; Serre, A. C.; Snyder, E. Y.; Yoo, J. J.; Furth, M. E.; Soker, S. & Atala, A. (2007), 'Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy.', *Nat Biotechnol* **25**(1), 100--106.

7.7 Literatur

- Cortés, J. L.; Cobo, F.; Catalina, P.; Nieto, A.; Cabrera, C.; Montes, R.; Concha, A. & Menendez, P. (2007), 'Evaluation of a laser technique to isolate the inner cell mass of murine blastocysts.', *Biotechnol Appl Biochem* **46**(Pt 4), 205--209.
- Covas, D. T.; Piccinato, C. E.; Orellana, M. D.; Siufi, J. L. C.; Silva, W. A.; Proto-Siqueira, R.; Rizzatti, E. G.; Neder, L.; Silva, A. R. L.; Rocha, V. & Zago, M. A. (2005), 'Mesenchymal stem cells can be obtained from the human saphena vein.', *Exp Cell Res* **309**(2), 340--344.
- Culav, E. M.; Clark, C. H. & Merrilees, M. J. (1999), 'Connective tissues: matrix composition and its relevance to physical therapy.', *Phys Ther* **79**(3), 308--319.
- D'Ippolito, G.; Schiller, P. C.; Ricordi, C.; Roos, B. A. & Howard, G. A. (1999), 'Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow.', *J Bone Miner Res* **14**(7), 1115--1122.
- Daft, C. M. & Briggs, G. A. (1989), 'The elastic microstructure of various tissues.', *J Acoust Soc Am* **85**(1), 416--422.
- Darling, E. M.; Topel, M.; Zauscher, S.; Vail, T. P. & Guilak, F. (2008), 'Viscoelastic properties of human mesenchymally-derived stem cells and primary osteoblasts, chondrocytes, and adipocytes.', *J Biomech* **41**(2), 454--464.
- Dekker, R. J.; van Blitterswijk, C. A.; Hofland, I.; Engelberts, P. J.; Li, J. & de Bruijn, J. D. (2003), 'Studying the effect of different macrostructures on in vitro cell behaviour and in vivo bone formation using a tissue engineering approach.', *Novartis Found Symp* **249**, 148--67; discussion 167-9, 170-4, 239-41.
- Delany, A. M.; Amling, M.; Priemel, M.; Howe, C.; Baron, R. & Canalis, E. (2000), 'Osteopenia and decreased bone formation in osteonectin-deficient mice.', *J Clin Invest* **105**(7), 915--923.
- Delécrin, J.; Takahashi, S.; Gouin, F. & Passuti, N. (2000), 'A synthetic porous ceramic as a bone graft substitute in the surgical management of scoliosis: a prospective, randomized study.', *Spine* **25**(5), 563--569.
- Desoize; Gimonet & Jardillier (1998), 'Multicellular resistance: another mechanism for multidrug resistance? ', *Bull Cancer* **85**(9), 785.
- Digirolamo, C. M.; Stokes, D.; Colter, D.; Phinney, D. G.; Class, R. & Prockop, D. J. (1999), 'Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate.', *Br J Haematol* **107**(2), 275--281.
- Ducy, P.; Desbois, C.; Boyce, B.; Pinero, G.; Story, B.; Dunstan, C.; Smith, E.; Bonadio, J.; Goldstein, S.; Gundberg, C.; Bradley, A. & Karsenty, G. (1996), 'Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice.', *Nature* **382**(6590), 448--452.
- Dziong, D.; Bagnaninchi, P. O.; Kearney, R. E. & Tabrizian, M. (2007), 'Nondestructive online in vitro monitoring of pre-osteoblast cell proliferation within microporous polymer scaffolds.', *IEEE Trans Nanobioscience* **6**(3), 249--258.
- Erlebacher, A.; Filvaroff, E. H.; Gitelman, S. E. & Derynck, R. (1995), 'Toward a molecular understanding of skeletal development.', *Cell* **80**(3), 371--378.
- Evans, M. J. & Kaufman, M. H. (1981), 'Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos.', *Nature* **292**(5819), 154--156.
- 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.

- Fischbach, G. D. & Fischbach, R. L. (2004), 'Stem cells: science, policy, and ethics.', *J Clin Invest* **114**(10), 1364--1370.
- Foster, K. R. & Schwan, H. P. (1989), 'Dielectric properties of tissues and biological materials: a critical review.', *Crit Rev Biomed Eng* **17**(1), 25--104.
- Foster, L. J.; Zeemann, P. A.; Li, C.; Mann, M.; Jensen, O. N. & Kassem, M. (2005), 'Differential expression profiling of membrane proteins by quantitative proteomics in a human mesenchymal stem cell line undergoing osteoblast differentiation.', *Stem Cells* **23**(9), 1367--1377.
- Fricke, H. & Morse, S. (1925), 'The Electric Resistance and Capacity of Blood for Frequencies between 800 and 4(1/2) Million Cycles.', *J Gen Physiol* **9**(2), 153--167.
- Friedenstein, A. J.; Petrakova, K. V.; Kurolesova, A. I. & Frolova, G. P. (1968), 'Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues.', *Transplantation* **6**(2), 230--247.
- Fukuchi, Y.; Nakajima, H.; Sugiyama, D.; Hirose, I.; Kitamura, T. & Tsuji, K. (2004), 'Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential.', *Stem Cells* **22**(5), 649--658.
- Fukuda, K. & Fujita, J. (2005), 'Mesenchymal, but not hematopoietic, stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction in mice.', *Kidney Int* **68**(5), 1940--1943.
- Gabriel, C.; Gabriel, S. & Corthout, E. (1996), 'The dielectric properties of biological tissues: I. Literature survey.', *Phys Med Biol* **41**(11), 2231--2249.
- Ganss, B.; Kim, R. H. & Sodek, J. (1999), 'Bone sialoprotein.', *Crit Rev Oral Biol Med* **10**(1), 79--98.
- Garg, S.; Serruys, P. W.; van der Ent, M.; Schultz, C.; Mastik, F.; van Soest, G.; van der Steen, A. F. W.; Wilder, M. A.; Muller, J. E. & Regar, E. (2010), 'First use in patients of a combined near infrared spectroscopy and intra-vascular ultrasound catheter to identify composition and structure of coronary plaque.', *EuroIntervention* **5**(6), 755--756.
- Gersing, E. (1999), 'Monitoring temperature-induced changes in tissue during hyperthermia by impedance methods.', *Ann N Y Acad Sci* **873**, 13--20.
- Giaever, I. & Keese, C. R. (1993), 'A morphological biosensor for mammalian cells.', *Nature* **366**(6455), 591--592.
- Giordano, A.; Galderisi, U. & Marino, I. R. (2007), 'From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells.', *J Cell Physiol* **211**(1), 27--35.
- Gojo, S.; Gojo, N.; Takeda, Y.; Mori, T.; Abe, H.; Kyo, S.; Ichi Hata, J. & Umezawa, A. (2003), 'In vivo cardiovascularogenesis by direct injection of isolated adult mesenchymal stem cells.', *Exp Cell Res* **288**(1), 51--59.
- Goodwin, H. S.; Bicknese, A. R.; Chien, S. N.; Bogucki, B. D.; Quinn, C. O. & Wall, D. A. (2001), 'Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat, and neural markers.', *Biol Blood Marrow Transplant* **7**(11), 581--588.
- Gouin, F.; Delécrin, J.; Passuti, N.; Touchais, S.; Poirier, P. & Bainvel, J. V. (1995), '[Filling of bone defects using biphasic macroporous calcium phosphate ceramic. Apropos of 23 cases]', *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot* **81**(1), 59--65.
- Granchi, D.; Devescovi, V.; Baglio, S. R.; Leonardi, E.; Donzelli, O.; Magnani, M.; Stilli, S.; Giunti, A. & Baldini, N. (2010), 'Biological basis for the use of autologous bone marrow stromal cells in the treatment of congenital pseudarthrosis of the tibia.', *Bone* **(46)**3, 780--788.
- Grimnes, S. & Martinsen, O. G. (2005), 'Cole electrical impedance model--a critique and an alternative.', *IEEE Trans Biomed Eng* **52**(1), 132--135.

- 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.
- Guilak, F. (2000), 'The deformation behavior and viscoelastic properties of chondrocytes in articular cartilage.', *Biorheology* **37**(1-2), 27–44.
- Guilak, F. & Mow, V. C. (2000), 'The mechanical environment of the chondrocyte: a biphasic finite element model of cell-matrix interactions in articular cartilage.', *J Biomech* **33**(12), 1663–1673.
- Gupta, D.; Lammersfeld, C. A.; Burrows, J. L.; Dahlk, S. L.; Vashi, P. G.; Grutsch, J. F.; Hoffman, S. & Lis, C. G. (2004), 'Bioelectrical impedance phase angle in clinical practice: implications for prognosis in advanced colorectal cancer.', *Am J Clin Nutr* **80**(6), 1634–1638.
- Hamm, J. K.; el Jack, A. K.; Pilch, P. F. & Farmer, S. R. (1999), 'Role of PPAR gamma in regulating adipocyte differentiation and insulin-responsive glucose uptake.', *Ann N Y Acad Sci* **892**, 134–145.
- Heng, B. C.; Cao, T.; Stanton, L. W.; Robson, P. & Olsen, B. (2004), 'Strategies for directing the differentiation of stem cells into the osteogenic lineage in vitro.', *J Bone Miner Res* **19**(9), 1379–1394.
- Heubach, J. F.; Graf, E. M.; Leutheuser, J.; Bock, M.; Balana, B.; Zahanich, I.; Christ, T.; Boxberger, S.; Wettwer, E. & Ravens, U. (2004), 'Electrophysiological properties of human mesenchymal stem cells.', *J Physiol* **554**(Pt 3), 659–672.
- Hibi, H.; Yamada, Y.; Kagami, H. & Ueda, M. (2006), 'Distraction osteogenesis assisted by tissue engineering in an irradiated mandible: a case report.', *Int J Oral Maxillofac Implants* **21**(1), 141–147.
- Hildebrandt, C.; Büth, H.; Cho, S.; Impidjati & Thielecke, H. (2010), 'Detection of the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in 2D and 3D cultures by electrochemical impedance spectroscopy.', *J Biotechnol*.
- Hildebrandt, C.; Büth, H. & Thielecke, H. (2009), 'Influence of cell culture media conditions on the osteogenic differentiation of cord blood-derived mesenchymal stem cells.', *Ann Anat* **191**(1), 23–32.
- Hofmann, T.; Heyroth, F.; Meinhard, H.; Fränzel, W. & Raum, K. (2006), 'Assessment of composition and anisotropic elastic properties of secondary osteon lamellae.', *J Biomech* **39**(12), 2282–2294.
- Horwitz, E. M.; Prockop, D. J.; Fitzpatrick, L. A.; Koo, W. W.; Gordon, P. L.; Neel, M.; Sussman, M.; Orchard, P.; Marx, J. C.; Pyeritz, R. E. & Brenner, M. K. (1999), 'Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta.', *Nat Med* **5**(3), 309–313.
- Horwitz, E. M.; Prockop, D. J.; Gordon, P. L.; Koo, W. W.; Fitzpatrick, L. A.; Neel, M. D.; McCarville, M. E.; Orchard, P. J.; Pyeritz, R. E. & Brenner, M. K. (2001), 'Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta.', *Blood* **97**(5), 1227–1231.
- Huang, S. & Ingber, D. E. (2000), 'Shape-dependent control of cell growth, differentiation, and apoptosis: switching between attractors in cell regulatory networks.', *Exp Cell Res* **261**(1), 91–103.
- Huss, R. & Moosmann, S. (2002), 'The co-expression of CD117 (c-kit) and osteocalcin in activated bone marrow stem cells in different diseases.', *Br J Haematol* **118**(1), 305–312.
- Impidjati; Leonard, F. & Thielecke, H. (2005), 'Evaluation of a capillary measuring system for the characterisation of small tissue samples by impedance spectroscopy at higher frequencies.', *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* **1**, 678–681.
- Ingber, D. E. (2003), 'Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology.', *J Cell Sci* **116**(Pt 7), 1157–1173.

- Jarocho, D.; Lukaszewicz, E. & Majka, M. (2008), 'Advantage of mesenchymal stem cells (MSC) expansion directly from purified bone marrow CD105+ and CD271+ cells.', *Folia Histochem Cytobiol* **46**(3), 307--314.
- Johnston, R. N.; Atalar, A.; Heiserman, J.; Jipson, V. & Quate, C. F. (1979), 'Acoustic microscopy: resolution of subcellular detail.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(7), 3325--3329.
- 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.
- Jørgensen, N. R.; Henriksen, Z.; Sørensen, O. H. & Civitelli, R. (2004), 'Dexamethasone, BMP-2, and 1,25-dihydroxyvitamin D enhance a more differentiated osteoblast phenotype: validation of an in vitro model for human bone marrow-derived primary osteoblasts.', *Steroids* **69**(4), 219--226.
- Jossinet, J. (1998), 'The impedivity of freshly excised human breast tissue.', *Physiol Meas* **19**(1), 61--75.
- Jung, M.; Kaszap, B.; Redöhl, A.; Steck, E.; Breusch, S.; Richter, W. & Gotterbarm, T. (2009), 'Enhanced early tissue regeneration after matrix-assisted autologous mesenchymal stem cell transplantation in full thickness chondral defects in a minipig model.', *Cell Transplant* **18**(8), 923--932.
- 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.
- Kale, S.; Biermann, S.; Edwards, C.; Tarnowski, C.; Morris, M. & Long, M. W. (2000), 'Three-dimensional cellular development is essential for ex vivo formation of human bone.', *Nat Biotechnol* **18**(9), 954--958.
- Kang, X.-Q.; Zang, W.-J.; Bao, L.-J.; Li, D.-L.; Xu, X.-L. & Yu, X.-J. (2006), 'Differentiating characterization of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro.', *Cell Biol Int* **30**(7), 569--575.
- Kärner, E.; Unger, C.; Sloan, A. J.; Ahrlund-Richter, L.; Sugars, R. V. & Wendel, M. (2007), 'Bone matrix formation in osteogenic cultures derived from human embryonic stem cells in vitro.', *Stem Cells Dev* **16**(1), 39--52.
- Karp, J. M.; Ferreira, L. S.; Khademhosseini, A.; Kwon, A. H.; Yeh, J. & Langer, R. S. (2006), 'Cultivation of human embryonic stem cells without the embryoid body step enhances osteogenesis in vitro.', *Stem Cells* **24**(4), 835--843.
- Katritsis, D. G.; Sotiropoulou, P. A.; Karvouni, E.; Karabinos, I.; Korovesis, S.; Perez, S. A.; Voriadis, E. M. & Papamichail, M. (2005), 'Transcoronary transplantation of autologous mesenchymal stem cells and endothelial progenitors into infarcted human myocardium.', *Catheter Cardiovasc Interv* **65**(3), 321--329.
- Katsube, Y.; Hirose, M.; Nakamura, C. & Ohgushi, H. (2008), 'Correlation between proliferative activity and cellular thickness of human mesenchymal stem cells.', *Biochem Biophys Res Commun* **368**(2), 256--260.
- Keller, G. (2005), 'Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine.', *Genes Dev* **19**(10), 1129--1155.
- Kern, S.; Eichler, H.; Stoeve, J.; Klüter, H. & Bieback, K. (2006), 'Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue.', *Stem Cells* **24**(5), 1294--1301.
- Késmárky, G.; Kenyeres, P.; Rábai, M. & Tóth, K. (2008), 'Plasma viscosity: a forgotten variable.', *Clin Hemorheol Microcirc* **39**(1-4), 243--246.

- Kim, D.; Kim, C.-H.; Moon, J.-I.; Chung, Y.-G.; Chang, M.-Y.; Han, B.-S.; Ko, S.; Yang, E.; Cha, K. Y.; Lanza, R. & Kim, K.-S. (2009), 'Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins.', *Cell Stem Cell* **4**(6), 472–476.
- Kim, H.; Rey, C. & Glimcher, M. J. (1996), 'X-ray diffraction, electron microscopy, and Fourier transform infrared spectroscopy of apatite crystals isolated from chicken and bovine calcified cartilage.', *Calcif Tissue Int* **59**(1), 58–63.
- Kim, S. J.; Lee, J. E.; Park, J. H.; Lee, J. B.; Kim, J. M.; Yoon, B. S.; Song, J. M.; Roh, S. I.; Kim, C. G. & Yoon, H. S. (2005), 'Efficient derivation of new human embryonic stem cell lines.', *Mol Cells* **19**(1), 46–53.
- Kocher, A. A.; Schuster, M. D.; Szabolcs, M. J.; Takuma, S.; Burkhoff, D.; Wang, J.; Homma, S.; Edwards, N. M. & Itescu, S. (2001), 'Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function.', *Nat Med* **7**(4), 430–436.
- Kögler, G.; Sensken, S.; Airey, J. A.; Trapp, T.; Müschen, M.; Feldhahn, N.; Liedtke, S.; Sorg, R. V.; Fischer, J.; Rosenbaum, C.; Greschat, S.; Knipper, A.; Bender, J.; Degistirici, O.; Gao, J.; Caplan, A. I.; Colletti, E. J.; Almeida-Porada, G.; Müller, H. W.; Zanjani, E. & Wernet, P. (2004), 'A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential.', *J Exp Med* **200**(2), 123–135.
- Kon, E.; Muraglia, A.; Corsi, A.; Bianco, P.; Marcacci, M.; Martin, I.; Boyde, A.; Ruspantini, I.; Chistolini, P.; Rocca, M.; Giardino, R.; Cancedda, R. & Quarto, R. (2000), 'Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones.', *J Biomed Mater Res* **49**(3), 328–337.
- Kopen, G. C.; Prockop, D. J. & Phinney, D. G. (1999), 'Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(19), 10711–10716.
- Kramer, J.; Schlenke, P. & Rohwedel, J. (2007), 'Induction of ES cell-derived cartilage formation.', *Curr Protoc Cell Biol* **Chapter 23**, Unit 23.5.
- Kruse, C.; Kajahn, J.; Petschnik, A. E.; Maass, A.; Klink, E.; Rapoport, D. H. & Wedel, T. (2006), 'Adult pancreatic stem/progenitor cells spontaneously differentiate in vitro into multiple cell lineages and form teratoma-like structures.', *Ann Anat* **188**(6), 503–517.
- Kun, S.; Ristic, B.; Peura, R. A. & Dunn, R. M. (1999), 'Real-time extraction of tissue impedance model parameters for electrical impedance spectrometer.', *Med Biol Eng Comput* **37**(4), 428–432.
- Kundu, T.; Lee, J.-P.; Blase, C. & Bereiter-Hahn, J. (2006), 'Acoustic microscope lens modeling and its application in determining biological cell properties from single- and multi-layered cell models.', *J Acoust Soc Am* **120**(3), 1646–1654.
- Kundu, T.; Bereiter-Hahn, J. & Karl, I. (2000), 'Cell property determination from the acoustic microscope generated voltage versus frequency curves.', *Biophys J* **78**(5), 2270–2279.
- Kunisato, A.; Wakatsuki, M.; Kodama, Y.; Shinba, H.; Ishida, I. & Nagao, K. (2009), 'Generation of induced pluripotent stem (iPS) cells by efficient reprogramming of adult bone marrow cells.', *Stem Cells Dev.*
- Kurosawa, H. (2007), 'Methods for inducing embryoid body formation: in vitro differentiation system of embryonic stem cells.', *J Biosci Bioeng* **103**(5), 389–398.
- Kuznetsov, S. A.; Krebsbach, P. H.; Satomura, K.; Kerr, J.; Riminucci, M.; Benayahu, D. & Robey, P. G. (1997), 'Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo.', *J Bone Miner Res* **12**(9), 1335–1347.

- Lacey, D. C.; Simmons, P. J.; Graves, S. E. & Hamilton, J. A. (2009), 'Proinflammatory cytokines inhibit osteogenic differentiation from stem cells: implications for bone repair during inflammation.', *Osteoarthritis Cartilage* **17**(6), 735--742.
- Laneuville, O.; Breuer, D. K.; Dewitt, D. L.; Hla, T.; Funk, C. D. & Smith, W. L. (1994), 'Differential inhibition of human prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 by nonsteroidal anti-inflammatory drugs.', *J Pharmacol Exp Ther* **271**(2), 927--934.
- Laneuville, P.; Timm, M. & Hudson, A. T. (1994), 'bcr/abl expression in 32D cl3(G) cells inhibits apoptosis induced by protein tyrosine kinase inhibitors.', *Cancer Res* **54**(5), 1360--1366.
- Lecomte, M.; Laneuville, O.; Ji, C.; DeWitt, D. L. & Smith, W. L. (1994), 'Acetylation of human prostaglandin endoperoxide synthase-2 (cyclooxygenase-2) by aspirin.', *J Biol Chem* **269**(18), 13207--13215.
- Lee, O. K.; Kuo, T. K.; Chen, W.-M.; Lee, K.-D.; Hsieh, S.-L. & Chen, T.-H. (2004), 'Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood.', *Blood* **103**(5), 1669--1675.
- Leicht, S. & Raum, K. (2008), 'Acoustic impedance changes in cartilage and subchondral bone due to primary arthrosis.', *Ultrasonics* **48**(6-7), 613--620.
- Lemons, R. A. & Quate, C. F. (1975), 'Acoustic microscopy: biomedical applications.', *Science* **188**(4191), 905--911.
- Lendeckel, S.; Jödicke, A.; Christophis, P.; Heidinger, K.; Wolff, J.; Fraser, J. K.; Hedrick, M. H.; Berthold, L. & Howaldt, H.-P. (2004), 'Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report.', *J Craniomaxillofac Surg* **32**(6), 370--373.
- Li, C. D.; Zhang, W. Y.; Li, H. L.; Jiang, X. X.; Zhang, Y.; Tang, P. H. & Mao, N. (2005), 'Mesenchymal stem cells derived from human placenta suppress allogeneic umbilical cord blood lymphocyte proliferation.', *Cell Res* **15**(7), 539--547.
- Li, W.; Zhou, H.; Abujarour, R.; Zhu, S.; Joo, J. Y.; Lin, T.; Hao, E.; Schöler, H. R.; Hayek, A. & Ding, S. (2009), 'Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cells in the Absence of Exogenous Sox2.', *Stem Cells*.
- Lian, J. B. & Stein, G. S. (1995), 'Development of the osteoblast phenotype: molecular mechanisms mediating osteoblast growth and differentiation.', *Iowa Orthop J* **15**, 118--140.
- Logothetis, C. J. & Lin, S.-H. (2005), 'Osteoblasts in prostate cancer metastasis to bone.', *Nat Rev Cancer* **5**(1), 21--28.
- Lorenzo, A. D.; Andreoli, A.; Matthie, J. & Withers, P. (1997), 'Predicting body cell mass with bioimpedance by using theoretical methods: a technological review.', *J Appl Physiol* **82**(5), 1542--1558.
- Lu, L.-L.; Liu, Y.-J.; Yang, S.-G.; Zhao, Q.-J.; Wang, X.; Gong, W.; Han, Z.-B.; Xu, Z.-S.; Lu, Y.-X.; Liu, D.; Chen, Z.-Z. & Han, Z.-C. (2006), 'Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials.', *Haematologica* **91**(8), 1017--1026.
- McAdams, E. T. & Jossinet, J. (1995), 'Tissue impedance: a historical overview.', *Physiol Meas* **16**(3 Suppl A), A1--13.
- Macchiarini, P.; Jungebluth, P.; Go, T.; Asnaghi, M. A.; Rees, L. E.; Cogan, T. A.; Dodson, A.; Martorell, J.; Bellini, S.; Parnigotto, P. P.; Dickinson, S. C.; Hollander, A. P.; Mantero, S.; Conconi, M. T. & Birchall, M. A. (2008), 'Clinical transplantation of a tissue-engineered airway.', *Lancet* **372**(9655), 2023--2030.

7.7 Literatur

- Majd, H.; Wipff, P.-J.; Buscemi, L.; Bueno, M.; Vonwil, D.; Quinn, T. M. & Hinz, B. (2009), 'A novel method of dynamic culture surface expansion improves mesenchymal stem cell proliferation and phenotype.', *Stem Cells* **27**(1), 200--209.
- Makino, S.; Fukuda, K.; Miyoshi, S.; Konishi, F.; Kodama, H.; Pan, J.; Sano, M.; Takahashi, T.; Hori, S.; Abe, H.; Hata, J.; Umezawa, A. & Ogawa, S. (1999), 'Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro.', *J Clin Invest* **103**(5), 697--705.
- Maniopoulos, C.; Sodek, J. & Melcher, A. H. (1988), 'Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats.', *Cell Tissue Res* **254**(2), 317--330.
- Marcacci, M.; Kon, E.; Moukhachev, V.; Lavroukov, A.; Kutepov, S.; Quarto, R.; Mastrogiacomo, M. & Cancedda, R. (2007), 'Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study.', *Tissue Eng* **13**(5), 947--955.
- Martino, M. M.; Mochizuki, M.; Rothenfluh, D. A.; Rempel, S. A.; Hubbell, J. A. & Barker, T. H. (2009), 'Controlling integrin specificity and stem cell differentiation in 2D and 3D environments through regulation of fibronectin domain stability.', *Biomaterials* **30**(6), 1089--1097.
- Mauney, J. R.; Blumberg, J.; Pirun, M.; Volloch, V.; Vunjak-Novakovic, G. & Kaplan, D. L. (2004), 'Osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells on partially demineralized bone scaffolds in vitro.', *Tissue Eng* **10**(1-2), 81--92.
- Martin, G. R. (1981), 'Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(12), 7634--7638.
- Martin, G. R. (1981), 'Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(12), 7634--7638.
- Meng, G.; Liu, S.; Li, X.; Krawetz, R. J. & Rancourt, D. E. (2009), 'Extra-cellular Matrix Isolated from Foreskin Fibroblasts Supports Long Term Xeno-Free Human Embryonic Stem Cell Culture.', *Stem Cells Dev.*
- Meng, X.; Ichim, T. E.; Zhong, J.; Rogers, A.; Yin, Z.; Jackson, J.; Wang, H.; Ge, W.; Bogin, V.; Chan, K. W.; Thébaud, B. & Riordan, N. H. (2007), 'Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population.', *J Transl Med* **5**, 57.
- Mobasheri, A.; Csaki, C.; Clutterbuck, A. L.; Rahmanzadeh, M. & Shakibaei, M. (2009), 'Mesenchymal stem cells in connective tissue engineering and regenerative medicine: applications in cartilage repair and osteoarthritis therapy.', *Histol Histopathol* **24**(3), 347--366.
- Mohanty, S. T.; Kottam, L.; Gambardella, A.; Nicklin, M. J.; Coulton, L.; Hughes, D.; Wilson, A. G.; Croucher, P. I. & Bellantuono, I. (2010), 'Alterations in the self-renewal and differentiation ability of bone marrow mesenchymal stem cells in a mouse model of rheumatoid arthritis.', *Arthritis Res Ther* **12**(4), R149.
- Mosmann, T. (1983), 'Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.', *J Immunol Methods* **65**(1-2), 55--63.
- Moon, S. Y.; Park, Y. B.; Kim, D.-S.; Oh, S. K. & Kim, D.-W. (2006), 'Generation, culture, and differentiation of human embryonic stem cells for therapeutic applications.', *Mol Ther* **13**(1), 5--14.
- Mueller, S. M. & Glowacki, J. (2001), 'Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges.', *J Cell Biochem* **82**(4), 583--590.
- Mueller-Klieser, W. (1997), 'Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications.', *Am J Physiol* **273**(4 Pt 1), C1109--C1123.
- Muraglia, A.; Corsi, A.; Riminucci, M.; Mastrogiacomo, M.; Cancedda, R.; Bianco, P. & Quarto, R. (2003), 'Formation of a chondro-osseous rudiment in micromass cultures of human bone-marrow stromal cells.', *J Cell Sci* **116**(Pt 14), 2949--2955.

- Nakagawa, M.; Koyanagi, M.; Tanabe, K.; Takahashi, K.; Ichisaka, T.; Aoi, T.; Okita, K.; Mochiduki, Y.; Takizawa, N. & Yamanaka, S. (2008), 'Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts.', *Nat Biotechnol* **26**(1), 101–106.
- Nauta, A. J. & Fibbe, W. E. (2007), 'Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells.', *Blood* **110**(10), 3499–3506.
- zur Nieden, N. I.; Kempka, G. & Ahr, H. J. (2003), 'In vitro differentiation of embryonic stem cells into mineralized osteoblasts.', *Differentiation* **71**(1), 18–27.
- zur Nieden, N. I.; Kempka, G.; Rancourt, D. E. & Ahr, H.-J. (2005), 'Induction of chondro-, osteo- and adipogenesis in embryonic stem cells by bone morphogenetic protein-2: effect of cofactors on differentiating lineages.', *BMC Dev Biol* **5**, 1.
- Niemeyer, P.; Krause, U.; Fellenberg, J.; Kasten, P.; Seckinger, A.; Ho, A. D. & Simank, H.-G. (2004), 'Evaluation of mineralized collagen and alpha-tricalcium phosphate as scaffolds for tissue engineering of bone using human mesenchymal stem cells.', *Cells Tissues Organs* **177**(2), 68–78.
- Ofek, G.; Willard, V. P.; Koay, E. J.; Hu, J. C.; Lin, P. & Athanasiou, K. A. (2009), 'Mechanical characterization of differentiated human embryonic stem cells.', *J Biomech Eng* **131**(6), 061011.
- Ogunnika, O. T.; Scharfstein, M.; Cooper, R. C.; Ma, H.; Dawson, J. L. & Rutkove, S. B. (2008), 'A Handheld Electrical Impedance Myography probe for the assessment of neuromuscular disease.', *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* **2008**, 3566–3569.
- Ohgushi, H. & Caplan, A. I. (1999), 'Stem cell technology and bioceramics: from cell to gene engineering.', *J Biomed Mater Res* **48**(6), 913–927.
- Ohgushi, H.; Miyake, J. & Tateishi, T. (2003), 'Mesenchymal stem cells and bioceramics: strategies to regenerate the skeleton.', *Novartis Found Symp* **249**, 118–27; discussion 127-32, 170-4, 239-41.
- Ohgushi, H.; Okumura, M.; Tamai, S.; Shors, E. C. & Caplan, A. I. (1990), 'Marrow cell induced osteogenesis in porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate: a comparative histomorphometric study of ectopic bone formation.', *J Biomed Mater Res* **24**(12), 1563–1570.
- Okawai, H.; Kobayashi, K. & Nitta, S. (2001), 'An approach to acoustic properties of biological tissues using acoustic micrographs of attenuation constant and sound speed.', *J Ultrasound Med* **20**(8), 891–907.
- Okita, K.; Ichisaka, T. & Yamanaka, S. (2007), 'Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells.', *Nature* **448**(7151), 313–317.
- Orlic, D.; Kajstura, J.; Chimenti, S.; Jakoniuk, I.; Anderson, S. M.; Li, B.; Pickel, J.; McKay, R.; Nadal-Ginard, B.; Bodine, D. M.; Leri, A. & Anversa, P. (2001), 'Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium.', *Nature* **410**(6829), 701–705.
- Oswald, J.; Boxberger, S.; Jørgensen, B.; Feldmann, S.; Ehninger, G.; Bornhäuser, M. & Werner, C. (2004), 'Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro.', *Stem Cells* **22**(3), 377–384.
- Pan, W.; Petersen, E.; Cai, N.; Ma, G.; Lee, J. R.; Feng, Z.; Liao, K. & Leong, K. (2005), 'Viscoelastic properties of human mesenchymal stem cells.', *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* **5**, 4854–4857.
- Panepucci, R. A.; Siufi, J. L. C.; Silva, W. A.; Proto-Siquiera, R.; Neder, L.; Orellana, M.; Rocha, V.; Covas, D. T. & Zago, M. A. (2004), 'Comparison of gene expression of umbilical cord vein and bone marrow-derived mesenchymal stem cells.', *Stem Cells* **22**(7), 1263–1278.
- Panetta, N. J.; Gupta, D. M.; Quarto, N. & Longaker, M. T. (2009), 'Mesenchymal cells for skeletal tissue engineering.', *Panminerva Med* **51**(1), 25–41.

7.7 Literatur

- Park, S.-P.; Lee, Y. J.; Lee, K. S.; Shin, H. A.; Cho, H. Y.; Chung, K. S.; Kim, E. Y. & Lim, J. H. (2004), 'Establishment of human embryonic stem cell lines from frozen-thawed blastocysts using STO cell feeder layers.', *Hum Reprod* **19**(3), 676–684.
- Pauly, H. & Schwan, H. P. (1959), '[Impedance of a suspension of ball-shaped particles with a shell; a model for the dielectric behavior of cell suspensions and protein solutions.]', *Z Naturforsch B* **14B**(2), 125–131.
- Petersen, B. E.; Bowen, W. C.; Patrene, K. D.; Mars, W. M.; Sullivan, A. K.; Murase, N.; Boggs, S. S.; Greenberger, J. S. & Goff, J. P. (1999), 'Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells.', *Science* **284**(5417), 1168–1170.
- Petite, H.; Viateau, V.; Bensaïd, W.; Meunier, A.; de Pollak, C.; Bourguignon, M.; Oudina, K.; Sedel, L. & Guillemin, G. (2000), 'Tissue-engineered bone regeneration.', *Nat Biotechnol* **18**(9), 959–963.
- 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.
- Plettenberg, S.; Weiss, E. C.; Lemor, R. & Wehner, F. (2008), 'Subunits alpha, beta and gamma of the epithelial Na⁺ channel (ENaC) are functionally related to the hypertonicity-induced cation channel (HICC) in rat hepatocytes.', *Pflugers Arch* **455**(6), 1089–1095.
- Prockop, D. J. (1997), 'Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues.', *Science* **276**(5309), 71–74.
- 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.
- Quarto, R.; Thomas, D. & Liang, C. T. (1995), 'Bone progenitor cell deficits and the age-associated decline in bone repair capacity.', *Calcif Tissue Int* **56**(2), 123–129.
- 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.
- Raisz, L. G. (1999), 'Physiology and pathophysiology of bone remodeling.', *Clin Chem* **45**(8 Pt 2), 1353–1358.
- Rand, R. P. (1968), 'The Structure of a Model Membrane in Relation to the Viscoelastic Properties of the Red Cell Membrane.', *J Gen Physiol* **52**(1), 173–186.
- Ratajczak, M. Z.; Kucia, M.; Majka, M.; Reza, R. & Ratajczak, J. (2004), 'Heterogeneous populations of bone marrow stem cells—are we spotting on the same cells from the different angles?', *Folia Histochem Cytobiol* **42**(3), 139–146.
- Raum, K.; Reissauer, J. & Brandt, J. (2004), 'Frequency and resolution dependence of the anisotropic impedance estimation in cortical bone using time-resolved scanning acoustic microscopy.', *J Biomed Mater Res A* **71**(3), 430–438.
- Rebelatto, C. K.; Aguiar, A. M.; Moretão, M. P.; Senegaglia, A. C.; Hansen, P.; Barchiki, F.; Oliveira, J.; Martins, J.; Kuligovski, C.; Mansur, F.; Christofis, A.; Amaral, V. F.; Brofman, P. S.; Goldenberg, S.; Nakao, L. S. & Correa, A. (2008), 'Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue.', *Exp Biol Med (Maywood)* **233**(7), 901–913.
- Rey, C.; Kim, H. M.; Gerstenfeld, L. & Glimcher, M. J. (1995), 'Structural and chemical characteristics and maturation of the calcium-phosphate crystals formed during the calcification of the organic matrix synthesized by chicken osteoblasts in cell culture.', *J Bone Miner Res* **10**(10), 1577–1588.

- 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.
- Rittling, S. R.; Matsumoto, H. N.; McKee, M. D.; Nanci, A.; An, X. R.; Novick, K. E.; Kowalski, A. J.; Noda, M. & Denhardt, D. T. (1998), 'Mice lacking osteopontin show normal development and bone structure but display altered osteoclast formation in vitro.', *J Bone Miner Res* **13**(7), 1101--1111.
- Rocha, V.; Labopin, M.; Sanz, G.; Arcese, W.; Schwerdtfeger, R.; Bosi, A.; Jacobsen, N.; Ruutu, T.; de Lima, M.; Finke, J.; Frassoni, F.; Gluckman, E.; of European Blood, A. L. W. P.; Group, M. T. & Registry, E.-N. (2004), 'Transplants of umbilical-cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with acute leukemia.', *N Engl J Med* **351**(22), 2276--2285.
- Rodan, S. B.; Imai, Y.; Thiede, M. A.; Wesolowski, G.; Thompson, D.; Bar-Shavit, Z.; Shull, S.; Mann, K. & Rodan, G. A. (1987), 'Characterization of a human osteosarcoma cell line (Saos-2) with osteoblastic properties.', *Cancer Res* **47**(18), 4961--4966.
- Rodríguez, J. P.; González, M.; Ríos, S. & Cambiazo, V. (2004), 'Cytoskeletal organization of human mesenchymal stem cells (MSC) changes during their osteogenic differentiation.', *J Cell Biochem* **93**(4), 721--731.
- Romanov, Y. A.; Svintsitskaya, V. A. & Smirnov, V. N. (2003), 'Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord.', *Stem Cells* **21**(1), 105--110.
- Rossi, M. I. D.; Barros, A. P. D. N.; Baptista, L. S.; Garzoni, L. R.; Meirelles, M. N.; Takiya, C. M.; Pascarelli, B. M. O.; Dutra, H. S. & Borojovic, R. (2005), 'Multicellular spheroids of bone marrow stromal cells: a three-dimensional in vitro culture system for the study of hematopoietic cell migration.', *Braz J Med Biol Res* **38**(10), 1455--1462.
- Rowlands, A. S.; George, P. A. & Cooper-White, J. J. (2008), 'Directing osteogenic and myogenic differentiation of MSCs: interplay of stiffness and adhesive ligand presentation.', *Am J Physiol Cell Physiol* **295**(4), C1037--C1044.
- Rutkove, S. B. (2009), 'Electrical impedance myography: Background, current state, and future directions.', *Muscle Nerve* **40**(6), 936--946.
- Salazar, Y.; Bragos, R.; Casas, O.; Cinca, J. & Rosell, J. (2004), 'Transmural versus nontransmural in situ electrical impedance spectrum for healthy, ischemic, and healed myocardium.', *IEEE Trans Biomed Eng* **51**(8), 1421--1427.
- Samadikuchaksaraei, A.; Cohen, S.; Isaac, K.; Rippon, H. J.; Polak, J. M.; Bielby, R. C. & Bishop, A. E. (2006), 'Derivation of distal airway epithelium from human embryonic stem cells.', *Tissue Eng* **12**(4), 867--875.
- Sanchez-Ramos, J.; Song, S.; Cardozo-Pelaez, F.; Hazzi, C.; Stedeford, T.; Willing, A.; Freeman, T. B.; Saporta, S.; Janssen, W.; Patel, N.; Cooper, D. R. & Sanberg, P. R. (2000), 'Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro.', *Exp Neurol* **164**(2), 247--256.
- Sasaki, H.; Tanaka, M.; Saijo, Y.; Okawai, H.; Terasawa, Y.; Nitta, S. & Suzuki, K. (1996), 'Ultrasonic tissue characterization of renal cell carcinoma tissue.', *Nephron* **74**(1), 125--130.
- Satija, N. K.; Gurudutta, G. U.; Sharma, S.; Afrin, F.; Gupta, P.; Verma, Y. K.; Singh, V. K. & Tripathi, R. P. (2007), 'Mesenchymal stem cells: molecular targets for tissue engineering.', *Stem Cells Dev* **16**(1), 7--23.
- Satomura, K.; Hiraiwa, K. & Nagayama, M. (1991), 'Mineralized nodule formation in rat bone marrow stromal cell culture without beta-glycerophosphate.', *Bone Miner* **14**(1), 41--54.

7.7 Literatur

- Sawyer, A. A.; Hennessy, K. M. & Bellis, S. L. (2005), 'Regulation of mesenchymal stem cell attachment and spreading on hydroxyapatite by RGD peptides and adsorbed serum proteins.', *Biomaterials* **26**(13), 1467--1475.
- Scheller, E. L.; Krebsbach, P. H. & Kohn, D. H. (2009), 'Tissue engineering: state of the art in oral rehabilitation.', *J Oral Rehabil* **36**(5), 368--389.
- Schoonjans, K. & Auwerx, J. (2000), 'Thiazolidinediones: an update.', *Lancet* **355**(9208), 1008--1010.
- Schwan H.P., Ferris, C.D. (1968), 'Four-Elektrode Null Techniques for Impedance Measurement with High Resolution'. *Rev. Sci. Instrum.* 39, 481--485.
- Schwan, H. P. (1993), 'Mechanisms responsible for electrical properties of tissues and cell suspensions.', *Med Prog Technol* **19**(4), 163--165.
- Schwan, H.P. (1957), 'Electrical properties of tissue and cell suspensions.', *Adv Biol Med Phys* **5**, 147-209.
- Sekiya, I.; Larson, B. L.; Vuoristo, J. T.; Cui, J.-G. & Prockop, D. J. (2004), 'Adipogenic differentiation of human adult stem cells from bone marrow stroma (MSCs).', *J Bone Miner Res* **19**(2), 256--264.
- Shenaq, D. S.; Rastegar, F.; Petkovic, D.; Zhang, B.-Q.; He, B.-C.; Chen, L.; Zuo, G.-W.; Luo, Q.; Shi, Q.; Wagner, E. R.; Huang, E.; Gao, Y.; Gao, J.-L.; Kim, S. H.; Yang, K.; Bi, Y.; Su, Y.; Zhu, G.; Luo, J.; Luo, X.; Qin, J.; Reid, R. R.; Luu, H. H.; Haydon, R. C. & He, T.-C. (2010), 'Mesenchymal Progenitor Cells and Their Orthopedic Applications: Forging a Path towards Clinical Trials.', *Stem Cells Int* **2010**, 519028.
- Shukla, S.; Nair, R.; Rolle, M. W.; Braun, K. R.; Chan, C. K.; Johnson, P. Y.; Wight, T. N. & McDevitt, T. C. (2009), 'Synthesis and Organization of Hyaluronan and Versican by Embryonic Stem Cells Undergoing Embryoid Body Differentiation.', *J Histochem Cytochem.*
- Sierpowska, J.; Lammi, M. J.; Hakulinen, M. A.; Jurvelin, J. S.; Lappalainen, R. & Töyräs, J. (2007), 'Effect of human trabecular bone composition on its electrical properties.', *Med Eng Phys* **29**(8), 845--852.
- Sierpowska, J.; Töyräs, J.; Hakulinen, M. A.; Saarakkala, S.; Jurvelin, J. S. & Lappalainen, R. (2003), 'Electrical and dielectric properties of bovine trabecular bone--relationships with mechanical properties and mineral density.', *Phys Med Biol* **48**(6), 775--786.
- Sills, E. S.; Takeuchi, T.; Tanaka, N.; Neri, Q. V. & Palermo, G. D. (2005), 'Identification and isolation of embryonic stem cells in reproductive endocrinology: theoretical protocols for conservation of human embryos derived from in vitro fertilization.', *Theor Biol Med Model* **2**, 25.
- Sirard, C.; Laneuville, P. & Dick, J. E. (1994), 'Expression of bcr-abl abrogates factor-dependent growth of human hematopoietic M07E cells by an autocrine mechanism.', *Blood* **83**(6), 1575--1585.
- Sivagurunathan, S.; Muir, M. M.; Brennan, T. C.; Seale, J. P. & Mason, R. S. (2005), 'Influence of glucocorticoids on human osteoclast generation and activity.', *J Bone Miner Res* **20**(3), 390--398.
- Smith, A. G.; Heath, J. K.; Donaldson, D. D.; Wong, G. G.; Moreau, J.; Stahl, M. & Rogers, D. (1988), 'Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides.', *Nature* **336**(6200), 688--690.
- Song, I.-H.; Caplan, A. I. & Dennis, J. E. (2009), 'Dexamethasone inhibition of confluence-induced apoptosis in human mesenchymal stem cells.', *J Orthop Res* **27**(2), 216--221.
- Sprefico, A.; Frediani, B.; Capperucci, C.; Chellini, F.; Paffetti, A.; D'Ambrosio, C.; Bernardini, G.; Mini, R.; Collodel, G.; Scaloni, A.; Marcolongo, R. & Santucci, A. (2006), 'A proteomic study on human osteoblastic cells proliferation and differentiation.', *Proteomics* **6**(12), 3520--3532.

- Sottile, V.; Thomson, A. & McWhir, J. (2003), 'In vitro osteogenic differentiation of human ES cells.', *Cloning Stem Cells* **5**(2), 149--155.
- Stacey, G. N.; Cobo, F.; Nieto, A.; Talavera, P.; Healy, L. & Concha, A. (2006), 'The development of 'feeder' cells for the preparation of clinical grade hES cell lines: challenges and solutions.', *J Biotechnol* **125**(4), 583--588.
- Steklov, N.; Srivastava, A.; Sung, K. L. P.; Chen, P. C.; Lotz, M. K. & D'Lima, D. D. (2009), 'Aging-related differences in chondrocyte viscoelastic properties.', *Mol Cell Biomech* **6**(2), 113--119.
- Stenderup, K.; Justesen, J.; Clausen, C. & Kassem, M. (2003), 'Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells.', *Bone* **33**(6), 919--926.
- Stevens, D. A. & Williams, G. R. (1999), 'Hormone regulation of chondrocyte differentiation and endochondral bone formation.', *Mol Cell Endocrinol* **151**(1-2), 195--204.
- Stojkovic, M.; Lako, M.; Strachan, T. & Murdoch, A. (2004), 'Derivation, growth and applications of human embryonic stem cells.', *Reproduction* **128**(3), 259--267.
- Stojkovic, P.; Lako, M.; Przyborski, S.; Stewart, R.; Armstrong, L.; Evans, J.; Zhang, X. & Stojkovic, M. (2005), 'Human-serum matrix supports undifferentiated growth of human embryonic stem cells.', *Stem Cells* **23**(7), 895--902.
- Stojkovic, P.; Lako, M.; Stewart, R.; Przyborski, S.; Armstrong, L.; Evans, J.; Murdoch, A.; Strachan, T. & Stojkovic, M. (2005), 'An autogeneic feeder cell system that efficiently supports growth of undifferentiated human embryonic stem cells.', *Stem Cells* **23**(3), 306--314.
- Strauer, B. E.; Brehm, M.; Zeus, T.; Köstering, M.; Hernandez, A.; Sorg, R. V.; Kögler, G. & Wernet, P. (2002), 'Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans.', *Circulation* **106**(15), 1913--1918.
- Strohm, E. M. & Kolios, M. C. (2009), 'Measuring the mechanical properties of cells using acoustic microscopy.', *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* **2009**, 6042--6045.
- Takahashi, K. & Yamanaka, S. (2006), 'Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors.', *Cell* **126**(4), 663--676.
- Thielecke, H.; Mack, A. & Robitzki, A. (2001), 'Biohybrid microarrays--impedimetric biosensors with 3D in vitro tissues for toxicological and biomedical screening.', *Fresenius J Anal Chem* **369**(1), 23--29.
- Thesleff, T.; Lehtimäki, K.; Niskakangas, T.; Mannerström, B.; Miettinen, S.; Suuronen, R. & Ohman, J. (2011), 'Cranioplasty with adipose-derived stem cells and biomaterial. A novel method for cranial reconstruction.', *Neurosurgery*.
- Thomas, K. A.; Kay, J. F.; Cook, S. D. & Jarcho, M. (1987), 'The effect of surface macrotecture and hydroxylapatite coating on the mechanical strengths and histologic profiles of titanium implant materials.', *J Biomed Mater Res* **21**(12), 1395--1414.
- 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.
- Tian, X.-F.; Heng, B.-C.; Ge, Z.; Lu, K.; Rufaihah, A. J.; Fan, V. T.-W.; Yeo, J.-F. & Cao, T. (2008), 'Comparison of osteogenesis of human embryonic stem cells within 2D and 3D culture systems.', *Scand J Clin Lab Invest* **68**(1), 58--67.
- Titushkin, I. & Cho, M. (2007), 'Modulation of cellular mechanics during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells.', *Biophys J* **93**(10), 3693--3702.

- Vats, A.; Bielby, R. C.; Tolley, N.; Dickinson, S. C.; Boccaccini, A. R.; Hollander, A. P.; Bishop, A. E. & Polak, J. M. (2006), 'Chondrogenic differentiation of human embryonic stem cells: the effect of the micro-environment.', *Tissue Eng* **12**(6), 1687--1697.
- Wagner, W.; Bork, S.; Horn, P.; Kronic, D.; Walenda, T.; Diehlmann, A.; Benes, V.; Blake, J.; Huber, F.-X.; Eckstein, V.; Boukamp, P. & Ho, A. D. (2009), 'Aging and replicative senescence have related effects on human stem and progenitor cells.', *PLoS One* **4**(6), e5846.
- Wagner, W. & Ho, A. D. (2007), 'Mesenchymal stem cell preparations--comparing apples and oranges.', *Stem Cell Rev* **3**(4), 239--248.
- Wagner, W.; Wein, F.; Seckinger, A.; Frankhauser, M.; Wirkner, U.; Krause, U.; Blake, J.; Schwager, C.; Eckstein, V.; Ansorge, W. & Ho, A. D. (2005), 'Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood.', *Exp Hematol* **33**(11), 1402--1416.
- Wakitani, S.; Goto, T.; Pineda, S. J.; Young, R. G.; Mansour, J. M.; Caplan, A. I. & Goldberg, V. M. (1994), 'Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage.', *J Bone Joint Surg Am* **76**(4), 579--592.
- Wang, N. & Ingber, D. E. (1994), 'Control of cytoskeletal mechanics by extracellular matrix, cell shape, and mechanical tension.', *Biophys J* **66**(6), 2181--2189.
- Wang, W.; Itaka, K.; Ohba, S.; Nishiyama, N.; il Chung, U.; Yamasaki, Y. & Kataoka, K. (2009), '3D spheroid culture system on micropatterned substrates for improved differentiation efficiency of multipotent mesenchymal stem cells.', *Biomaterials* **30**(14), 2705--2715.
- Webster J.G. (Ed.) *Electrical Impedance Tomography*, Adam Hilger Series on Biomedical Engineering, 1989
- Weiss, E. C.; Anastasiadis, P.; Pilarczyk, G.; Lemor, R. M. & Zinin, P. V. (2007), 'Mechanical properties of single cells by high-frequency time-resolved acoustic microscopy.', *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control* **54**(11), 2257--2271.
- Weiss, E. C.; Lemor, R. M.; Pilarczyk, G.; Anastasiadis, P. & Zinin, P. V. (2007), 'Imaging of focal contacts of chicken heart muscle cells by high-frequency acoustic microscopy.', *Ultrasound Med Biol* **33**(8), 1320--1326.
- Weiss, M. L.; Anderson, C.; Medicetty, S.; Seshareddy, K. B.; Weiss, R. J.; VanderWerff, I.; Troyer, D. & McIntosh, K. R. (2008), 'Immune properties of human umbilical cord Wharton's jelly-derived cells.', *Stem Cells* **26**(11), 2865--2874.
- Wexler, S. A.; Donaldson, C.; Denning-Kendall, P.; Rice, C.; Bradley, B. & Hows, J. M. (2003), 'Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not.', *Br J Haematol* **121**(2), 368--374.
- Wiesmann, H. P.; Meyer, U.; Plate, U. & Höhling, H. J. (2005), 'Aspects of collagen mineralization in hard tissue formation.', *Int Rev Cytol* **242**, 121--156.
- Wilke, M. M.; Nydam, D. V. & Nixon, A. J. (2007), 'Enhanced early chondrogenesis in articular defects following arthroscopic mesenchymal stem cell implantation in an equine model.', *J Orthop Res* **25**(7), 913--925.
- Williams, R. L.; Hilton, D. J.; Pease, S.; Willson, T. A.; Stewart, C. L.; Gearing, D. P.; Wagner, E. F.; Metcalf, D.; Nicola, N. A. & Gough, N. M. (1988), 'Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells.', *Nature* **336**(6200), 684--687.
- Wollert, K. C.; Meyer, G. P.; Lotz, J.; Ringes-Lichtenberg, S.; Lippolt, P.; Breidenbach, C.; Fichtner, S.; Korte, T.; Hornig, B.; Messinger, D.; Arseniev, L.; Hertenstein, B.; Ganser, A. & Drexler, H. (2004), 'Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial.', *Lancet* **364**(9429), 141--148.

- 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* **458**(7239), 766--770.
- Woodbury, D.; Schwarz, E. J.; Prockop, D. J. & Black, I. B. (2000), 'Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons.', *J Neurosci Res* **61**(4), 364--370.
- Yokoyama, M.; Miwa, H.; Maeda, S.; Wakitani, S. & Takagi, M. (2008), 'Influence of fetal calf serum on differentiation of mesenchymal stem cells to chondrocytes during expansion.', *J Biosci Bioeng* **106**(1), 46--50.
- Yoo, S. J.; Yoon, B. S.; Kim, J. M.; Song, J. M.; Il Roh, S.; You, S. & Yoon, H. S. (2005), 'Efficient culture system for human embryonic stem cells using autologous human embryonic stem cell-derived feeder cells.', *Exp Mol Med* **37**(5), 399--407.
- Zhou, H.; Wu, S.; Joo, J. Y.; Zhu, S.; Han, D. W.; Lin, T.; Trauger, S.; Bien, G.; Yao, S.; Zhu, Y.; Siuzdak, G.; Schöler, H. R.; Duan, L. & Ding, S. (2009), 'Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins.', *Cell Stem Cell* **4**(5), 381--384.
- Zuk, P. A.; Zhu, M.; Ashjian, P.; Ugarte, D. A. D.; Huang, J. I.; Mizuno, H.; Alfonso, Z. C.; Fraser, J. K.; Benhaim, P. & Hedrick, M. H. (2002), 'Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells.', *Mol Biol Cell* **13**(12), 4279--4295.
- Zuk, P. A.; Zhu, M.; Mizuno, H.; Huang, J.; Futrell, J. W.; Katz, A. J.; Benhaim, P.; Lorenz, H. P. & Hedrick, M. H. (2001), 'Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies.', *Tissue Eng* **7**(2), 211--228.

7.8 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Cornelia Hildebrandt
Anschrift	Försterstraße 24, 66111 Saarbrücken
Geburtsdatum	22.01.1978 in Holzminden
Staatsangehörigkeit	deutsch

Ausbildung

06/1997	Abitur am Gymnasium Laatzten
10/1997 - 11/2004	Studium der Biochemie an der Technischen Universität Hannover mit den Hauptfächern: Organische Chemie und Pharmakologie
11/2004 - 05/2005	Diplomarbeit am Institut für Technische Chemie, Arbeitsgruppe Tissue Engineering der Universität Hannover
11/2005 – 01/2010	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik (IBMT), Abteilung Biohybride Systeme und Promotion.

Tätigkeiten

06/2003- 11/2003	Werksstudent bei Solvay Pharmaceuticals im Fachbereich Prüfmusterherstellung
------------------	--

