Aus der

Universitätsklinik für Urologie Tübingen

Charakterisierung der humanen MSC-ähnlichen Stromazellen aus dem embryonalen und maternalen Anteil der Plazenta

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Buttgereit, Lea

2022

Dekan:	Professor Dr. B. Pichler
1. Berichterstatter:	Professor Dr. W. K. Aicher
2. Berichterstatter:	Professor Dr. H. Abele
Tag der Disputation:	14.01.2021

Widmung

Diese Arbeit widme ich meiner Familie.

Vor allem möchte ich meinen Eltern Ellen und Michael danken, die mir mein Studium und die Zeit im Labor möglich gemacht haben. Auf euch kann ich immer zählen! Vielen Dank dafür!

Außerdem möchte ich meiner Schwester Joana danken, die mir in jeder Lebenslage zur Seite steht und mich immer versteht! Danke dafür, dass es dich gibt!

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis 4

Tabellenverzeichnis 9

Abkürzungsverzeichnis 10

1 Einleitung 14

1.1 Regenerative Medizin 14
1.2 Möglichkeiten und Grenzen der stammzellbasierten Therapie 14
1.3 Stammzellen und ihr Potenzial 15
1.4 Mesenchymale Stromazellen und ihr Differenzierungspotenzial 18
1.5 Minimalkriterien zur Identifikation von MSCs 21
1.6 Oberflächenproteine zur Charakterisierung von pMSCs 21
1.7 Befruchtung und Entwicklung der Blastozyste 27
1.8 Implantation und Entwicklung der Plazenta 28
1.9 Aufbau der Plazenta 30
1.10 Histologie der reifen Plazenta 32
1.11 Funktion der Plazenta 33
1.12 Die Plazenta als Stammzellquelle – Vorteile der pMSCs 33
1.13 Zielsetzung der Arbeit 34

2 Material und Methoden 35

2.1 Material 35
2.1.1 Geräte 35
2.1.2 Gebrauchsmaterialien 36
2.1.3 Chemikalien und Lösungen 38
2.1.4 Puffer und Medien 42
2.2 Methoden 44
2.2.1 Isolation humaner pf-MSCs nach Gorodetzky 44
2.2.2 Isolation humaner pfMSCs durch Enzymverdau 47
2.2.3 Isolation humaner pfMSCs/pmMSCs 49
2.2.4 Zellkultur 51
2.2.5 Differenzierung der pf-MSCs 53

2.2.6 Durchflusszytometrie 56
2.2.7 Quantitative RT-PCR 59
2.2.8 Immunhistochemie 63
3 Vorversuche zur Etablierung der Methodik 68
3.1 Immunhistochemie von Immunzellen im Schwein 68
3.1.1 Immunhistochemie am porcinen Thymus 68
3.1.2 Immunhistochemie am humanen Thymus 72
3.1.3 Immunhistochemie am porcinen Lymphknoten 75
4 Ergebnisse 78
4.1 Zellkultur 78
4.1.1 Zellmorphologie der pMSCs 81
4.1.2 Proliferationsrate 84
4.1.3 Differenzierung 85
4.1.4 Adipogene Differenzierung 87
4.1.5 Osteogene Differenzierung 89
4.2 Durchflusszytometrische Charakterisierung 91
4.2.1 Erfüllung der Minimalkriterien nach Dominici 91
4.2.2 Charakterisierung der pMSCs durch Oberflächenproteine 97
4.3 Quantitative RT-PCR zum Nachweis der Genexpression 100
4.4 Immunhistochemische Darstellung der pMSCs 103
4.4.1 Expression der MSC Marker nach Dominici 103
4.4.2 Expression von CD 146 im fetalen und maternalen Teil in vivo 107
4.4.3 Expression von CD 276 im fetalen und maternalen Teil in vivo 110
4.4.4 Expression von CD271 im fetalen und maternalen Teil in vivo 111
4.4.5 Expression von NG2 im fetalen und maternalen Teil in vivo 112
5 Diskussion 114
5.1 Zellkultur der pMSCs 114
5.2 Differenzierung der pMSCs 116
5.2.1 Adipogene Differenzierung 116
5.2.2 Osteogene Differenzierung 118
5.3 Durchflusszytometrische Charakterisierung 120

5.4 Oberflächenmarkerexpression auf Transkriptionsebene _____ 123
5.5 Immunhistochemische Darstellung im Vergleich _____ 124
6 Zusammenfassung _____ 126
7 Literaturverzeichnis _____ 127
8 Erklärung zum Eigenanteil _____ 133
9 Danksagung _____ 134

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der symmetrischen und asymmetrischen Stammzellteilung, Quelle: https://wissenschau.de/stammzellen_entwicklung_teilung.php 16

Abbildung 2: A: Schematische Darstellung der abnehmenden Stammzellpotenz mit Beispielen; B: Überblick über die Stammzellpotenz; Quelle: https://wissenschau.de/stammzellen_entwicklung_teilung.php 17

Abbildung 3: Ursprung und Differenzierungsfähigkeit von mesenchymalen Stammzellen und multipotenten mesenchymalen Stromazellen; (Nombela-Arrieta et al., 2011)……..……18

Abbildung 4: Die Rolle von CD276 in der Immuntherapie bei Krebs; (Castellanos et al., 2017) ……..…….24

Abbildung 5: A: Schematischer Aufbau der Blastozyste mit pluripotenten Stammzellen; B: Stammzellpotenz in der Entwicklung des Embryos, Quelle: https://wissenschau.de/stammzellen_entwicklung_teilung.php 28

Abbildung 6: Entwicklung der Plazenta, Quelle: Ulfig, N (2009), Kurzlehrbuch Embryologie, Stuttgart: Georg Thieme Verlag…….29

Abbildung 7: Entwicklung von Eihäuten und der Plazenta, Quelle: Ulfig, N (2009), Kurzlehrbuch Embryologie, Stuttgart: Georg Thieme Verlag……..30

Abbildung 8: Schematisierter Querschnitt durch eine reife Plazenta, Quelle: Breckwoldt, Kaufmann, Pfeinderer (2008), Gynäkologie und Geburtshilfe, Stuttgart: Georg Thieme Verlag…….31

Abbildung 9: Plazenta in HE, Zottenanschnitt einer reifen Plazenta im intervillösen Raum, Quelle: MH-Hannover, https://www.mh-hannover.de/19198.html 32

Abbildung 10: Darstellung der äußeren Chorionschicht der humanen Plazenta nach Ablösen der Amnionmembran …….45

Abbildung 11: Schematische Abbildung der verschiedenen 6-Well-Platten; gelb: GMP-Medium; orange: Lonza-Medium ……46

Abbildung 12: Schematische Darstellung einer 6-well-Platte; orange: Zugabe 2 ml Lonzamedium; gelb: Zugabe 2 ml GMP-Medium ……..…48

Abbildung 13: Durchflusszytometrie; A: vereinfachtes Schema der Durchflusszytometrie; photonics.com; B: Dot Plot FSC/SSC der Live Kontrolle Pl 08-19 Goro GMP……..…58

Abbildung 14: Durchflusszytometrie; exemplarischer Zellpoplulationsshift (orange) der Pl 08-19 pfMSCs im GMP-Medium ……...……59

Abbildung 15: Grundprinzipien der Fluoreszenzmikroskopie; A: Jablonski-Diagramm of Fluoreszence; wikipedia.org; B: Schematischer Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops; roempp.thieme.de……..……..67

Abbildung 16: S100A9+Calprotectin-Antikörper mit Sekundärantikörper ……..71

Abbildung 17: CD3 Antikörper mit Sekundärantikörper und DAPI ……..71

Abbildung 18: S100A9+Calprotectin-Antikörper mit Sekundärantikörper (Cy3), Färbung der T-Zone ……72

Abbildung 19: CD20 Antikörper mit Sekundärantikörper (Cy3) ……...73

Abbildung 20: CD14 Antikörper mit FITC-Markierung ……..73

Abbildung 21: CD56 Antikörper mit RFP-Markierung ……74

Abbildung 22: CD11c Antikörper mit PE-Markierung ……74

Abbildung 23: S100A9+Calprotectin Antikörper mit Sekundärantikörper (Cy3); A: Positivkontrolle; B: Negativkontrolle (nur Sekundärantikörper)……76

Abbildung 24: CD3 Antikörper mit Sekundärantikörper (Cy3) und DAPI ……...77

Abbildung 25: Lichtmikroskopiebilder der Zellexpansion Pl 01-19 im zeitlichen Verlauf…….……...79

Abbildung 26: Exemplarische Ansicht der Zellkultur Pl 05-19 pfMSCs in GMP Medium mit Kontamination…….80

Abbildung 27: Lichtmikroskopiebilder der Zellkulturen Pl 08-19 an Tag 12 in der Primärkultur……..…….82

Abbildung 28: Lichtmikroskopiebilder der Zellkultur Pl 10-19 in der 1. Passage an Tag 8……..…..83

Abbildung 29: Mittelwerte der Duplikationsraten von pMSCs von 5 verschiedenen Planzenten (n=5) mit eingetragener Standardabweichung……84

Abbildung 30: Zellkultur Pl 10-19 im osteogenen Differenzierungsmedium der maternalen Fraktion aus dem GMP-Medium an Tag 7, Zellablösung…….85

Abbildung 31: Makroskopische Ansicht nach der Differnzierungsfärbung der Pl 10-19……..86

Abbildung 32: Adipogene Differenzierungsfärbung der pfMSCs in GMP der Pl 10-19 an Tag 22……..…87

Abbildung 33: Adipogene Differenzierungsfärbung der pfMSCs in Lonza der Pl 10-19 an Tag 22……..…….87

Abbildung 34: Adipogene Differenzierungsfärbung der pmMSCs in GMP der Pl 10-19 an Tag 22…….……..88

Abbildung 35: Adipogene Differenzierungsfärbung der pmMSCs in Lonza der Pl 10-19 an Tag 22……..……88

Abbildung 36: Osteogene Differenzierungsfärbung der pfMSCs in GMP der Pl 10-19 an Tag 22…….……..89

Abbildung 37: Osteogene Differenzierungsfärbung der pfMSCs in Lonza der Pl 10-19 an Tag 22…….……..89

Abbildung 38: Osteogene Differenzierungsfärbung der pmMSCs in Lonza der Pl 10-19 an Tag 22…….……..89

Abbildung 39: Ergebnisse der Durchflusszytometrie der fetalen Fraktion der Pl 08-19, kultiviert in GMP-Medium, Dargestellt sind die untersuchten Positivmarker der Minimalkriterien nach Dominici (≥ 95% Oberflächenmolekülexpression)……92

Abbildung 40: Ergebnisse der Durchflusszytometrie der fetalen Fraktion der Pl 08-19, kultiviert in GMP-Medium, Dargestellt sind die untersuchten Negativmarker der Minimalkriterien nach Dominici (≤ 2 % Oberflächenmolekülexpression)……..…..93

Abbildung 41: Mittelwerte der Mean Intensitiy of Flourescence (MFI) mit eingetragener Standardabweichung (schwarze Linie)……..……95

Abbildung 42: Mittelwerte der Mean Intensitiy of Flourescence (MFI) mit eingetragener Standardabweichung (schwarze Linie)…….…..96

Abbildung 43: Ergebnisse der Durchflusszytometrie der maternalen Fraktion der Pl 08-19, kultiviert in GMP-Medium……..…98

Abbildung 44: Mittelwerte der Mean Intensitiy of Flourescence (MFI) mit eingetragener Standardabweichung (schwarze Linie)……...…99

Abbildung 45.: Target/Reference der einzelnen RT-PCRs der Plazenten Pl 08-19 – Pl 12-19…….…..…101

Abbildung 46: Mittelwerte der Target/Reference der Pl 08-19 und Pl 10-19 – Pl 12-19……...……102

Abbildung 47.: Immunhistochemie eines 10 µm dicken Gefrierschnitts der äußeren Chorionplatte (fetal) der Pl 11-19……...…104

Abbildung 48: Immunhistochemie eines 10 µm dicken Gefrierschnitts des intervillösen Raums (maternal) der Pl 11-19……..…104

Abbildung 49: Immunhistochemie eines 10 µm dicken Gefrierschnitts der äußeren Chorionplatte (fetal) der Pl 11-19……105

Abbildung 50: Immunhistochemie eines 10 µm dicken Gefrierschnitts des intervillösen Raums (maternal) der Pl 11-19…….……105

Abbildung 51: Immunhistochemie eines 10 µm dicken Gefrierschnitts der äußeren Chorionplatte (fetal) der Pl 11-19……....106

Abbildung 52: Immunhistochemie eines 10 µm dicken Gefrierschnitts des intervillösen Raums (maternal) der Pl 11-19……106

Abbildung 53: Immunhistochemie mehrerer 10µm dicker Gefrierschnitte aus der Plazenta Pl 10-19……..……107

Abbildung 54: Immunhistochemie mehrerer 10µm dicker Gefrierschnitte aus der Plazenta Pl 11-19……..…....108

Abbildung 55: Immunhistochemie mehrerer 10µm dicker Gefrierschnitte aus der Plazenta Pl 12-19……..……109

Abbildung 56: Immunhistochemie verschiedener 10µm dicker Gefrierschnitte aus der Plazenta Pl 10-19……..……110

Abbildung 57: Immunhistochemie verschiedener 10µm dicker Gefrierschnitte aus der Plazenta Pl 10-19……..……..111

Abbildung 58: Immunhistochemie verschiedener 10µm dicker Gefrierschnitte aus der Plazenta Pl 10-19……..…..112

Abbildung 59: Immunhistochemie verschiedener 10µm dicker Gefrierschnitte aus der Plazenta Pl 11-19……..….113

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Antikörper in der Durchflusszytometrie……...57

Tabelle 2: Emmissionsspektren der Fluorochrommoleküle……..57

Tabelle 3: Pipettierschema zum Nachweis von pMSC-Genen in den isolierten Zellen bei 60°……..…….62

Tabelle 4: Antikörper und Verdünnungen in der Immunhistochemie……..….64

Tabelle 5: Verwendete Antikörper zur Immunhistochemie des porcinen Thymus mit entsprechenem Verdünnungsverhältnis……..…70

Tabelle 6: Zusätzlich verwendete Antikörper am humanen Thymus……..….72

Tabelle 7: Verwendete Antikörper zur Immunhistochemie des porcinen Lymphknotens mit entsprechenem Verdünnungsverhältnis…….75

Tabelle 8: Qualitative Auswertung der mikroskopischen adipogenen Differenzierungsfärbungen der PI 08-19 – PI 12-19……...89

Tabelle 9: Qualitative Auswertung der mikroskopischen osteogenen Differenzierungsfärbungen der PI 08-19 – PI 12-19……...…91

Tabelle 10: Ermittelte P-Werte im T-Test in Abhängigkeit der Mean fluorescence intensity (MFI) der Durchflusszytometrie……..97

Tabelle 11: Ermittelte P-Werte im T-Test in Abhängigkeit der Mean fluorescence intensity (MFI) der Durchflusszytometrie……...….100

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampicillin
AK	Antikörper
AMSC	Amnionmesenchymstromazellen
APC	Allophycocyanin
BMSC	bone-marrow-derived mesenchymal stem cell
BSA	Bovine Serum Albumin
CD	Clusters of Differentiation
cDNA	complementary desoxyribonucleinacid
CFU-F	colony-forming units of fibroblasts
CMSC	Chorionmesenchymstromazellen
CY3	Cyanine 3
DAPI	4`,6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	desoxyribonucleinacid
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendaimintetraessigsäure
ETOH	Ethanol
EMT	endotheliale mesenchymale Transition
EV	extrazelluläre Vesikel
FCS	Fetal Calf Serum
FFP	Fresh Frozen Plasma
FITC	Fluoresceinisocyanath

FSC	forward scatter
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GMP	Good manufacturing practice
GORO	fetale mesenchymale Stromazellen der Plazenta
G	Gentamycin
HEPES	2-(4(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HBSS	Hank`s balanced Salt Solution
HLA-DR	human leucocyte antigen Klasse 2
HIPS	humane induzierte pluripotente Stammzellen
IL	Interleukin
IFN	Interferon
LNGFR	low affinity nerve growth factor receptor
MAT	maternale mesenchamle Stromazellen der Plazenta
MCAM	Melanoma cell adhesion molecule
MSC	mesenchymale Stromazellen
MEM	Modified Eagle Medium
MMP	Matrix-Metalloprotease
MUC4	Mucinprotein 4
MFI	Mean Intensitiy of Flourescence
NG2	Neural/Glial Antigen 2
NTC	non-template control
NTW	non-template water
PBS	phosphate-buffered saline

PCR	Polymerasechainreaction
PE	R-Phycoerithrin
Pen./Strep.	Penicillin/Streptomycin
pMSC	mesenchmyale Stromazellen der Plazenta
pfMSC	fetale mesenchymale Stromazellen der Plazenta
pmMSC	maternale mesenchymale Stromazellen der Plazenta
PDGFRB	platelet-derived growth factor receptor beta
PLL	Plättchenlysat
PL	Plazenta
PPARγ	peroxisom proliferator activated receptor
PPIA	Peptidylprolylisomerase A
P/S	Penicillin/Streptomycin
RFP	red fluorescence protein
RNA	ribonucleic acid
RPM	rounds per minute
RCF	relative centrifugal force
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase Polymerasechainreaction
S	Serum
SM22 α	smooth muscle 22 alpha
SMB	Somatomedin B
SSC	side scatter
T	Tylosin

TAG	Transgelin
VEGF	vascular endothelial growth factor
vWF	von Willebrandfaktor

1 Einleitung

1.1 Regenerative Medizin

Die regenerative Medizin ist ein Teilbereich der Biomedizin. Grundgedanke ist die Aktivierung der Selbstheilungskräfte des Körpers zur Regeneration von Zellen, Geweben und ganzer Organe. Dadurch findet die regenerative Medizin eine fachübergreifende Anwendung. Sowohl durch das Nachzüchten von Gewebe, als auch durch die Stimulation körpereigener Wachstums- und Regenerationsprozesse können neue Therapiekonzepte entwickelt werden. Dabei spielt besonders die Stammzellforschung eine wichtige Rolle. Im Rahmen der Leukämietherapie werden bereits seit 1972 hämatopoetische Stammzellen transplantiert, um langfristig eine Heilung zu erzielen. (Thomas et al., 1972) Volkswirtschaftlich relevante Erkrankungen wie die koronare Herzkrankheit, Diabetes mellitus oder Krebs könnten in Zukunft mit Methoden aus der regenerativen Medizin behandelt werden.

1.2 Möglichkeiten und Grenzen der stammzellbasierten Therapie

Aufgrund des demografischen Wandels und der dadurch bedingten Zunahme altersbedingter, degenerativer Erkrankungen gewinnt die Stammzellforschung und die stammzellbasierte Therapie zunehmend an Bedeutung. Durch die nahezu unbegrenzte Teilungsfähigkeit und das Differenzierungspotenzial in verschiedene Gewebetypen, bieten Stammzellen eine besondere Zellressource. Von der Grundlagenforschung bis zur klinischen Anwendung finden sich zum aktuellen Zeitpunkt viele Ansätze möglicher Therapieoptionen, die vom Genom-Editing bis zur Züchtung von sogenannten Organoiden reichen. Mit der Herstellung von Krankheitsmodellen zur Medikamententestung und Erprobung der Therapiewirksamkeit wird der Übergang zur personalisierten Medizin geschaffen. (Zenke, Marx-Stölting, & Schickl, 2018)

Obwohl die Stammzelltherapie bereits klinische Anwendung findet, bringt die Stammzellforschung einige Herausforderungen mit sich. Nicht nur aufgrund der ethischen Brisanz der embryonalen Stammzellgewinnung und der damit verbundenen gesetzlichen Forschungslimitierung seit 2002 ist die Suche nach alternativen Stammzellquellen zwingend notwendig.(Zenke et al., 2018) Die

Entwicklung einer nicht invasiven Methodik zur Stammzellisolierung, die Etablierung der sicheren Zellkultivierung mit Erhalt der Teilungsfähigkeit und eine kontrollierten Differenzierungsfähigkeit ohne eine potenzielle Entartung zu Tumoren sind hier einige Herausforderungen. Außerdem muss ,,in vitro“ die sogenannte Stammzellnische nachgeahmt werden, die das direkte Umfeld der Stammzellen beschreibt und Einfluss auf die Selbsterneuerung, Differenzierungsfähigkeit und das Alterungspotenzial der Stammzellen hat. (Jones & Wagers, 2008) Stammzellen werden durch ihr Mikromilieu kontrolliert, was wichtig für das Verständnis der Stammzellregulation ist. (Spradling, Drummond-Barbosa, & Kai, 2001)

1.3 Stammzellen und ihr Potenzial

Stammzellen zeichnen sich, durch ihr scheinbar unerschöpfliches Teilungspotenzial, die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und die Differenzierungsfähigkeit in nahezu jeden Gewebetyp aus. Das hohe Teilungspotenzial geht mit einem geringeren Alterungspotenzial einher. Die Zellalterung ist abhängig von der Telomerlänge der DNA und der jeweiligen Telomerase-Aktivität. (Hiyama & Hiyama, 2007) Ist diese hoch, besteht eine nahezu unlimitierte Fähigkeit zur Selbsterneuerung.

Stammzellen können sich in Abhängigkeit von der jeweiligen Stammzellnische, entweder symmetrisch oder asymmetrisch teilen. Bei der symmetrischen Teilung entstehen zwei identische Tochterzellen. Bei der asymmetrischen Teilung verliert eine der beiden Zellen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und damit ihr Stammzellpotenzial.(Morrison & Kimble, 2006)

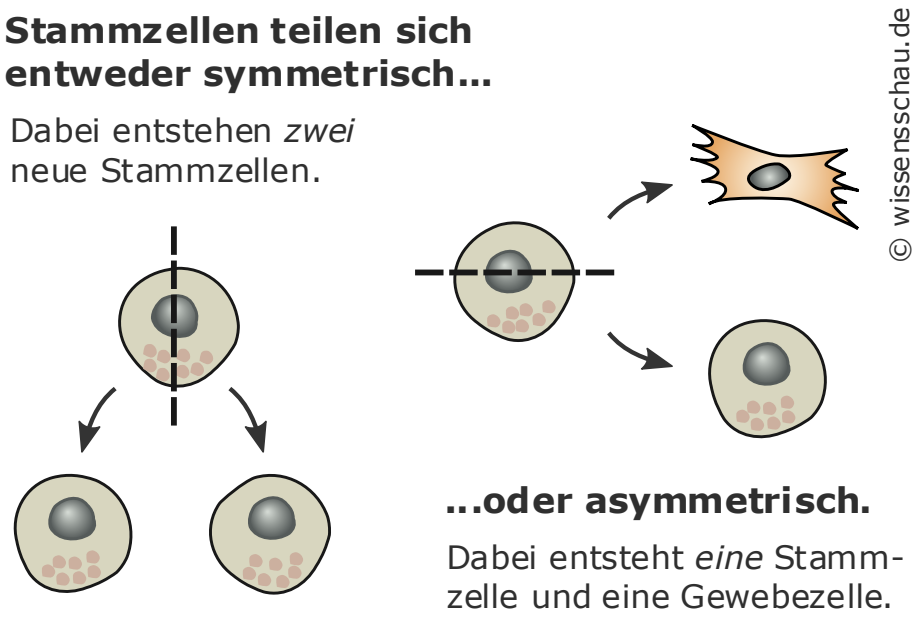


Abbildung 1: Schematische Darstellung der symmetrischen und asymmetrischen Stammzellteilung, Quelle: https://www.wissensschau.de/stammzellen/stammzellen_entwicklung_teilung.php

Nach ihrem Differenzierungspotenzial, kann man Stammzellen in totipotente, pluripotente und multipotente Stammzellen einteilen. Totipotente Stammzellen, welche in der Zygote vorkommen, sind in der Lage einen ganzen Organismus inklusive der Plazenta zu bilden. Bei weiterer Zellteilung entwickeln sich die totipotenten Zellen zu pluripotenten Stammzellen, welche sich zu allen drei Keimblättern des Embryos entwickeln können. Sie werden als ,,embryonale“ Stammzellen bezeichnet. Aus den pluripotenten Stammzellen werden multipotente Stammzellen, die sich in spezifische Gewebe differenzieren können. Diese multipotenten Stammzellen sind für die Gewebsregeneration und -reparatur verantwortlich. Man findet sie zum einen in extra-embryonalen Gewebe wie der Plazenta, dem Amnionepithel und der Nabelschnur, als auch im ausgewachsenen Menschen. Deshalb werden sie entweder als ,,fetale“ oder als ,,adulte“ Stammzellen bezeichnet.(In 't Anker et al., 2004) Beispiele sind die hämatopoetische Stammzellen und die mesenchymalen Stammzellen. Es gibt die Möglichkeit diese multipotenten Stammzellen durch Zugabe bestimmter Transkriptionsfaktoren in sogenannte ,,humane induzierte pluripotente

Stammzellen“ (hiPS) zurück zu programmieren (indirekte Reprogrammierung). (Buganim, Faddah, & Jaenisch, 2013) Außerdem können diese Zellen von fibroblastischen Zellen zu neuronalen Zellen umgewandelt werden, was als direkte Reprogrammierung bezeichnet wird. (Graf, 2011)

Aus den Multipotenten Stammzellen werden unipotente Stammzellen, welche lediglich in einen Zelltyp differenzieren können.

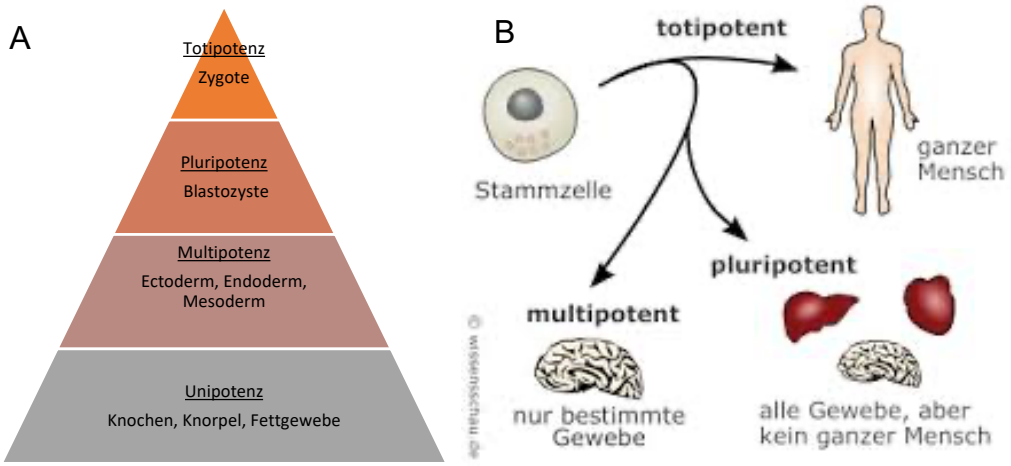


Abbildung .2 : A: Schematische Darstellung der abnehmenden Stammzellpotenz (von oben nach unten) mit jeweiligen beispielhaften Gewebetypen; B: Überblick über die Stammzellpotenz https://www.wissensschau.de/stammzellen/stammzellen_entwicklung_teilung.php

1.4 Mesenchymale Stromazellen und ihr Differenzierungspotenzial

Mesenchymale Stromazellen (MSCs) sind multipotente ,,adulte“ Stammzellen, die an der Gewebereperatur beteiligt sind. Sie kommen im Knochenmark, in der Niere, im Pankreas, im Fettgewebe, im Skelettmuskel, im Gehirn und in der Leber vor. (Nombela-Arrieta, Ritz, & Silberstein, 2011) Eine weitere Ressource stellt die humane Plazenta dar.(In 't Anker et al., 2004) Zellmorphologisch zeichnen sich MSCs durch ihr fibroblastenartiges Aussehen mit spindelartigen Ausläufern und einer Adhärens zu Plastik aus. (Gucciardo et al., 2009)

„In vitro“ konnte durch Zugabe bestimmter Umgebungsfaktoren, eine Differenzierungsfähigkeit zu Osteoblasten, Chrondrozyten und Adipozyten nachgewiesen werden.(Nombela-Arrieta et al., 2011) Zusätzlich gibt es Hinweise darauf, dass sie über ihr Sekretom Muskelzellen zur Proliferation anregen können.(Winkler et al., 2018) Nicht nur phänotypisch, sondern auch auf molekularer Ebene stellen die MSCs eine sehr heterogene Gruppe dar, wodurch sich unterschiedliche Differenzierungs-, Proliferations- und immunmodulatorische Potenziale ergeben.(O'Connor, 2019)

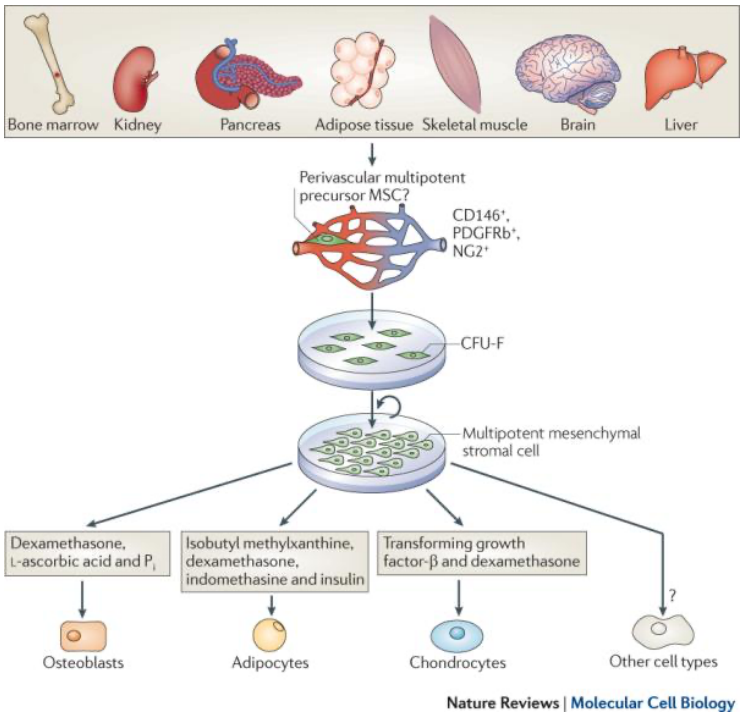


Abbildung 3:Ursprung und Differenzierungsfähigkeit von Mesenchymalen Stammzellen und multipotenten mesenchymalen Stromazellen; (Nombela-Arrieta et al., 2011)

Mesenchymale Stammzellen haben ein großes Potenzial für die klinische Applikation in beschädigtes Gewebe zur Stimulation regenerativer Prozesse. (Farini, Sitzia, Erratico, Meregalli, & Torrente, 2014) Aufgrund ihrer geringen Immunogenität scheinen die MSCs für eine autologe bzw. allogene Stammzelltransplantation besonders geeignet zu sein. (Dorronsoro et al., 2013) Bisher ist bekannt, dass sie sowohl durch ihr Differenzierungspotenzial, als auch über den sogenannten ,,parakrinen Effekt“ die Immunantwort modulieren und die Gewebsreperatur stimulieren können. Dabei werden endogene Faktoren über extrazelluläre Vesikel (EVs) freigesetzt, welche die umliegenden Zellen zur Proliferation anregen. (Yuan, Zhang, & Chen, 2019) Aktuell wird untersucht, ob eine alleinige Therapie mit EVs von MSCs zur Gewebsregeneration möglich ist.(Codispoti, Marrelli, Paduano, & Tatullo, 2018)

Aufgrund der oben beschriebenen Heterogenität der MSC-Population ergeben sich verschiedene Differenzierungspotenziale, die somit unterschiedliche klinische Anwendungen bedingen. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass MSCs aus dem Knochenmark eine höhere adipogene und osteogene Differenzierungsfähigkeit besitzen als die MSCs aus der Plazenta. Dies korrelliert auch mit der Expression der osteogenese- und adipogenesespezifischen Transkriptionsfaktoren.(Ulrich et al., 2013) Die in dieser Arbeit untersuchten mesenchymalen Stammzellen der Plazenta (pMSCs), könnten für die Therapie akuter Gewebsverluste in Frage kommen. Dabei wäre eine prophylaktische Therapie der Belastungsinkontinenz nach Geburtstrauma der Beckenbodenmuskulatur, durch eine direkte postnatale Stammzellinjektion von pMSCs der eigenen Plazenta ein mögliches Anwendungsbeispiel.

In klinischen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die Skelettmuskelregeneration nach Hüftersatzoperation durch eine low-dose Injektion von pMSCs, zu einer höheren Muskelstabilität und einer geringeren immunolatorischen Stressreaktion geführt hat. (Winkler et al., 2018)

Des Weiteren gibt es im Tierversuch mit Mäusen Hinweise darauf, dass die Injektion von mesenchymalen Stammzellen aus der Plazenta den Blutfluss, bei einer künstlich induzierten Ischämie, dosisabhängig zum Positiven beeinflussen können. (Zahavi-Goldstein et al., 2017)

Eine Herausforderung ist die Stammzellisolation und -expansion. Parolini et. Al. veröffentlichte 2008 ein Paper auf der Grundlage des ersten internationalen Workshops der ,,Placenta Derived StemCells“ im März 2007, in welchem er die Plazenta in vier verschiedene Regionen einteilte. Das Epithel des Amnions mit Amnionepithelzellen, das Amniotische Mesenchym mit Amnionmesenchym-stromazellen (AMSC), das Chorionmesenchym mit Chorionmesenchym-stromazellen (CMSC) und dem Choriontrophoblasten mit Choriontrophoblasten-stromazellen. (Parolini et al., 2008)

Soncini et.Al. konnte zeigen, dass sowohl die AMSCs als auch die CMSCs die typischen MSC-Charakteristika aufweisen (siehe Kapitel 1.5). (Soncini et al., 2007)

In dieser Arbeit wird nun die ,,fetale“ AMSC-Population mit der ,,maternalen“ CMSC-Population miteinander verglichen. Dabei werden die Populationen in zwei verschiedenen Kultivierungsmedien expandiert und auf ihre Charakteristika untersucht.

Bisher ist bekannt, dass fetale MSCs in vitro eine höhere Proliferationsrate haben als adulte MSCs. Des Weiteren scheinen MSCs aus dem Amnionepithel ein höheres adipogenes Differenzierungspotenzial zu besitzen, während MSCs aus dem Chorion in vitro besser in Muskel-/Knochen- und Knorpelgewebe differenzieren können.(Gucciardo et al., 2009)

1.5 Minimalkriterien zur Identifikation von MSCs

Das ,,Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society of Cellular Therapie“ hat 2006 Minimalkriterien zur Identifikation von ,,multipotenten mesenchymalen stromalen Zellen“ (MSCs) festgelegt, um eine Equivalenz und Vergleichbarkeit für wissenschaftliche Untersuchungen und vorklinische Studien sicherzustellen. (Dominici et al., 2006) Diese beziehen sich auf die Identifikation von humanen Knochenmarks-MSCs, werden allerdings in dieser Arbeit auch für die aus der Plazenta isolierten MSCs angewendet.

Die Minimalkriterien besagen, dass die Zelladhärens zu Plastik unter Standardzellkulturbedingungen gegeben sein muss. Außerdem müssen die Oberflächenmoleküle CD105, CD73 und CD90 zu mehr als 95% exprimiert sein, CD45, CD34, CD14/CD11b, CD79α/CD19 und HLA-DR dürfen nicht mehr als 2% exprimiert werden. Zusätzlich muss das Potenzial einer osteogene, adipogene und chrondrogene ,,in vitro“ Differenzierung bestehen. (Dominici et al., 2006)

1.6 Oberflächenproteine zur Charakterisierung von pMSCs

Ein wichtiges Ziel der Forschung ist die Charakterisierung von mesenchymalen Stammzellen. Dabei geht es besonders um die Identifizierung spezifischer Oberflächenproteine. Bisher konnte Domenici et.al. eine Markerkombination festlegen, wobei diese Marker unabhängig voneinander auch auf anderen Zelltypen vorkommen.

CD73 ist eine Ecto-5`-nucleotidase und kommt unter anderem auf T- und B-Zellen, auf Epithel- und Endothelzellen und auf follikulären dendritischen Zellen vor.(Resta, Yamashita, & Thompson, 1998) Möglicherweise spielt CD73 eine Rolle in der Modulation des Aktinzytoskeletts und der Regulation von Zellkontakten.(Kirches et al., 2018) Außerdem können extrazelluläre Vesikel der MSCs mittels CD73 identifiziert werden.(Ramos et al., 2016)

CD90, oder auch Thy-1 ist ein Glykoprotein welches auf Nervenzellen, Fibroblasten, Monozyten und hämatopoetischen Stammzellen vorkommt. (Saalbach, Haustein, & Anderegg, 2000)

CD105 wird auch Endogolin genannt, kommt vor allem auf Endothelzellen vor und stellt einen Teil des ,,Transforming growth factor β- Rezeptorkomplex dar. (Pierelli et al., 2001) Dieser ist an der Zellprolifertion und -differenzierung beteiligt und wirkt als negativ autokriner Wachstumsfakor. Wodurch es bei Dysregulation zur Apoptose kommt. (NCBI, 2019)

Es ist bekannt, dass MSCs sehr wenig HLA („Human leukocyte antigen“) und weder hämatopoetische noch endotheliale Marker, wie CD34 oder den „von Willebrand Faktor“ exprimieren.(Gucciardo et al., 2009)

CD34 ist ein Glykoprotein der Mucin-Familie und auf dendritischen, hämatopoetischen, Endothel- und Stromazellen zu finden. Es ist an der Zell-Zell-Adhäsion und an der Hemmung der hämatopoetischen Differenzierung beteiligt. Es gibt Hinweise darauf, dass $CD34^+$ humane embryonale Stammzellen, möglicherweise Vorläuferzellen von MSCs sein könnten, da diese auch die Fähigkeit zur adipogenen, chondrogenen und osteogenen Differenzierung besitzen.(Kopher et al., 2010)

Weitere Negativmarker für MSCs sind CD45 und CD14. CD45 ist eine Tyrosinphosphatase und als Transmembranprotein sowohl auf hämatopoetischen Zellen, als auch auf B- und T-Zellen zu finden. (Saunders & Johnson, 2010) Es ist ein Leukozytenantigen und sowohl an der Regulation der T-Zell-Entwicklung, als auch an der Modulation der T-Zell-Antwort beteiligt. (Earl & Baum, 2008)

CD14 ist ein Glykoprotein auf Monozyten, Makrophagen, Granulozyten und Endothelzellen. Als zellulärer Lipopolysaccharidrezeptor bindet es Lipopolysaccharidkomplexe, dadurch kommt es zur Zytokinausschüttung.

<u>CD271</u>

Der CD271-Marker wird auch als ,,low affinity nerve growth factor receptor“ (LNGFR) bezeichnet und gehört zur TNF-Superfamilie. Bisher konnte gezeigt werden, dass er auf allen bmMSC´s vorkommt. (Alvarez-Viejo et al., 2013) Dabei zeigten $CD271^+$ Zellen eine höhere Expression von Runx2, PPARγ und N-Cadherin, welche zu den, an der osteogenen und adipogenen

Differenzierung beteiligten, Transkriptionsfaktoren zählen. (Jarocha, Lukasiewicz, & Majka, 2008) Bei der CD271-Expression der pMSCs zeigen sich widersprüchliche Forschungsergebnisse. Soncini et.al. konnte eine CD271-Expression von pMSCs nachweisen, welche mit einer höheren Teilungsrate und einem höheren osteogenen Differenzierungspotenzial einher geht.(Soncini et al., 2007) Battula et.al. zeigte allerdings, dass pMSCs weniger CD271 exprimieren als bmMSCs. Deshalb stelle CD271 keinen geeigneten pMSC-Marker dar. (Battula, Treml, Abele, & Buhring, 2008)

CD276

Der CD276-Oberlächenmarker, auch B7-H3 genannt, ist ein Immuncheckpointmolekül der B7/CD28-Familie, welche für eine Interaktion mit Checkpointmarkern wie CTLAP4, PD-1 und CD28 bekannt sind.(Castellanos et al., 2017) Physiologisch wird das B7-H3 Gen in aktivierten dendritischen Zellen, Monozyten, T-Zellen, B-Zellen und Natürlichen Killerzellen transkribiert. (Ni & Dong, 2017) Außerdem konnte eine starke Expression in Plazentagewebe nachgewiesen werden. (NCBI, 2020)

Aufgrund einer pathologischen Expression in verschiedenen Krebsformen, wie unter anderem Melanomzellen, verschiedenen gastrointestinalen Tumoren und Brustkrebs könnte CD276 ein krebsspezifischer endothelialer Marker und mögliches Angriffsziel für Immuntherapien sein. Bekannt ist, dass eine höhere Expression mit einer schlechteren Prognose für den Patienten einhergeht. (Ni & Dong, 2017) Dies könnte unterschiedlichen Mechanismen zugrunde liegen.

Es gibt bereits Hinweise darauf, dass CD276 regulatorisch an der Downregulation der T-Zellen beteiligt ist, und somit eine mögliche Immunantwort unterdrückt. (Castellanos et al., 2017)

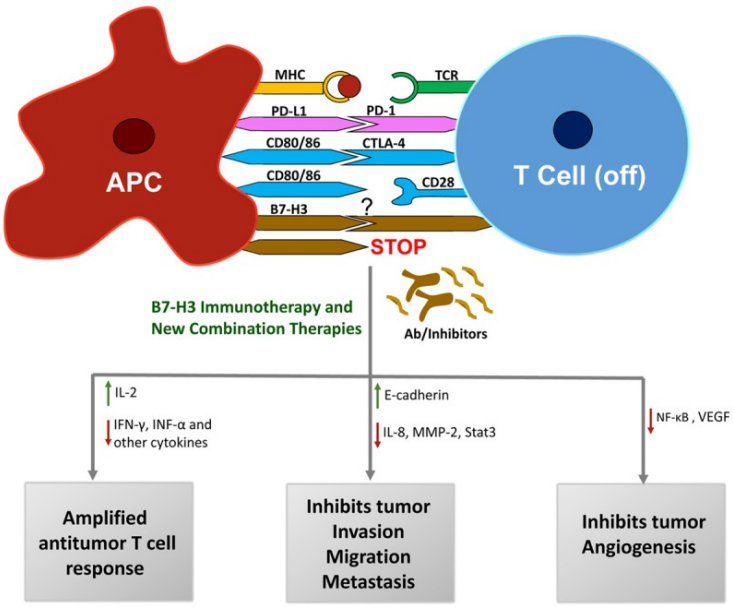


Abbildung 4: Die Rolle von CD276 in der Immuntherapie bei Krebs; (Castellanos et al., 2017)

Bisher konnte eine verstärkte endothelial mesenchymale Transition (EMT) bei CD276^{+}Tumorzellen nachgewiesen werden, bei welcher durch einen E-Cadherin- und β-Catenin Verlust eine Zellmigration möglich wird. (Jiang et al., 2016) CD276 Knockdown führte bei Hepatocellulären Karzinomen zu einer Hemmung der EMT.(Kang et al., 2015)

Des Weiteren konnten Shi et.al. zeigen, dass eine CD276 Überexpression die aerobe Glykolyse und Laktatproduktion in Colorektaltumoren steigert und dadurch eine Chemoresistenz vermittelt wird. (Shi et al., 2019) Dieser sogenannter ,,Warburgeffekt“ konnte auch in Brustkrebs- und Melanomzellen beobachtet werden. (Lim et al., 2016)

CD276 konnte außerdem in Osteoblasten während der Knochenentwicklung nachgewiesen werden. Im Tiermodel mit Mäusen führte ein Verlust von CD276 zu einer geringeren Knochendichte. Allerdings wiesen die Mäuse bei der Geburt keinerlei Entwicklungsdefekte auf. (Suh et al., 2004) Dies lässt vermuten, dass eine T-Zell-Inhibition durch CD276, bei der Implantation der Zygote, durch die Expression uns unbekannter Moleküle möglicherweise kompensiert werden

kann. Außerdem wäre eine stärkere osteogene Differenzierung von $CD276^{+}$ Zellen zu erwarten.

CD146

Der Oberflächenmarker CD146 ist ein Mitglied der Immunglobulinsuperfamilie, welches als Membranglycoprotein an der Zell-Zell Interaktion beteiligt ist. (Shih, 1999) Es ist mit der Metastasierung des malignen Melanoms assoziiert und wird auch als Melanoma-cell-adhesion-molecule (MCAM) bezeichnet.(Rapanotti et al., 2017) Physiologisch wird es auf Endothelzellen und aktivierten T-Zellen exprimiert und ist dadurch möglicherweise an der Modulation des humanen Immunsystems beteiligt. (Guezguez et al., 2007) In Endothelzellen wird es auch als S-Endo-1 bezeichnet und kommt sowohl als kurze lösliche Form, als auch als längere zellassoziierte Form vor. (Bardin, Frances, Combes, Sampol, & Dignat-George, 1998)

CD146 spielt eine Rolle in der Tumorprogression und bei der Implantation und Placentabildung, bei der der Trophoblast durch CD146-Expression an die glatten Muskelzellen des Myometriums bindet und die Invasion der Plazenta limitiert.(Shih, 1999)

Ein aktuelles Forschungsthema ist die Korrelation der CD146-Expression mit dem osteogenen Differenzierungspotenzial. Hier zeigen sich kontroverse Forschungsergebnisse. Pilz et.al. konnte zeigen, dass sich eine hohe CD146-Expression auf MSCs der Plazenta mit einem höheren osteogenen Differenzierungspotenzial korrelliert. (Pilz et al., 2011; Ulrich et al., 2015) Espagnolle et.al. untersuchte die Differenzierungsfähigkeit von CD146-low-bmMSCs und CD146-high-bmMSCs und konnte keinen signifikanten Unterschied feststellen. Allerdings wurde eine schnelllere Proliferation der CD146-low-bmMSC-Fraktion und eine Up-Regulation von Calponin-1 und SM22α in vaskulären glatten Muskelzellen in Assoziation mit CD146-high-bmMSCs beobachtet. (Espagnolle et al., 2014) Harkness et.al. beobachtete eine stärkere Knochenbildung bei CD146(-)-Zellen, allerdings eine höhere Knochenmarksregeneration und transendotheliale Migration bei CD146(+)-Zellen. (Harkness, Zaher, Ditzel, Isa, & Kassem, 2016)

Neuste Studien geben einen Hinweis darauf, dass die Expression von CD146 und CD34 möglicherweise einen synergistischen Effekt auf die Knochenheilung haben. (Wang et al., 2019) Hier zeigte Wang et.al., dass $CD146^+$ Perizyten eine verstärkte Neigung zur Angiogenese haben, während in Kombination mit $CD34^+$ Adventitiazellen ein starker parakriner proosteogener Effekt auftritt.

Auch das Zellkulturmedium schien in vitro einen Einfluss auf die CD146-Expression zu haben. Verpoorten et.al. konnte zeigen, dass Plättchenlysat im Medium zu einer geringeren CD146-Expression führte.(Verpoorten et al., 2017)

SushiD2

Die „Sushi-Domain-containig-2“ (SushiD2) ist ein aus 822 Aminosäuren bestehendes Typ 1 Transmembranprotein, welches sich durch seine große extrazelluläre Domäne auszeichnet. Diese besteht aus dem von Willebrandfaktor (vWF), Somatomedin B (SMB), einer Adhäsionsassoziierten Domäne (MUC4) und einer Sushi-Domäne. (Sivasubramaniyan et al., 2013) In Brustkrebszellen konnte eine hohe Expression des Moleküls nachgewiesen werden, wodurch die Zellen durch Induktion von Apoptose zur Immunoevasion befähigt werden. (Watson, Evans, & Egland, 2013) In gesundem Darm wird SushiD2 ebenfalls exprimiert, in Colon-CA allerdings downreguliert.(Pan et al., 2014) Bisher ist relativ wenig über das Molekül bekannt und aktuell Bestandteil der Forschung. Fraglich ist, ob SushiD2 ein geeigneter MSC-Marker sein kann. Bezüglich der in vitro Kultivierung konnten frühere Untersuchungen zeigen, dass humanes Plättchenlysat im Zellkulturmedium zu einer geringeren SushiD2-Expression führte. (Peißert, 2017)

NG2

Das „neural glial antigen 2“ - Proteoglycan ist ein Transmembranprotein und auf Oligodendrozyten, Perizyten und Knorpel-/ Knochenvorläuferzellen zu finden. Durch die Beteiligung an der Zell-Zell- und Zell-ECM-Kommunikation wird ein Einfluss auf die Zellmigration und -proliferation vermutet.(Kopher et al., 2010) Außerdem gilt NG2 als Perizytenmarker.(Ozerdem, Grako, Dahlin-Huppe,

Monosov, & Stallcup, 2001) Es wird in fetalen MSCs höher Exprimiert als in adulten MSCs.(Barilani et al., 2018)

1.7 Befruchtung und Entwicklung der Blastozyste

Die Befruchtung der Eizelle findet in der Ampulla des Eileiters statt. Dabei durchdringt das Spermium die Corona radiata und die Zona pellucida (Penetration), welche die äußeren Schichten der Eizelle darstellen, und fusioniert anschließend mit ihrer Zellmembran (Imprägnation). Es folgt die Aneinanderlagerung von weiblichem und männlichem Vorkern, wobei in beiden getrennt voneinander eine Reduplikation der jeweiligen DNA stattfindet. Bei der Befruchtung wird in Abhängigkeit vom männlichen Vorkern das Geschlecht determiniert. Trägt dieser ein Y-Chromosom, werden der sich entwickelnde Embryo und auch die fetalen Stammzellen der Plazenta ein männliches Erbgut tragen. Trägt er ein X-Chromosom, entsteht ein weiblicher Chromosomensatz. Es folgt die gemeinsame Anordnung der Chromosomen auf einer Spindel. Aus dem haploiden Chromosomensatz der Keimzellen wird ein diploider Chromosomensatz (Syngamie). Anschließend erfolgt eine reguläre Mitose, die erste Zellteilung mit 46 Chromosomen und somit der Eintritt in das 2-Zellstadium. (Sadler et al., 2014)

Innerhalb der ersten 3 Tage entwickelt sich die im 2-Zell-Stadium befindliche Zygote zur Morula (früh: 16-Zell-Stadium, spät: 32-Zellstadium) und wandert den Eileiter entlang bis zum Uterus.(Sadler et al., 2014) Die frühen Embryonalzellen, auch Blastomere genannt, können zu allen Zellen des Blastozystenstadiums werden und sind deshalb totipotente Stammzellen.(Moore et al., 2007) Durch allmähliche Ausbildung von „tight junctions“ im Anfangs lockeren Zellverband entsteht eine Adhärens der Zellen untereinander. Durch Verlust der Zona pellucida wird die Zygote am 4.-5. Tag zur Blastozyste. Die Stammzellen der Blastozyste sind nun pluripotent.

Die äußere Zellmasse wird zum Trophoblasten, welcher sich später zum fetalen Anteil der Plazenta entwickelt. In den Interzellularsepten des Trophoblasten kommt es zur Flüssigkeisansammlung und damit zur Ausbildung der Blastozystenhöhle. Die innere Zellmasse, der Embryoblast, akkumuliert nun an

einem Pol innerhalb der ihn umgebenden Blastozystenhöhle. (Sadler et al., 2014)



A B

Abbildung 5: A: Schematischer Aufbau der Blastozyste mit pluripotenten Stammzellen; B: Stammzellpotenz in der Entwicklung des Embryos; Quelle: https://www.wissensschau.de/stammzellen/blastozyste_pluripotente_stammzellen.php

1.8 Implantation und Entwicklung der Plazenta

Die zelluläre Interaktion zwischen Trophoblast und Zona compacta des Endometriums des Uterus, stellt die Implantation der Blastozyste dar. Dabei besteht zu jedem Zeitpunkt eine Immuntoleranz der Mutter, obwohl die Zellen des Trophoblasten nur zur Häfte mütterliches Erbgut tragen. Dieses Phänomen ist bisher noch nicht abschließend geklärt und Gegenstand der Forschung. Die Expression des CD276-Markers, welcher bekanntlich immunmodulatiorische Eigenschaften besitzt, könnte hier möglicherweise eine Rolle spielen. Bei der Implantation dringen die Trophoblastenzellen in das Interstitium unterhalb des Epithels der mütterlichen Schleimhaut ein. Im Inneren des Trophoblasten entsteht ein Zytotrophoblast, welcher aus einkernigen Zellen besteht, die durch zahlreiche Mitosen gekennzeichnet ist. (Sadler et al., 2014)

Durch Fusion dieser Zellen, entsteht der äußere Synzytiothrophoblast, welcher infiltrativ in das Endometrium einwächst, Lakunen bildet und schlussendlich die aus uterinen Spiralarterien einsprossenden Kapillaren eröffnet. (Ulfig et al., 2005)

Der fetale Anteil der Plazenta entwickelt sich aus dem Trophoblasten und dem extraembryonalen Mesoderm, welche die Chorionplatte bilden. Im Laufe der Schwangerschaft vergrößert sich die Amnionhöhle, sodass Chorion und Amnion miteinander verschmelzen und sich eine dünne Amnionmembran über die fetale Chorionplatte legt.

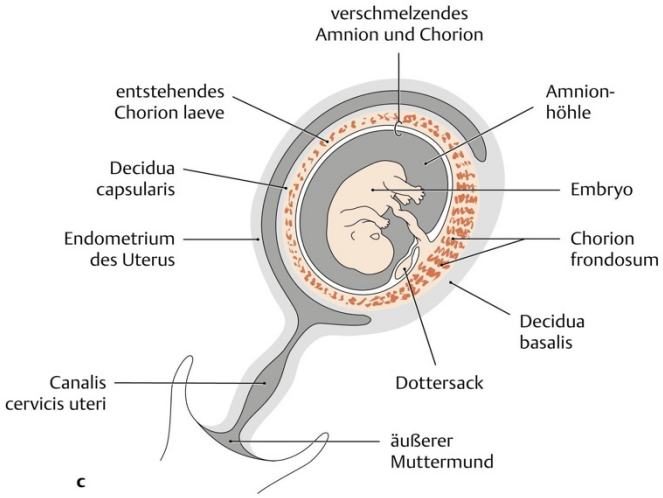


Abbildung 6: Entwicklung der Plazenta, Quelle: Ulfig, N (2009), Kurzlehrbuch Embryologie, Stuttgart: Georg Thieme Verlag

Der Trophoblast bildet über mehrere Zwischenschritte die oben beschriebenen Zotten, welche sich als Stammzotten von der fetalen Chorionplatte bis zur maternalen Dezidua erstrecken. Über die Einwanderung von Zytotrophoblastzellen in die zuvor eröffneten Lakunen, die anschließende Einwanderung von extraembryonalen Mesoderm und die sich daraus entwickelnden Blutgefäße (Endothel) entsteht ein vierschichtiger Aufbau der Zotten mit einem zentralen Kapillarsystem welche mit den Gefäßen der Chorionplatte in Verbindung stehen und in die Nabelarterien und -venen münden (Plazentaschranke). (Sadler et al., 2014)

Somit ist die fetale Oberfläche durch eine weißlich schimmernde Schicht, durchzogen von zirkulär, an der exzentrischen inserierenden Nabelschnur, mündenden Gefäßen, gekennzeichnet.

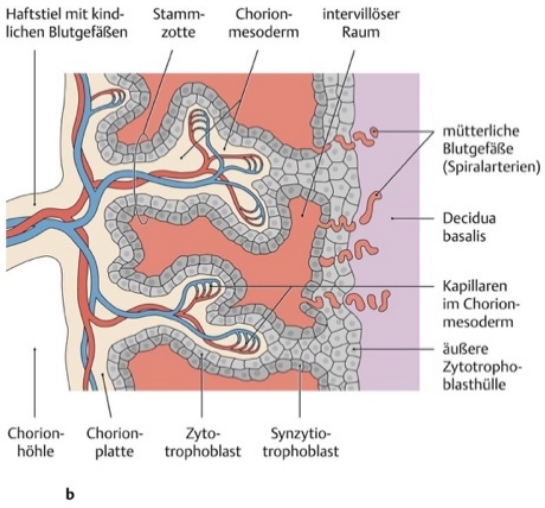


Abbildung 7: Entwicklung von Eihäuten und der Plazenta, Quelle: Ulfig, N (2009), Kurzlehrbuch Embryologie, Stuttgart: Georg Thieme Verlag

An der Basalplatte dringen die Zytotrophoblastzellen in das mütterliche Endothel der Spiralarterien ein, es folgt eine Umwandlung der Zytotrophoblastzellen in Endothelzellen. Es entstehen Gefäßen mit fetalen und maternalen Anteilen.

1.9 Aufbau der Plazenta

Die Plazenta besteht aus der äußeren, maternalen Basalplatte (Deziduaplatte), welche vor der Geburt funktionell mit dem Uterus verbunden ist und der inneren, fetalen Chorionplatte, welche von zwei Umbilikalarterien und einer Umbilikalvene durchzogen wird und von Amnionepithel bedeckt ist. An der fetalen Seite inseriert die Nabelschnur, welche die direkte Verbindung zum Feten darstellt. Zwischen beiden Platten besteht ein sogenannter intervillöser

Raum welcher von Zotten durchzogen ist. Hier werden die fetalen Blutgefäße von mütterlichem Blut umspült. (Ulfig et al., 2005)

Der intervillöse Raum stellt eine Mischzone aus maternalen Dezidualzellen und fetalen Trophoblastenzellen dar. Aus der Dezidua bilden sich Plazentasepten aus, die nicht bis zur Chorionplatte reichen und von Trophoblastzellen überzogen werden. Es bilden sich sogenannte Kotyledone, welche die Plazenta unterteilen. Nach der Geburt sind diese Kotyledone als leicht erhabene Areale sichtbar.

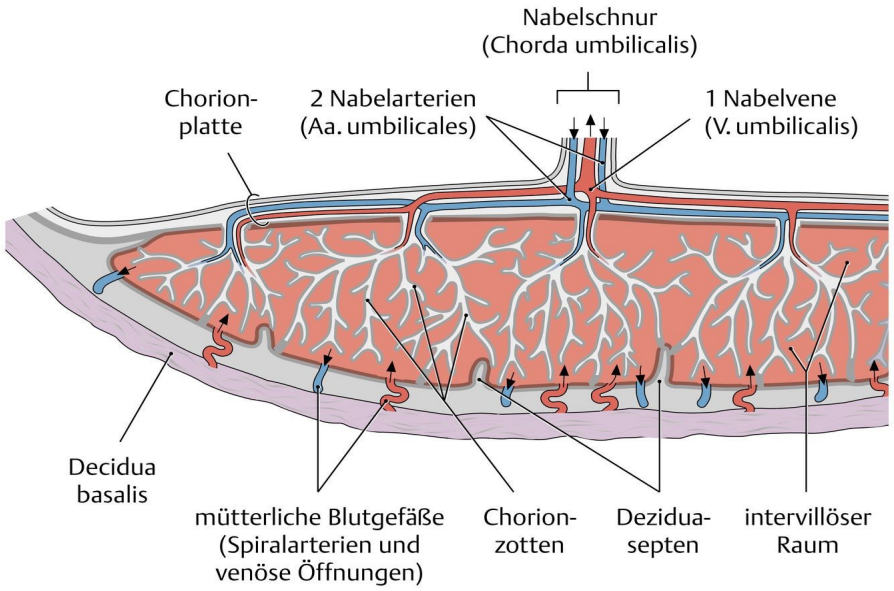


Abbildung 8: Schematisierter Querschnitt durch eine reife Plazenta, Quelle: Breckwoldt, Kaufmann, Pfeinderer (2008), Gynäkologie und Geburtshilfe, Stuttgart: Georg Thieme Verlag

1.10 Histologie der reifen Plazenta

Die äußere Chorionplatte der Plazeta besteht aus kollagenem Bindegewebe und extraembryonalem Mesenchym, welches von den Vasa umbilicalia durchzogen wird.

Der intervillöse Raum wird durchzogen von den tertiären Chorionzotten, welche außen vom isoprismatischen, epithelialen Überzug des Synzytiotrophoblasten begrenzt werden. In ihrem Kern finden sich embryonale Gefäße, Mesenchymzellen, Fibroblasten und Makrophagen, welche auch als Hofbauer-Zellen bezeichnet werden. Gelegentlich finden sich sogenannte Synzytialknoten, welche Abschnürungen des Synzytiotrophoblasten in den intervillösen Raum darstellen. Unterhalb des Synzytiotrophoblasten können Zytotrophoblastenzellen, sogenannte Langhans-Zellen, vorkommen, welche sich durch einen runden Zellkern mit deutlichem Nukleolus auszeichnen. Da diese allerdings mit fortschreitender Entwicklung in den Synzytiothrophoblasten übergehen, findet man in der reifen Plazenta nur noch wenige dieser Zellen.

In der maternalen Dezidua sind runde Deziduazellen mit deutlichem Nukleolus, Riesenzellen und Fibrinoid zu finden.



Abbildung 9: Plazenta in HE, Zottenanschnitt einer reifen Plazenta im intervillösen Raum, Quelle: https://www.mh-hannover.de/19198.html

1.11 Funktion der Plazenta

Hauptfunktion der Planzenta ist die Versorgung des Feten mit Nährstoffen und Sauerstoff, sowie die Hormonbildung zur Aufrechterhaltung der Schwangerschaft. Durch eine, im Laufe der Schwangerschaft, immer dünner werdende Plazentaschranke, werden hydrophile Moleküle selektiv gefiltert und potenzielle Schadstoffe aus der Plazenta herausgepumpt. (Lüllmann-Rauch & Asan, 2003)

1.12 Die Plazenta als Stammzellquelle – Vorteile der pMSCs

Die Plazenta könnte als Stammzellressource für MSCs eine wichtige Rolle einnehmen. Durch ständige Geburten mit einem potenziellen postnatalen Verwurf der Plazenta, findet sich eine ausreichende Stammzellquelle. Dabei ist die Stammzellgewinnung, im Gegensatz zu der bmMSC-Gewinnung, nicht-invasiv und birgt damit weniger Konfliktpotenzial für ethische Fragstellungen. Zusätzlich könnten die „fetalen“ Stammzellen, welche sich durch längere Telomere und damit durch eine höhere Teilungsfähigkeit auszeichnen, ein höheres Potenzial zur Gewebsregeneration besitzen und damit eine Sonderstellung einnehmen.

Es wird davon ausgegangen, dass Stammzellen aus der Plazenta eine besondere immunolatorische Funktion mit einer Unterdrückung der T-Zell-Antwort besitzen. Dieses Potenzial könnte man sich für weitere Versuche am Tiermodell (xenogene Transplantation) oder auch für den allogenen Einsatz am Menschen zunutze machen. Klinische Studien zeigen bereits erste Erfolge, indem eine Stammzellinjektion zu einer sehr schwachen Immunantwort und einer verstärkten Gewebsregeration geführt hat. (Winkler et al., 2018)

Zusätzlich könnte die Umgehung des Immunsystems durch Stammzellen der Plazenta, einige wichtige Hinweise für die Tumorforschung geben, in der dieser Mechanismus einen Teil der Tumorentstehung bedingen könnte. Dadurch könnten möglicherweise neue Modelle zur Pharmakotherapietestung und neue Therapiekonzepte entstehen.

Ulrich et.al. konnte zeigen, dass pMSCs ein deutlich geringeres osteogenes Differenzierungspotenzial besitzen als bmMSCs. Dies ist eine Voraussetzung für die Therapie von Muskel- und Weichteildefekten.

1.13 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist, zum einen die Etablierung einer geeigneten Methodik zur MSC-Isolation aus der Plazenta unter der Voraussetzung der Erfüllung der Dominici-Kriterien. Hier sollen im besten Fall zwei verschiedene MSC-Populationen isoliert werden, welche sich durch die Erfüllung der Dominici-Kriterien auszeichnen und sowohl phänotypisch, auf Differenzierungsebene, als auch auf molekular, auf Transkriptionsebene, voneinander unterscheidbar sind. Auf dieser Basis soll die Expression verschiedener Oberflächenmarker miteinander verglichen werden und ein möglicher Einfluss auf die Differenzierungsfähigkeit der Zellen ausgemacht werden. Zusätzlich soll nach neuen Markern zur spezifischen Identifizierung von MSCs aus der Plazenta gesucht werden. Sowohl für Fragestellungen bezüglich der Differenzierung, als auch für die Charaktarisierung wird eine Immunhistochemie zum direkten Vergleich der Oberflächenmolekülexpression der beiden Zellpopulationen durchgeführt.

Des Weiteren wird der Einfluss von GMP- und Lonza-Zellkulturmedium auf die beiden MSC-Fraktionen bezüglich der Zellmorphologie, Proliferationsrate, Oberflächenmolekülexpression und Differenzierungsfähigkeit untersucht. Dies wird unter anderem durch die Durchführung der Durchflusszytometrie und PCR, als auch durch die Induktion verschiedener Differenzierungen der jeweiligen Zelltypen erreicht. Hier soll ein geeignetes Medium zur Zellkultivierung vor der klinischen Stammzellinjektion gefunden werden, welches die MSC-Population nicht in ihrer Differenzierungsfähigkeit bzw. Proliferationsrate beeinflusst, wodurch ein onkogenes Potenzial limitiert wird.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Axiophot	Carl Zeiss Microscopy GmbH
Axiovert 200 M	Carl Zeiss Microscopy GmbH
CB 210 CO2 Brutschrankinkubator	Binder
Centrifuge 5804	Eppendorf
Centrifuge 5424	Eppendorf
Durchflusszytometer LSRII	BD Bioscience
Eppendorf Research plus 0.1-2.5 µL	Eppendorf
Eppendorf Research plus 0.5-10 µL	Eppendorf
Eppendorf Research plus 2-20 µL	Eppendorf
Eppendorf Research plus 10-100 µL	Eppendorf
Eppendorf Research plus 20-200 µL	Eppendorf
Eppendorf Research plus 100-1000 µL	Eppendorf
Küchensieb	
Kühlschrank	Liebherr
Light Cycler 480II	Roche
Magnetrührer Heidolph MR82	Heidolph
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank, Klasse II; MSC-Advantage	Thermo-Scientific
MS1 Probenschüttler	Heidolph DSG 304/M4
Nano Photometer	Implen
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte
Plastikwanne	
Pinzette	Hammacher

Plattenschüttler Heidolph DSG 304/M4	Heidolph Instruments
Primovert	Carl Zeiss Microscopy GmbH
Sauger/Kompressor	Laboport KNF
Tiefkühlschrank; -80°C	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH
Tiefkühlschrank; -20°C	Liebherr Premium
Topf (sterilisiert)	
Uno II PCR Maschine	Biometra
Vortexer Heidolph REAX top	Heidolph Instruments GmbH und CoKG
Wasserbad W12	Preiss Daimler
Zählhilfe	Infactory

2.1.2 Gebrauchsmaterialien

Advantage RT-for-PCR Kit	TaKaRa
Biogel OP-Handschuhe Größe 7	Biogel
Borosilicate Glass 3.3 400 ml	VWR
BD Microlance 3 27G ¾ 0,4 x 19 mm	BD Biosciences
Cellstar Röhrchen 15 ml	Greiner bio-one
Cellstar Röhrchen 50 ml	Greiner bio-one
Cell Strainer 100µm Nylon	Falcon
Cryo Röhrchen Vials	Thermo Scientific
Dako Pen	Dako
Deckgläser	R.Langenbrinck
Dewargefäß	KGW Isotherm
Disposable Hemocytometer Chips Neubauer Improved	NanoEn Tek
Eppendorf Safe-Lock Röhrchen, 0,5ml	Eppendorf

Eppendorf Safe-Lock Röhrchen, 1,5ml	Eppendorf
Eppendorf Safe-Lock Röhrchen, 2ml	Eppendorf
FACS Röhrchen	Polystyrene, BD Falcon
Falcon Tube 15ml	BD
Falcon Tube 50ml	BD
Faltenfilter 595 1/2	Schleicher & Schüll
Feather disponsable Scalpel	Feather
Foliodrape protect selbstklebend 45 x 75 cm	Hartmann
Glasküvetten	
Medical Examination Gloves	ABENA
Messer	S35 Feather, Japan
Micro-Pipettenspitzen (0,5-2µl)	Greiner-bio one
MoliNea Plus Tücher	Hartmann
Nitrile/Powder-Free	Hartmann
Objektträger SuperFrost	R. Langenbrinck
PCR 96 well Platte	Roche
Petrischale 145/20 mm	Greiner bio one
Plastiksprüher	
Pipettenspitzen (100-200 µl)	Greiner bio one
Pipettenspitzen (1000µl)	Greiner bio one
Serological Pipet 2 ml	Falcon
Stripette 5 ml	Costar
Stripette 10 ml	Costar
Stripette 25 ml	Costar
Stripette 50 ml	Costar
Tissue Culture Flask, 250 ml 75 cm2	Falcon
U-40 Insulin 1 ml Luer	BD Bioscience
6 Well Culture Plate	Greiner bio one

2.1.3 Chemikalien und Lösungen

Ampuwa Spüllösung	Fresenius Kabi
Aceton	Merck
Anti-porcine S100A9 + Calprotectin antibody Format: Purified; Clone: MAC387	Abcam Catalog Number: ab22506
Anti-human CD14 antibody Format: FITC; Clone: M5E2	BD Pharmingen Catalog Number: 555397
Anti-human CD34 antibody Format: PE; Clone: 581	BioLegend Catalog Number: 343506
Anti-human CD45 antibody Format: PE; Clone: H130	BioLegend Catalog Number: 304008
Anti-human SushiD2 antibody Format: PE	Miltenyi Biotec Catalog Number: 130-106-325
Anti-porcine CD20 antibody Format: Purified; Clone: MEM-97	Abcam Catalog Number: ab8237
Anti-human CD11c antibody Format: PE; Clone: 3.9	Biolegend Catalog Number: 301605
Anti-human CD3 antibody Format: APC; Clone: UCHT1	BD Bioscience Catalog Number: 561810
Anti-human CD90 antibody Format: FITC; Clone: ASO2	Dianova Catalog Number: DIA-120
Anti-human CD90 antibody Format: PE; Clone: Thy-1A1	R&D Systems Catalog Number: FAB2067P
Anti-human CD146 antibody Format: PE; Clone: 128018	R&D Systems Catalog Number: FAB932P
Anti-human CD271 antibody Format PE; Clone: C40-1457	BD Bioscience Catalog Number: 560927
Anti-human CD276 antibody Format: Purified	Abcam Catalog Number: Ab226256
Anti-human CD276 antibody Format: PE; Clone: MIH42	BioLegend Catalog Number: 351004

Anti-human NG2 antibody Format: Cy3	Santa Cruz Biotech
Anti-human CD105 antibody Format: Purified; Clone: 266	BD Bioscience Catalog Number: 555690
Anti-human CD105 antibody Format: FITC; Clone SN6	BioRad Catalog Number: MCA1557F
Anti-human CD73 antibody Format: Purified; Clone: AD2	Biolegend Catalog Number: 344002
Anti-human CD73 antibody Format: PE; Clone: AD2	BD Pharmingen Catalog Number: 550257
Amphothericin B solution	Sigma
Accutase solution	Sigma
Ampicillin sodium salt (100µg/10ml)	USB US11259
L-Ascorbinsäure 50 mM	Sigma
Alizarin Rot S	Sigma
Bovine Serum Albumin 25%	Gibco
Braunol	Braun
Beta-Glycerophosphat 1M	Sigma
Beta-Mercaptoethanol	AppliChem
BioWhittaker L-Glutamine 200mM (17-605C)	Lonza
Collagenase (750 U/ml) C9407	Sigma
CD146 - Primer	MWG
CD276 - Primer	MWG
Dako-antibody diluent	Dako
Donkey-anti-mouse F(ab`) 2 Format: Alexa Fluor 488	Abcam Catalog Number: ab181289
Donkey Serum	Jackson Immuno Research 017000121
Dispase II (250µg/ml)	Roche

04942078001	
Dimethylsulfoxide	Sigma
Dexamethasone, 1mM	Sigma
Ethanol absolute p.A.	PanReac AppliChem
Fibrinogen	Baxter
FBS Superior	Biochrom GmbH
Formaldehydlösung 35%	Roth 4980
Gamunex 10%	Grifols Deutschland GmbH
Glycerinaldyhyd-3-phosphat-Dehydrogenase – GAP-DH	Biomol VHPS3541
Gentamycin	Biochrom GmbH
Goat-anti-mouse antibody Format: Cy3	Jackson/Dianova Catalog Number: 115165166
Goat-anti-rabbit antibody Format: Cy3	Jackson Immunoresearch 111-165-048
Goat Serum	Sigma
Heparin Natriumsalz 1000 IE/ml	Roth
Humanes Serum (zentrifug.: 30 min, 3000g)	Blutbank des UKT
Indomethacin 25 mM	Sigma
Insulin solution human	Sigma
Isopropanol	Merck
3-Isobutylxanthin 50mM	Sigma
Methanol	VWR International
Mouse-anti-pig CD 45 antibody Format: FITC; Clone: K252.1 E4	Bio-Rad AbD-Serotec Catalog Number: MCA1222GA
Mouse-anti-human CD 14 antibody Format: FITC; Clone: TüK4	Bio-Rad AbD-Serotec Catalog Number: MCA1468F
Mouse-anti-pig CD3 antibody Format: Purified; Clone: PPT3	Bio-Rad AbD-Serotec Catalog Number: MCA 5951GA
Mouse-anti-human CD56 antibody	Biolegend

Format: PE; Clone: MEM-188	Catalog Number: 305606
Mouse-anti-human CD56 antibody Format: FITC; Clone: 123C3	Arcis Catalog Number: 304606
Mounting Medium with Dapi	Vectashield
NaCl 0,85%	
Natriumcarbonat wasserfrei	Merck
Oil Red O	Sigma
Percoll	Sigma
Penicillin – 10.000 U/ml	Gibco
Plättchenlysat (zentrifug.: 30 min, 3000g)	Blutbank des UKT
Pepdidylprolylisomerase - PPIA	Biomol CHPS1
QuantiTect Primer Assay Position 70 Hs_TAGLN_2_SG	Qiagen
RNase-Free DNase Set (50)	Qiagen
RNeasy Mini Kit (250)	Qiagen
Silbernitrat	Roth
Sodium Thiosulfate	Sigma
Streptomycin 10.000 µg/ml	Gibco
SushiD2- Primer	MWG
SYBR-Green	Roche
Tetracyclin - Hydrochlorid (200µg/10ml)	USB – USB22105
Tissue Tek	Sakura, Niederlande
Thrombin	Baxter
Trypan Blue 0,4%	Lonza
Trypsin-EDTA Solution 0,05%	Sigma
Tylosin solution	Sigma

2.1.4 Puffer und Medien

GMP Kulturmedium:	
- Dulbecco´s Modified Eagle Medium low glucose (D5546) DMEM LG (1 g/l)	Sigma
- 1000 IE Heparin-Na	Roth
- 2 mM L-Glutamin	
- 5% humanes Blutplasma	Blutbank UKT
- 5% humanes Thrombozytenkonzentrat	Blutbank UKT
- 2% Penicillin/Streptomycin	Gibco
- 1% Fungicide	Sigma
GMP Mangelmedium:	
- Dulbecco´s Modified Eagle Medium low glucose (D5546) DMEM LG (1 g/l)	Sigma
- 2 mM L-Glutamin	Roth
- 0,1% humanes Blutplasma	Blutbank UKT
- 0,1% humanes Thrombozytenkonzentrat	Blutbank UKT
- 2% Penicillin/Streptomycin	Gibco
- 1% Fungicide	Sigma
Lonza Zellkulturmedium:	
- MSCGM™ Mesenchymal Stem Cell Growth Medium BulletKit™	Lonza
Adipogenes Induktionsmedium:	
- Dulbecco´s Modified Eagle Medium high glucose DMEM HG (4,5 g/l)	Sigma
- 10% FCS	Biochrom GmbH
- 2% Penicillin/Streptomycin	Gibco

- 1,2 % Fungicide - 0,01 mg/ml Insulin - 0,1 mM Indomethacin - 0,5 mM 3-Isobutylxanthin - 1 µM Dexamethason	Sigma Sigma Sigma Sigma Sigma
Osteogenes Induktionsmedium: - Dulbecco´s Modified Eagle Medium high glucose (4,5 g/L D-Glucose, L-Glytamine, Pyruvat) DMEM HG - 10% FCS - 2% Penicillin/Streptomycin - 1,2% Fungicide - 1 µM Dexamethason - 10 mM beta-Glycerophosphat - 50 µM L-Ascorbinsäure	 Sigma Gibco Biochrom GmbH Gibco Sigma Sigma Sigma Sigma
Einfriermedium: - 50% GMP- oder Lonza-Kulturmedium - 40% FCS - 10% DMSO	 Biochrom GmbH Sigma
Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline DPBS (D8537)	Lonza
Hank`s balanced Salt Solution HBSS (H8264)	Sigma
HEPES Buffer Solution (H3662)	Sigma
PBS Tablets	Gibco
PFEA-Puffer: - PBS - 2% FCS - 2 mM EDTA - 0,01% Natriumazid	 Lonza Biochrom GmbH Sigma-Aldrich Merck

2.2 Methoden

2.2.1 Isolation humaner pf-MSCs nach Gorodetzky

Die verwendete Methodik zur Isolation fetaler MSCs erfolgte äquivalent zur Methodik von Prof. Raphael Gorodesky der „School of Medicine-Researchers-Hadassah“ der Universität Jerusalem. Deshalb wurden in dieser Arbeit die fetalen MSCs, unabhängig von der verwendeten Methodik, als „Goro“ bezeichnet.

Die Gewinnung der humanen Plazenten, erfolgte in enger Kooperation mit der Universitätsfrauenklinik der Eberhardt-Karls-Universität Tübingen unter vorheriger schriftlicher Zustimmung der Spenderinnen und Prüfung durch die Ethikkommission der Universität (Ethikvotum: 365/2018BO2 vom 02.05.2018). Aus Gründen der Sterilität und zum Zweck des Kontaminationsschutzes, wurden ausschließlich die Plazenten von durch Kaiserschnitte geborenen Kindern verwendet.

Die Plazenta wurde unverzüglich nach der Entnahme in ein steriles Gefäß überführt. Es folgte eine direkte Isolation der fetalen MSCs nach folgender Methodik:

Zunächst wurde die Plazenta unter der Sterilbank in eine mit 70% EtOH gesäuberten und mit UV-Licht bestrahlten Plastikwanne überführt. Anschließend wurde die Nabelschnur abgeschnitten und die Amnionmembran manuell entfernt. Eine weißlich schimmernde Schicht, die äußere Chorionschicht der fetalen Plazenta kam zum Vorschein.



Abbildung 10: Darstellung der äußeren Chorionschicht der humanen Plazenta nach Ablösen der Amnionmembran

Aus dieser Schicht wurden nun vorsichtig je zwei 2 x 2 cm große Stücke herausgetrennt, wichtig war hierbei, dass möglichst nur die weiße Schicht isoliert wurde.

Die Gewebestücke wurden jeweils mit 10% Pen/Strep PBS in einer Petrischale gespült und das überschüssige Gewebe mit einem Skalpell abgeschabt. Nun überführten wir beide Proben in jeweils ein 50 ml Falcon und wuschen diese zwei Mal mit 10% Pen/Strep PBS. Anschließend erfolgte die Zugabe der Gewebestücke zu 10 ml Trypsin/EDTA um durch Proteolyse der extrazellulären Matrix, Platz für stromales Wachstum zu schaffen. Die Proben wurden für 15 Minuten bei 37°C auf dem Schüttler im Brutschrank inkubiert (5% CO_2).

Das Gewebe wurde nach der Inkubation in eine Petrischale überführt und mit dem Skalpell in maximal 1 mm^2 große Stücke geschnitten. Dann wurden die Gewebestücke in jeweils ein 100 µm Zellsieb überführt und mit 10% Pen/Strep PBS gespült, um Spaltprodukte und die sich vom Gewebe abgelösten Zellen auszuwaschen.

Um die Haftung des Gewebes auf den 6-Well-Platten zu ermöglichen, wurden die Gewebestücke in 5ml Fibrinogen (im 50ml Falcon) resuspendiert und

anschließend weitläufig auf jeweils eine 6-Well-Platte verteilt (siehe Abb.11). Überschüssiges Fibrinogen wurde vorsichtig abgesaugt und Thrombin wurde mit einer Pipette auf die Gewebestücke gegeben. Anschließend wurde dieses vorsichtig abgesaugt. Durch Interaktion der beiden Moleküle bildete sich Fibrin, wodurch die Gewebestücke haften blieben. Es folgte eine 30 minütige Inkubation, bis die Gewebestücke und das Fibrin angetrocknet waren.

Nach der Inkubation folgte die Zugabe des jeweiligen Mediums. In diesem Fall zum einen, 25 mM DMEM Low Glucose (Sigma) mit HEPES 1M (Sigma), 2% Pen/Strep, 1% Fungizone, 1% Glutamin (2mM von Lonza) und zum anderen das klassische Lonza-Medium für MSCs.

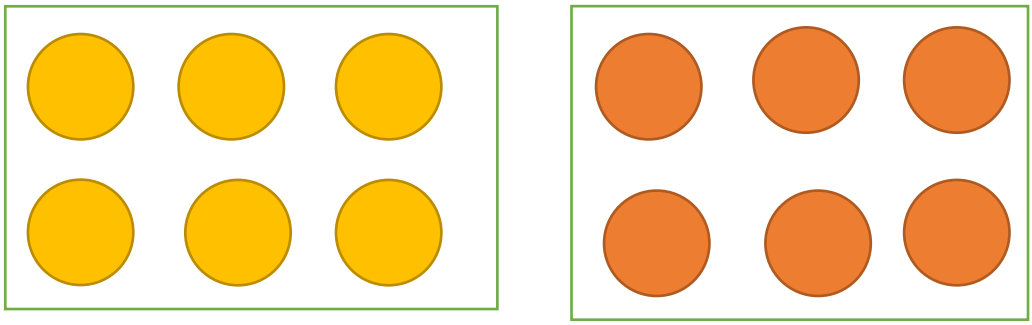


Abbildung 11: Schematische Abbildung der verschiedenen 6-Well-Platten; gelb: GMP-Medium; orange: Lonza-Medium

Aufgrund einer Kontaminationsproblematik der Zellkulturen Goro Pl 01-19, Goro Pl 02-19, Goro Pl 03-19 und Goro Pl 04-19 wurden in den folgenden Isolationen sowohl das Thrombin als auch das Fibrinogen steril filtriert und die hygienischen Bedingungen durch Nutzung von sterilen Handschuhen und sterilen Tüchern optimiert. Die Kultur Goro Pl 01-19, Goro Pl 02-19, Goro Pl 03-19 und Goro Pl 04-19 wurden trotz regelmäßigem Spülen mit PBS und Zugabe von 1% Gentamycin und Tylosin, aufgrund der fortbestehenden Kontamination, verworfen.

In den folgenden Kapiteln werden die entsprechenden methodischen Abwandlungen beschrieben.

2.2.2 Isolation humaner pfMSCs durch Enzymverdau

Die ersten Schritte der Stammzellisolation der Kulturen Goro Pl 05-10, Goro Pl 06-19 und Goro Pl 07-19 erfolgten äquivalent zur in Kapitel 2.2.1 beschriebenen Methodik.

Abweichend hiervon wurden zur Zellkultivierung die, durch den Trypsin/EDTA-Enzymverdau gelösten, Stammzellen verwendet. Hierfür wurden die Gewebestücke durch ein 100µm Zellsieb geschüttet und mit 10% Pen/Strep PBS gespült. Die aus dem Enzymverdau gelösten Zellen wurden nun zusammen mit der Spüllösung (10% P/S PBS) im 50ml Falcon aufgefangen und anschließend scharf abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in jeweils 6 ml Medium (GMP +PLL/S+ P/S/G/T oder Lonza + G/T) resuspendiert.

Die 6-Well-Platte wurde folgendermaßen vorbereitet:

Zunächst wurden jeweils 0,5 ml Fibrinogen auf jedes Well pipettiert, gleichmäßig verteilt und anschließend der Überstand abgesaugt. Zum Trocknen wurde die 6-Well-Platte für ca. 5 Minuten im Brutschrank bei 37°C (5% CO_2) inkubiert. Anschließend wurde jeweils 0,5 ml Thrombin auf jedes Well gegeben, gleichmäßig verteilt, überschüssiges Material abgesaugt und wieder für 5 Minuten im Inkubator getrocknet. Durch Wechselwirkungen der beiden Moleküle entstand nun Fibrin, welches eine Matrix für das Stammzellwachstum bieten sollte.

Nun wurden jeweils 2ml der in Medium resuspendierten Stammzellen nach folgendem Schema (Abb. 12) auf die Matrix gegeben. Die Zellen wurden für einige Tage im 37°C (5% CO_2) Brutschrank kultiviert.

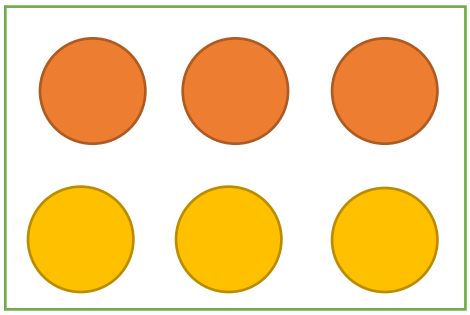


Abbildung 12: Schematische Darstellung einer 6-well-Platte; orange: Zugabe 2 ml Lonzamedium, gelb: Zugabe 2 ml GMP-Medium

Bei der Kultivierung der Gewebestücke der Zelllinien Goro Pl 05-19 und Goro Pl 06-19 nach Gorodetsky war nach einer Inkubationszeit von 5-7 Tagen bakterielles Wachstum mikroskopisch sichtbar. Trotz Zugabe von 1% Gentamycin/Tylosin, ergab sich keine Besserung der Kontaminationsproblematik in den Kulturen. Es folgte die Abnahme von je 200 µl Medium/well und eine separate Inkubation auf einer 6-well-Platte zur Klärung der Kontaminationsproblematik.

Zusätzlich wurde 20µl Ampicillin/Tetracyclin pro well, den Zellkulturen Goro Pl 05-19 und Goro Pl 06-19 zugegeben. Danach zeigte sich eine kurzfristige Minderung der bakteriellen Besiedlung am 1. Tag nach der Zugabe. Im weiteren Verlauf war allerdings ein Fortbestand der bakteriellen Besiedlung zu verzeichnen. Es folgte eine Testung auf Mycoplasmen, welche negativ ausfiel.

Aufgrund der Zugabe einer großen Bandbreite an Antibiotika, Fungizone und einer daraus resultierenden Multiresistenz der besiedelnden Bakterien, wurden die Kulturen am 10. bzw. 12. Tag nach der Isolation verworfen.

Die Isolation der Kultur Goro Pl 07-19 erfolgte mit einer zusätzlichen Protokolländerung, welche die Desinfektion der isolierten Gewebestücke, nach dem Waschschritt mit 10% P/S PBS, mit Braunol beinhaltete. Hierbei wurden die Gewebestücke jeweils 5 Minuten in 100% Braunol, 50% Braunol/PBS und PBS gebadet und anschließend wie in Kapitel 2.2.1 mit Trypsin/EDTA verdaut. Als Medium wurde GMP+S/PLL+A/T und Lonza + A/T verwendet.

Da auch hier bakterielles Wachstum weiterhin bestand, folgte der Verwurf der Kultur Goro Pl 07-19.

2.2.3 Isolation humaner pfMSCs/pmMSCs

Aufgrund der oben beschriebenen Kontaminationsproblematik, erfolgte die Isolation nach einem abgewandelten Protokoll nach Pilz/Ulrich zur Isolation der fetalen MSC-Fraktion aus der äußeren Chorionschicht. Zusätzlich erfolgte die Isolation der maternalen MSC-Fraktion aus Anteilen der Deziduaplatte und dem intervillösen Raum.

Hierzu wurde die Plazenta in eine Plastikschale unter der Sterilbank überführt, die Nabelschnur entfernt und die Amnionmembran abgezogen. Zur Isolation der fetalen Zellen wurde die äußere Chroionschicht vorsichtig vom restlichen Gewebe, mithilfe einer Pinzette und eines Skalpells, abgetrennt und in eine große Petrischale überführt.

Zur Isolation der maternalen Zellen wurden jeweils zwei ca. 5 x 5 cm großen Stücke des restlichen Plazentagewebes herausgelöst und in jeweils eine große Petrischale gegeben.

Alle Gewebestücke wurden nun zweimal mit HBSS gewaschen, wichtig war hier, dass das rote maternale Gewebe vollständig von der äußeren Chorionmembran getrennt wurde, um im Folgenden beide Fraktionen miteinander vergleichen zu können.

Mithilfe von zwei Skalpellen wurden die verschiedenen Gewebestücke unter strikter Trennung zu einem Gewebebrei in einer großen Petrischale mit etwas HBSS zerkleinert. Der Gewebebrei wurde in jeweils ein 50 ml Falcon überführt und mit HBSS + 1% Pen/Strep auf 45 ml aufgefüllt. Es folgte die Zentrifugation bei 500 rpm für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde abgeschüttet und die Falcons wurden erneut mit HBSS + 1% Pen/Strep auf 45 ml aufgefüllt. Es folgte eine weitere Zentrifugation bei 700 rpm für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde erneut abgeschüttet und es wurde nochmals mit HBSS + 1% Pen/Strep auf 45 ml aufgefüllt und für 5 Minuten bei 1000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert.

Nach Abschütten des Überstands, wurde der Gewebebrei auf ca. 20 ml/Tube umverteilt und die Verdaulösung (HBSS-Verdau) bis zur 40 ml Marke hinzugegeben und invertiert. Es folgte eine einstündige Inkubation im 37°C 5% CO_2 Brutschrank. Alle 15 Minuten wurde invertiert. Anschließend wurde der Verdau mit je 10 ml FCS abgestoppt und das Gewebe durch ein feinmaschiges Küchensieb gegeben, um die Gewebestück zurück zu halten. Zurück blieb die in einer großen Petrischale aufgefangene Zellsuspension von welcher nun jeweils 30 ml auf 15 ml Ficoll (1,077 g/l) im 50 ml Tube gegeben wurden. Das vorgelegte Ficoll wurde nun bei 470 g für 20 Minuten bei Raumtemperatur ohne Bremse und ohne Beschleunigung zentrifugiert. Die Interphase wurde abgenommen und in ein Falcon überführt. Die Falcons wurden mit PBS auf 45 ml aufgefüllt und bei 1500 rpm für 7 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Pellets in je 10 ml PBS resuspendiert und auf je 2 Falcons pro Zelltyp (maternal vs. fetal) verteilt.

Die Falcons wurden anschließend mit PBS auf 45 ml aufgefüllt und bei 1500 rpm für 7 Minuten bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die maternalen Pellets in je 6 ml Medium (GMP + PLL/S + G/T oder Lonza + G/T) und die fetalen Pellets in je 2 ml Medium (GMP + PLL/S + G/T oder Lonza + G/T) resuspendiert.

In den Zellkulturflaschen wurde jeweils 8 ml Medium vorgelegt. Es folgte die Zugabe von je 2 ml Zellsuspension, sodass sich in der Primärkultur aufgrund von unterschiedlichen Gewebemengen eine Flasche fetale pMSCs in GMP+S/PLL+G/T, eine Flasche fetale pMSCs in Lonza + G/T, drei Flaschen maternale pMSCs in GMP+S/PLL+G/T und drei Flaschen maternale pMSCs in Lonza + G/T isolieren ließen.

Die Inkubation erfolgte bei 37° C im 5% CO_2-Brutschrank. Wichtig war ein vollständiger Mediumwechsel ca. 24 Stunden nach Gewebeisolation, um die Menge an Erythrocyten in der Primärkultur zu reduzieren, welche durch ihren schnelleren Stoffwechsel die MSCs an ihrer Proliferation hindern.

2.2.4 Zellkultur

2.2.4.1 Zellkultur humaner pfMSCs nach Gorodetzky

Die Zellkultur der Gewebestücke erfolgte zum einen in GMP + S/PLL, als auch in Lonza-Medium mit je 5 ml Medium/well. Der Mediumwechsel erfolgte alle 3-4 Tage und die Inkubation bei 37 °C im 5% CO_2 Brutschrank.

2.2.4.2 Zellkultur humaner pfMSCs nach Enzymverdau

Die Zellkultur der Durchflussfraktion erfolgte analog zu Kapitel 2.2.4.1 in GMP + S/PLL, als auch in Lonza-Medium mit je 5 ml Medium/well. Der Mediumwechsel erfolgte alle 3-4 Tage und die Inkubation bei 37°C im 5 % CO_2 Brutschrank.

2.2.4.3 Zellkultur humaner pfMSCs/pmMSCs

Die Kultivierung der fetalen und maternalen Zellen erfolgte in T75 Flaschen mit je 10 ml Medium (GMP + S/PLL + G/T oder Lonza + G/T). Aufgrund der oben beschriebenen Kontaminationsproblematik wurde prophylaktisch je 500 µl Gentamycin und 500 µl Tylosin zu 500 ml Medium zugesetzt. Der Mediumwechsel erfolgte alle 3-4 Tage. Die Zellen wurden bei 37 °C im 5 % CO_2 Brutschrank inkubiert.

2.2.4.4 Passage der pfMSCs/pmMSCs

Die Passage erfolgte bei 70- 80%iger Konfluenz der Primärkultur, am 13.-14. Tag nach der Zellisolation. Hierzu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 5-10 ml PBS (w/o Ca^{2+}/Mg^{2+}) gewaschen. Das PBS wurde abgesaugt und 3 ml 0,05 % Trypsin-EDTA zum Ablösen der Zellen hinzugegeben. Zur optimalen Aktivierung der enzymatischen Spaltung wurden die Flaschen nun für 3-5 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Sicherstellen der Zellablösung durch eine Kontrolle am Lichtmikroskop wurde der enzymatische Verdau mit jeweils 3 ml des jeweiigen Mediums abgestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Falcon überführt und bei RT, 1500 rpm für 7 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 10 ml Medium resuspendiert.

Anschließend folgte die Zellzählung mithilfe der Neubauer-Zählkammer. Dazu wurde die Zellsuspension homogenisiert und anschließend 20 µl dieser Suspension 1:1 mit Trypanblau gemischt. Beide Zählkammern (A und B)

wurden anschließend befüllt und die vier äußeren Eckquadrate nach dem ,,L-Prinzip“ ausgezählt. Die Berechnung der Zellkonzentration erfolgte nach folgender Formel:

$$\frac{Mittelwert\ der\ ausgezählten\ Zellen\ (A\ und\ B)}{2\ (Verdünnung)} = Anzal\ x\ 10^4\ Zellen/ml$$

Aufgrund der Verdünnung mit Trypanblau wurde der Mittelwert durch zwei dividiert. Es wurden 1,5 x 10^5 Zellen pro Flasche ausgesäht und in jeweils 10 ml Medium inkubiert. Die Zellkultur in der 1. Passage erfolgte bis zu einer 70-80%igen Konfluenz. Dabei wurden, zusätzlich zur Zellaussaat in T75-Zellkulturflaschen (1,5 x 10^5 Zellen/Fl.), Zellen für die anschließende Differenzierung auf jeweils einer 6-well Platte (5 x 10^4 Zellen/well) ausgesäht.

2.2.4.5 Einfrieren der pfMSCs/pmMSCs

Die Zellen wurden in der 2. Passage wie in Kapitel 2.2.4.4 beschrieben abgelöst und anschließend, im entsprechenden - 4°C kaltem Einfriermedium (50% Medium, 40 % FCS und 10% DMSO), resuspendiert. Jeweils 1,5 ml Zellsuspension wurden auf ein vorgekühltes Kryotube verteilt. Dabei entsprach die Zellmenge eines Kryotubes der Zellmenge einer T75-Zellkulturflasche. Die gefüllten Tubes wurden bei -70°C eingefroren.

2.2.4.6 Bestimmung der Proliferationsrate

Zur Quantifizierung des Zellwachstums in den verschiedenen Medien, wurde mit folgender Formel die Duplikationsrate bestimmt:

$$\text{Duplikationsrate} = \frac{(log10\left(\frac{N1}{N2}\right))/log10}{d}$$

N1 : Zellen zu Beginn der 1. Passage (1,5 x 10^5 Zellen)

N2 : Zellen am Ende der 1. Passage

d : Tage der Kultivierung in der 1. Passage

Die Duplikationsraten zwischen dem Lonza und GMP-Medium wurden innerhalb der verschiedenen Zellfraktionen, also pfMSCs und pmMSCs verglichen. Es wurde ein T-Test zur Ermittlung der Signifikanz durchgeführt.

2.2.5 Differenzierung der pf-MSCs

Die Aussaat der Zellen erfolgte, wie in Kapitel 2.2.4.4 beschrieben, in der 2. Passage mit 5 x 10^4 Zellen/Well. Bei einer Konfluenz von 70% erfolgte die Zugabe des jeweiligen Differenzierungsmediums. Der Mediumwechsel erfolgte alle 3-4 Tage.

Zur Negativkontrolle wurden zwei Wells mit jeweils 2 ml Mangelmedium befüllt.

<u>Mangelmedium:</u>

- DMEM low glucose (Sigma)
- 12,5 ml HEPES 1 M (Sigma)
- 1 ml Heparin 1000 IE
- 5 ml Glutamin 2 mM (Lonza)
- 5 ml Pen/Strep
- 500 µl Fresh Frozen Plasma
- 500 µl Thrombozytenkonzentrat

Osteogene Differenzierung:

Jeweils 2 Wells der 6-well-Platte wurden mit je 2 ml des osteogenen Differenzierungsmediums befüllt.

Osteogenes Differenzierungsmedium:

- DMEM high glucose (4,5 g/l)
- 10 % FCS
- 0,1 µM Dexamethason
- 10 mM β-Glycerophosphat
- Pen/Strep
- Fungizone
- 0,17 mM L-Ascorbinsäure

Die Anfärbung der von Osteoblasten gebildeten Kalziumpräzipitate erfolgte zuächst nach einer 3-wöchigen Differenzierungszeit. Nach Feststellung einer frühzeitigen Zellablösung in der maternalen GMP-Fraktion in der osteogenen Differenzierung, wurde die Differenzierungszeit auf 2 Wochen verkürzt.

Die Anfärbung erfolgte mit der Von-Kossa-Färbung. Dabei wurde jeweils ein Well der osteogenen Differenzierung und ein Well des Mangelmediums zur Negativkontrolle gefärbt.

Von-Kossa-Färbung:

- Medium mit Pipette absaugen
- Fixation mit eiskaltem Methanol (-20°C) für 5 Minuten bei RT
- Absaugen mit Pipette
- 2 x waschen mit Aqua dest.
- Absaugen mit Pipette
- Zugabe 1 ml 5% Silbernitratlösung/Well
- Inkubation bei RT für 1 h im Dunkeln
- Absaugen mit Pipette
- 2 x waschen mit Aqua dest.
- Reduktion mit 1 ml Natriumcarbonat/Well
- Inkubation bei RT für 2 Minuten

- Absaugen mit Pipette
- 2 x waschen mit Aqua dest.
- Zugabe 1 ml Natriumthiosulfat/Well
- Inkubation für 2 Minuten
- Absaugen mit Pipette
- 2 x waschen mit Aqua dest
- Zugabe 2 ml Aqua dest

Anschließend erfolgt die qualitative Auswertung am Lichtmikroskop.

Adipogene Differenzierung:

Jeweils 2 Wells der 6-well-Platte werden mit je 2 ml des adipogenen Differenzierungsmediums befüllt.

Adipogenes Differenzierungsmedium:

- DMEM high glucose (4,5 g/l)
- 10 % FCS
- 1µM Dexmethason
- Pen/Strep
- Fungizone
- 0,1 mM Indomethazin
- 0,01 mg/ml Insulin
- 0,5 mM 3-Isobutylxanthin

Die Anfärbung der durch Adipozyten gebildeten Lipidvesikel erfolgte zunächst nach einer 3-wöchigen Differenzierungszeit. Aufgrund der frühzeitigen Zellablösung im osteogenen Differenzierungsmedium wurde die Differenzierungszeit auf 2 Wochen verkürzt.

Die Anfärbung erfolgte mit der Oil Red Färbung, dabei wurde jeweils ein Well der adipogenen Differenzierung und ein Well welchem zuvor Mangelmedlium zugesetzt wurde zur Negativkontrolle gefärbt.

Oil-Red-Färbung:

- Medium mit Pipette absaugen
- Zugabe 1 ml Oil-Red-Färbelösung/well
- Inkubation bei RT für 30 Minuten
- Absaugen mit Pipette
- Zugabe 2 ml PBS/well
- Inkubation bei RT für 30 Min
- Absaugen mit Pipette
- Zugabe 2 ml PBS/well

Anschließend erfolgte die qualitative Auswertung am Lichtmikroskop.

2.2.6 *Durchflusszytometrie*

Die Durchflusszytometrie dient der Charakterisierung von Oberflächenmarkern der jeweiligen Zelle. Hier werden die entsprechenden Marker mithilfe von floureszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern quantitativ nachgewiesen.

Dazu wurden die Zellen zunächst bei 70-80%iger Konfluenz mit PBS gewaschen, mit Accutase (3 ml, 12 Min., 37°C) abgelöst, abzentrifugiert (7°C, 1500 rpm, 7 Min.) und das Zellpellet in PFEA-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden je 1,5 ml der Zellsuspension auf 2 ml Eppendorfcups verteilt und für 4 Minuten bei 300 g (= 300 rcf) abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und 50 µl Gamunex (1:20 in PBS verdünnt) hinzugegeben und resuspendiert. Es folgte eine 20-minütige Inkubation bei 4°C im Dunkeln. Anschließend wurde jeweils 1 ml PFEA-Puffer hinzugegeben und resuspendiert. Für 4 Minuten wurde bei 300 g (= 0,3 rcf) abzentrifugiert und der Überstand anschließend dekantiert.

Jeweils 50 µl Antikörperlösung pro Probe wurde zugegeben (siehe Tabelle 1). Zusätzlich erfolgte die Zugabe von 50µl PFEA-Puffer als Kontrolle. Die Proben wurden bei 4°C für 20 Minuten im Dunkeln inkubiert und anschließen für 4

Minuten bei 300 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet in jeweils 300 µl PFEA-Puffer resuspendiert und in ein Durchflusszytometrieröhrchen überführt.

Reagenz	Markierung	Firma	Katalognummer	Klon	Verdünnung mit PFEA-Puffer
CD 73	PE	BD Pharmingen	550257	AD2	2/5
CD 90	PE	R&D Systems	FAB2067P	Thy-1A1	1/5
CD 105	FITC	BioRad	MCA1557F	SN6	1/5
CD 14	FITC	BD Pharmingen	555397	M5E2	1/5
CD 34	PE	BioLegend	343506	581	1/10
CD 45	PE	BioLegend	304008	H130	8,35/50
CD 146	PE	R&D Systems	FAB932P	128018	1/5
SushiD2	PE	Miltenyi Biotec	130-106-325		1/10
CD 276	PE	BioLegend	351004	MIH42	1/20

Tabelle 1: Verwendete Antikörper in der Durchflusszytometrie; FITC= Fluroeszeinisothiocyanath; PE= R-Phycoerithrin

Floureszenzfarbstoff	Exzitationsmaximum $[nm]$	Emmissionsmaximum $[nm]$
FITC	495	520
PE	564/495	576

Tabelle 2: Emissionsspektren der Fluorochrommoleküle, FITC=Fluroeszeinisothiocyanath; PE=R-Phycoerythrin

Die Durchflusszytometrie wurde mithilfe des Durchflusszytometers LSR II der Firma BD Bioscience und der FACS Diva Software (BD Bioscience, USA) durchgeführt. Die Datenauswertung erfolgte mit der Flow Jo Software der Firma Tree Star, USA.

Bei der Messung im Durchflusszytometer wurde jede Zelle nacheinander durch eine Mikrokanalküvette geführt und im Messbereich mit einem Laser bestrahlt. Die entsprechende Lichtbeugung im flachen Winkel (forward scatter = FSC) und die Lichtbrechung im rechten Winkel (side scatter = SSC) wurde anschließend detektiert. Die Lichtbeugung ist abhängig vom Zellvolumen, die Lichtbrechung abhängig von der Zellgranularität, der Zellkerngröße und –struktur und der intrazellulären Vesikelmenge.

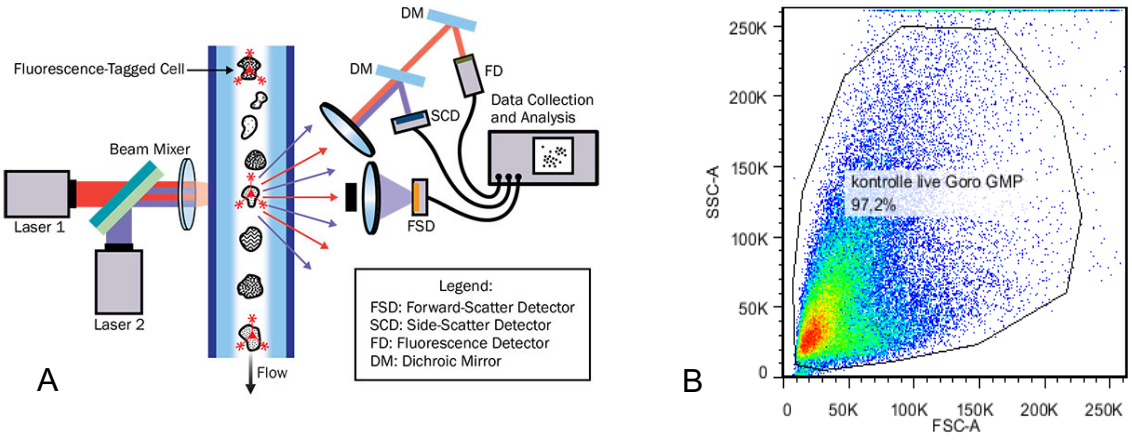


Abbildung 13: Durchflusszytometie; A: vereinfachtes Schema der Durchflusszytometrie; Quelle: photonics.com; B: Dot Plot FSC/SSC der Live Kontrolle PI 08-19 Goro GMP

Bindet ein floureszenzmarkierter Antikörper an einem Oberflächenmolekül, werden die Floureszenzsignale detektiert. Dies zeigt sich in einem Shift im Zellpopulationspeak.

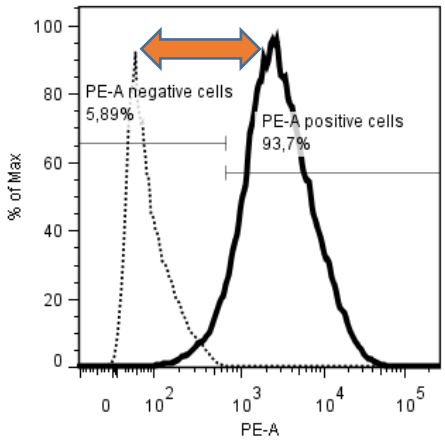


Abbildung 14: Durchflusszytometrie; exemplarischer Zellpopulationspeakshift (orange) der PI 08-19 pfMSCs im GMP-Medium

2.2.7 Quantitative RT-PCR

Die quantitative RT-PCR beruht auf der herkömmlichen Methodik zur DNA-Vervielfältigung, der PCR. Diese besteht aus folgenden drei Schritten:

1. Denaturierung (94-96°C): Aufbrechen der Wasserstoffbrücken, die DNA liegt nun als Einzelstrang vor.
2. Primerhybridisierung (55-65°C): Primeranlangerung
3. Elongation (68-72°C): Bildung eines komplementären DNA-Strangs durch die Taq-Polymerase

Die Quantifizierung erfolgte mittels Fluoreszenzmessung am Ende von 39 durchlaufenen Zyklen (exponentielle Phase).

Lyse der Zellen

Um die RNA extrahieren zu können müssen die Zellen zunächst lysiert werden. Dazu wurde jeweils eine T75-Zellkulturflasche pro Zelltyp (fetal/maternal) pro Medium (Lonza/GMP) in der 1. Passage bei 70%iger Konfluenz lysiert. Zunächst wurde der Überstand abgenommen und die Zellen zweimal mit 5 ml PBS gewaschen. Anschließend wurde 3 ml Trypsin/EDTA hinzugegeben und für 3-5 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach, mikroskopisch gesicherter, Zellablösung wurde der enzymatische Vorgang durch Zugabe von 3 ml Medium abgestoppt und die Zellsuspension in ein 15 ml Falcon überführt. Es folgte die Zentrifugation bei 1500 rpm für 7 Minuten bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit 10 ml eiskaltem (-4°C) PBS gewaschen. Es folgte eine weitere Zentrifugation und die Abnahme des Überstands. Zur Lyse der Zellen wurde nun 350 µl RLT-Puffer mit β- Mercaptoethanol (10 ml RLT-Puffer + 100 µl β- Mercaptoethanol) hinzugegeben und resuspendiert. Das Lysat wurde bei -70°C gelagert.

RNA-Extraktion

Zur RNA-Extraktion wurde das RNeasy mini kit von Qiagen verwendet. Zunächst wurde 350 µl von 70%igem Ethanol zur Zellsuspension hinzugegeben, mit einer Spritze gründlich homogenisiert und die Suspension in die Säule (RNeasy Mini Spin column; Qiagen) überführt. Die Säule wurde anschließend bei 10.000 rpm für 15 Sekunden zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Nun folgte die Zugabe von 350 µl des RW1-Waschpuffers auf die Säule und eine weitere Zentrifugation und der Verwurf des Durchflusses. Im nächsten Schritt wurden 80 µl DNasegemisch (10µl RNasefreie DNase + 70µl RDD-Puffer) auf die Säule gegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 350 µl des RW1-Puffer hinzugegeben. Es folgte eine Zentrifugation und der Verwurf des Durchflusses. Es wurden im Folgenden 500 µl RPE-Puffer auf die Säule gegeben, zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Dieser Schritt wurde wiederholt, die Zentrifugationszeit auf 2 Minuten verlängert und der Durchfluss verworfen. Die Säule wurde nun zum Trocknen für 15 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert. Zum Ablösen, der sich

nun in der Säule befindlichen RNA, wurde zuletzt 40 µl RNasefreies Wasser auf die Säule gegeben und für 1 Minute bei 10.000 rpm zentrifugiert. Im Durchfluss war nun RNA enthalten, welche bei – 70°C gelagert wurde.

Messung der RNA-Ausbeute

Die Messung der RNA-Ausbeute erfolgte mittels Spektralphotometrie mit dem Nano-Photometer der Firma Implen. Sie beruht darauf, dass die Basen ein Absorptionsspektrum von 230 – 320 nm, mit einem Absorptionsmaximum von 260 nm, aufweisen. Durch Messung der jeweiligen Absorption (A260) kann die RNA-Konzentration der Proben mit folgender Formel berechnet werden:

$$C\ [\mu g/ml] = A260 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Extinktionskoeffizient}$$

Der Extinktionskoeffizient einzelsträngiger RNA liegt bei 40. Zur Bestimmung des Reinheitsgrades wird der Quotient aus A260/A280 gebildet, welcher zwischen 1,8 und 2 liegen sollte. Ist dieser kleiner, kann auf eine Verunreinigung durch Proteine geschlossen werden.

Umschreiben in cDNA

Mithilfe des Takara RT-PCR Kit (Clontech Laboratories) wurde nun je 1 µg der RNA in cDNA transkribiert. Dafür wurde zunächst die RNA-Konzentration der verschiedenen Ansätze bestimmt, jeweils 1µl in ein neues Tube überführt und mit 99 µl depc-Wasser (Quiagen) aufgefüllt. Es folgte die Zugabe von 1 µl oligo(dT)-pimer (Clontech Laboratories), 6,5 µl Master-Mix (Clontech Laboratories) und eine einstündige Inkubation bei 42°C. Dabei konnten die Oligo(dT)-primer binden und die reverse Transkriptase konnte die RNA in cDNA transkribieren.

PCR

Zur Analyse der Genexpression auf Transkriptionsebene, wurde in der PCR nach CD146, CD276 und Sushi cDNA gesucht. Dabei wurden alle Zellfraktionen der Plazenta Pl 08-19 - Pl 12-19 analysiert. Als Positivkontrolle diente das Gen SMC Transgelin (Tagl). Referenzgene waren hier GAPDH und PPIA, welche als sogenannte Housekeeping-Genes fungieren. Für alle Proben wurde eine entsprechende Non-Template-Kontrolle (NTC) durchgeführt. Der Mastermix für jedes Gen bestand aus 10µl SybrGreen, 2µl Primer und 6µl NTW. Zunächst wurde nach dem unten aufgeführten Schema (Tabelle 3) 2µl cDNA und anschließend 18µl Mastermix pipettiert. Es wurden 39 Zyklen bei 60°C durchgeführt.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
GAPDH	A	2210	2211	2212	2213	2214	2215	2216	2217	2218	2217		
GAPDH	B										2216		2218
PPIA	C										2215		NTC GAPDH
PPIA	D										2214		NTC PPIA
CD146	E										2213		NTC CD146
CD146	F										2212		NTC CD276
CD276	G										2211		NTC Sushi
CD276	H										2210		Pos.Ko SMC Tag
											Sushi	Sushi	

Tabelle 3: Pipettierschema zum Nachweis von pMSC-Genen in den isolierten Zellen bei 60°

2.2.8 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie diente dem qualitativen Nachweis entsprechender Oberflächenmoleküle in vivo, mittels fluoreszenzmarkierter monoklonaler Antikörper. Dabei wurden einige Antikörper direkt mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert, andere wurden unter Zuhilfenahme eines farblich markierten Zweitantikörpers, welcher an den Erstantikörper bindet, sichtbar gemacht werden.

Kryoschnitte

Die Gewebeproben (1 x 1 cm) wurden aus dem maternalen und fetalen Anteil der Plazenta entnommen und in Tissue Tec, einem Gefrierschutzmittel, luftblasenfrei eingebettet. Die Proben wurden anschließend in Flüssigstickstoff eingefroren und auf – 70°C gelagert.

Am Kryotom wurden nun 10 µm dicke Schnittte angefertigt, welche paarweise auf einen SuperFrost Objektträger aufgezogen wurden. Anschließend folgte die Immunfärbung.

Antikörperverdünnungen

Vor Beginn der Immunfärbung erfolgte die Herstellung der entsprechenden Verdünnungsmedien und Antikörperverdünnungen. Zusätzlich zum Dako-antibody diluent wurde hier ein weiteres Verdünnungsmedium mit Dako und DAPI (Vectashield) in einem Verdünnungsverhältnis von 1:20.000 hergestellt, mit welchem alle floureszenzmarkierten Antikörper anschließend verdünnt wurden.

Die Verdünnung der unmarkierten Primärantikörper erfolgte im Dako-Verdünnungsmedium.

Reagenz	Markierung	Firma	Katalognummer	Klon	Verdünnung
CD90	FITC	Dianova	DIA 120	AS02	1:30
CD146	PE	R&D Systems		128018	1:30
CD271 2.AK: Donkey-Anti-Mouse F(ab`)	PE Alexa Fluor 488	BD Bioscience	RUO	C40-1457	1:30 1:50
NG2 2.AK: Donkey-Anti-Mouse F(ab`)	FITC Alexa Fluor 488	Santa Cruz Biotech	Sc-53389	LHM2	1:50 1:50
CD276 2.AK: Goat-anti-Rabbit-Ak	No label Cy3	Abcam	Ab226256		1:2000 1:300
CD105 2.AK: Donkey-Anti-Mouse F(ab`)	No label Alexa Fluor 488	BD Pharmingen	555690		1:30 1:50
CD73 2.AK: Donkey-Anti-Mouse F(ab`)	No label Alexa Fluor 488	Biolegend	344002	AD2	1:30 1:50

Tabelle 4: Antikörper und Verdünnungen in der Immunhistochemie; FITC = Fluorescein; Cy3 = Cyanine 3; PE= R-Phycoerithrin; 2.AK steht hier für den gefärbten Sekundärantikörpe

Immunfärbung

Vor der Färbung wurden die Objektträger bei 25 °C für 10 Minuten aufgetaut und die Schnitte anschließend bei 40°C (Heizplatte) für 15 Minuten angebacken. Die Schnitte wurden für 10 Minuten in eiskaltem Aceton (-20°C) fixiert und dann bei Raumtemperatur für 15 Minuten getrocknet. Es folgte die Umrandung mit einem DAKO-Wachsstift und eine zweimalige Waschung mit PBS für jeweils 5 Minuten. Anschließend erfolgte ein Blocking mit 100 µl 5-10%igem Normalserum der Spezies des 2. Antikörpers (siehe Tabelle 4) für 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Dieser Schritt wurde bei Proben welche mit einem primär markierten Antikörper gefärbt wurden, ausgelassen.

Für die Färbung wurden nun jeweils 100 µl der Primärantikörperverdünnungslösung auf den jeweiligen Schnitt gegeben. Auf den benachbarten Schnitt wurden jeweils 100µl Verdünnungsmedium ohne Primärantikörper gegeben (Negativkontrolle). Es folgte eine Inkubationszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer. Anschließend wurden die Schnitte 3 x 5 Minuten mit PBS gewaschen. Dann folgte die Zugabe von 100 µl der Sekundärantikörperverdünnungslösung auf beide Schnitte des Objektträgers (auch Negativkontrolle). Bei der Färbung mit direkt markierten Primärantikörpern wurde dieser Schritt ausgelassen. Es folgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer und eine Waschung mit PBS für 3 x 5 Minuten. Zuletzt wurden die Objektträger bei Raumtemperatur getrocknet und mit Mouting-Medium mit DAPI (Vectashield) eingedeckelt.

Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine bestimmte Form der Lichtmikroskopie, bei der es durch Belichtung fluoreszierender Stoffe zur Anregung und anschließender Emission eines Photons kommt. Dabei wird Licht längerer Wellenlänge abgestrahlt (Stokes Verschiebung). Nur dieses Licht wird anschließend betrachtet, was die hellen Signale auf dunklem Hintergrund bedingt. Das fluoreszierende Molekül ist hier als Dipol zu betrachten, welches durch die Photonabsorption von einem Grundzustand in einen angeregten Zustand gebracht wird. Sowohl der Grundzustand, als auch der angeregte Zustand bestehen aus mehreren Zwischenzuständen. Dies bedingt das jeweilige Absorptions- und Emissionsspektrum. Das Abstrahlen der Fluoreszenz geschieht immer vom niedrigsten Energieniveau (Kasha-Regel). Der nichtstrahlende Übergang von einem angeregten in einen weniger angeregten Zustand, wird nun in einem Energieverlust deutlich, welcher als Wärme im Präparat zurückbleibt. Dadurch ist das Anregungsspektrum immer energiereicher als das Emissionsspektrum, was sich in einer längeren Wellenlänge des abgestrahlten Lichts äußert.

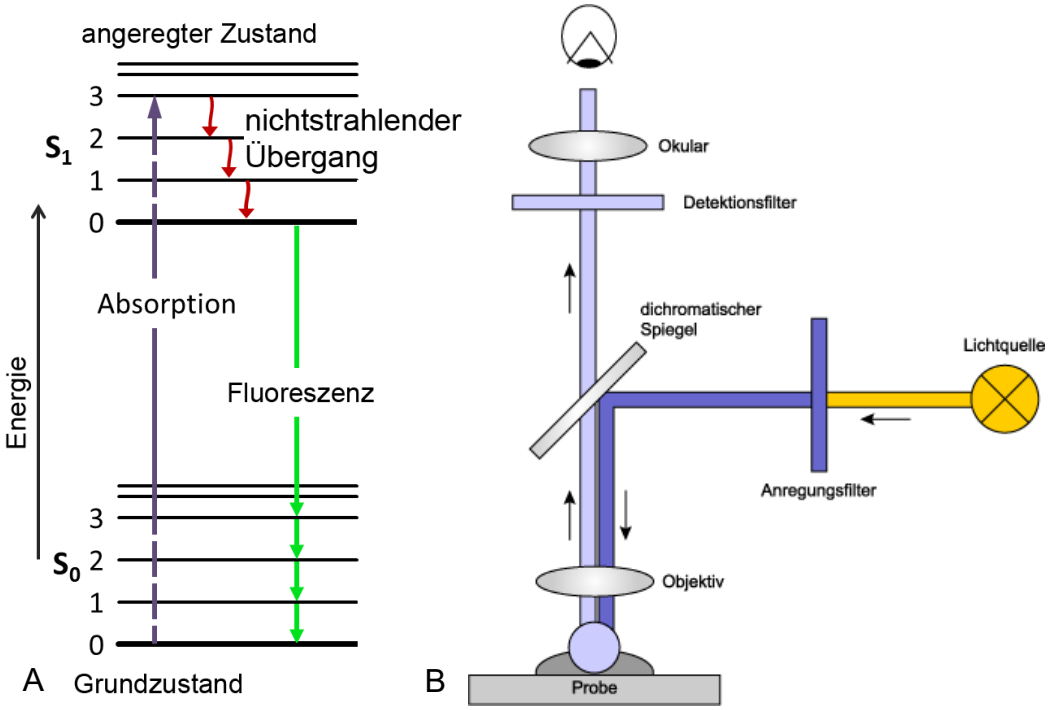


Abbildung 15: Grundprinzipien der Fluoreszenzmikroskopie; A Jablonski-Diagramm of Fluoreszence; wikipedia.org; B Schematischer Aufbau eines Fluoreszensmikroskops; roempp.thieme.de

Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss mit der entsprechenden Axio Vision Software. Das Anregungslicht wird hier durch einen speziellen Filter geleitet, welcher die, für die Fluoreszenzfärbung notwendige, Wellenlänge erzeugt. Der Strahlteiler (dichromatischer Spiegel) lenkt nun das Licht über das Objektiv zum Präparat. Im Unterschied zum herkömmlichen Lichtmikroskop entsteht die später betrachtete längerwellige Strahlung im Präparat, welche nun vom Objektiv über den Strahlteiler und Sperrfilter zum Detektor geleitet wird. Der Sperrfilter stellt sicher, dass ausschließlich dieses längerwellige Licht detektiert wird und keine Reflektion erfolgt.

3 Vorversuche zur Etablierung der Methodik

3.1 Immunhistochemie von Immunzellen im Schwein

Da humane MSCs aus der Plazenta für ihre immunoregulatorischen Eigenschaften bekannt sind, stellt sich die Frage ob eine xenogene Implantation humaner MSCs in Schweinegewebe zu einer Immunreaktion führt. Eine Umgehung des Immunsystems könnte weitere Versuche am Schwein vor einer klinischen Testung möglich machen. Es konnten bereits Versuche an „Göttingen Minipigs“ durchgeführt werden, bei denen eine Injektion von humanen mesenchymalen Stromazellen in den Blasensphinkter zu keiner chronischen Inflammation, allerdings zu einer transienten Infiltration von Makrophagen nach 3 Monaten geführt hat. (Amend et al., 2017) Dies lässt eine geringe Immunogenität von humanen MSCs in Schweinegewebe vermuten. Eine Immunreaktion wird hier grundsätzlich durch den Nachweis von Immunzellen im Gewebe und das Vorhandensein von klinischen Entzündungszeichen bestätigt. Grundvoraussetzung für den Nachweis von Schweineimmunzellen, ist eine geeignete Nachweismethode. Die entsprechende Testung von Antikörpern gegen Oberflächenstrukturen von Immunzellen im Schweinegewebe entsprechen hier einer Positivkontrolle.

3.1.1 Immunhistochemie am porcinen Thymus

Das porcine Gewebe wurde in Tissue Tec eingebettet. Es wurden 7 µm dicke Kryoschnitte angefertigt und paarweise auf die Objektträger aufgetragen. Die Objektträger wurden für 2 Minuten auf die 40°C aufgewärmte Heizplatte angetrocknet.

Die jeweiligen Verdünnungslösungen der Primär- und Sekundärantikörper wurden mit 0,1% BSA in PBS als Verdünnungslösung hergestellt.

Beide Präparate pro Objektträger wurden mit einem DAKO-Wachsstift umrandet. Anschließend wurden jeweils 100µl Primärantikörper im Verdünnungsmedium pro Schnitt auf einen Schnitt des Objektträgers pipettiert. Eine Negativkontrolle wurde zeitgleich auf dem anderen Schnitt des jeweiligen Objektträgers durchgeführt, indem 100 µl des Verdünnungsmediums ohne den

Primärantikörper gegeben wurden. Nun wurden die Schnitte in einer dunklen mit Aquadest vorbereiteten feuchten Kammer für 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde die jeweilige Lösung vom Objektträger vorsichtig auf einem Papiertuch abgeklopft. Anschließend wurden die Schnitte 2 Mal für 5 Minuten in PBS gewaschen. Die unmarkierten Antikörper wurden mit einem Zweitantikörper markiert. Dazu wurde 100 µl des verdünnten Antikörpers sowohl auf die Positiv-, als auch auf die Negativkontrolle pipettiert und für 30 Minuten inkubiert. Es folgte anschließend ein Abklopfen der Lösung und ein weiterer Waschdurchgang mit PBS (2 Mal für 5 Minuten). Vor dem luftblasenfreiem Eindeckeln der Schnitte mit Immunoselect mit Dapi, wurden die Schnitte bei RT im Dunkeln getrocknet. Anschließend folgte die floureszenzmikroskopische Auswertung.

Reagenz	Markierung	Firma	Katalognummer	Klon	Verdünnung
Anti porcine S100A9 + Calprotectin Antikörper	keine	abcam	Ab22506	MAC387	1:100
Anti porcine CD20 Antikörper	keine	abcam	Ab8237	MEM-97	1:100
Anti porcine CD3 Antikörper	keine	Bio-Rad AbD-Serotec	MCA5951GA	PPT3	1:50
Anti porcine CD14 Antikörper	FITC	Bio-Rad-AbD-Serotec	MCA1568F	Tük4	1:10
Anti porcine CD45 Antikörper	FITC	Bio-Rad-AbD-Serotec	MCA1222GA	K252.1E4	1:10
Anti human CD56 Antikörper	PE	Biolegend	304606	MEM-188	1:20
Goat-anti-mouse-Antikörper	Cy3	Jackson/Dianova	115165166	polyclonal	1:300

Tabelle 5: Verwendete Antikörper zur Immunhistochemie des porcinen Thymus mit entsprechenem Verdünnungsverhältnis. S100A9+Calprotectin: Nachweis Makrophagen/Monozyten; CD20: Nachweis B-Lymphozyten; CD3: Nachweis T-Lymphozyten, CD14: Nachweis Makrophagen/Monozyten; CD45: Nachweis Leukozyten, CD56: Nachweis Granulozyten/NK-Zellen; Goat-anti-mouse-Antikörper: Zweitantikörper für ungelabelte Erstantikörper

In der mikroskopischen Auswertung zeigten sich, außer bei der Mikroskopie der mit CD3-Antikörper markierten Schnitte, keinerlei spezifische Bindungen. Exemplarisch ist in Abbildung 16 die S100A9+Calprotectin-Färbung dargestellt. Möglicherweise handelt es sich hier um eine unspezifische Bindung des Zweitantikörpers.

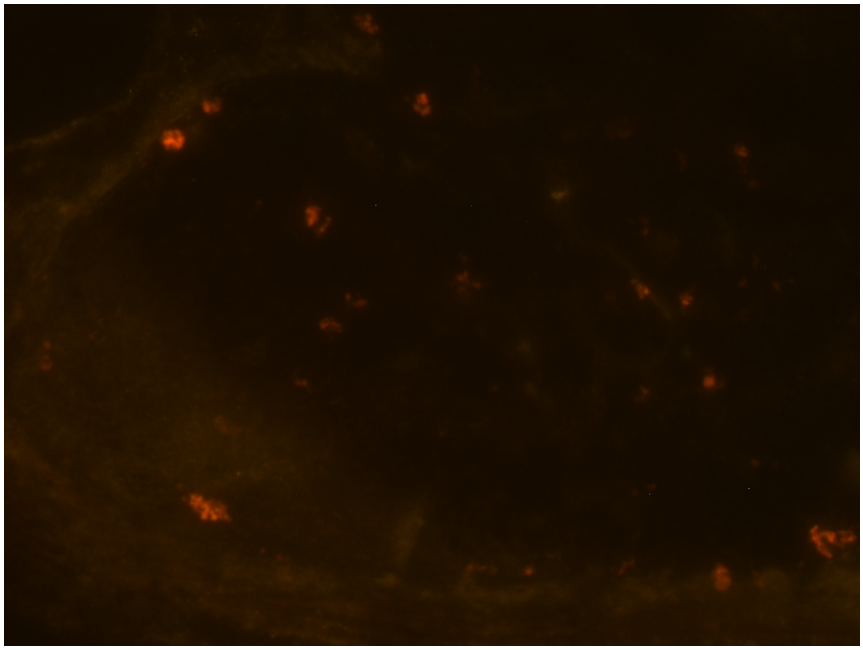


Abbildung 16: S100A9+Calprotectin-Antikörper mit Sekundärantikörper

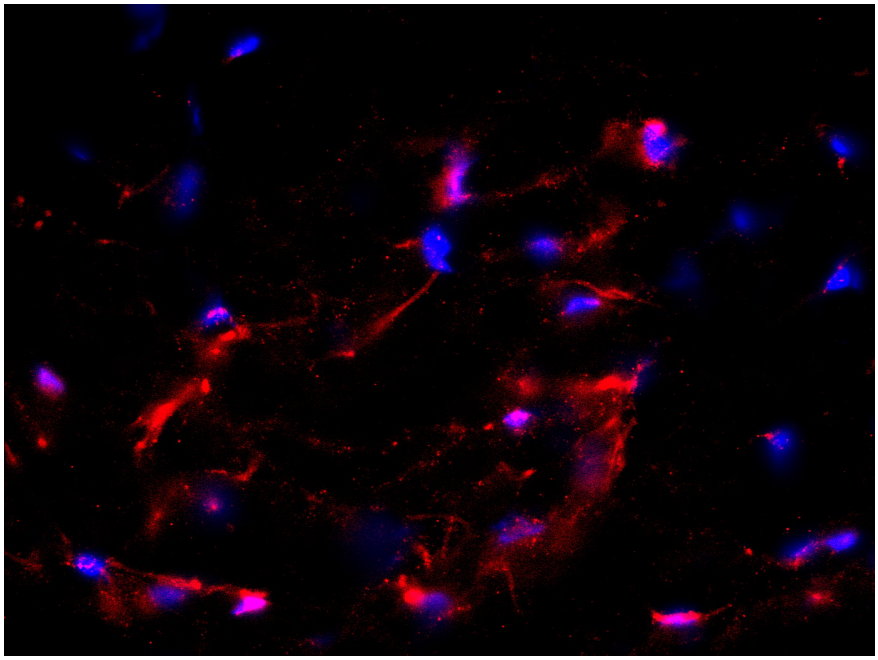


Abbildung 17: CD3 Antikörper mit Sekundärantikörper und DAPI

Aufgrund einer bekannten Kreuzreaktivität der Antikörper mit porcinem Gewebe, ist von einer schwächeren Bindung von porcinen Oberflächenstrukturen, als von humanen Oberflächenstrukturen auszugehen. Deshalb wurde im folgenden Versuch die Testung der Antikörper an humanem Gewebe vorgenommen.

3.1.2 Immunhistochemie am humanen Thymus

Die Durchführung der Methodik erfolgte wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben. Es konnte eine spezifische Bindung aller Antikörper unter Berücksichtigung der Negativkontrollen, mit Ausnahme des CD3-Antikörpers, nachgewiesen werden.

Reagenz	**Markier-ung**	**Firma**	**Katalognummer**	**Klon**	**Verdünnung**
Anti-human-CD11c Antikörper	PE	Biolegend	301605	3.9	1:10
Anti-human-CD3-Antikörper	APC	BD	561810	UCHT1	1:10

Tabelle 6: Zusätzlich verwende Antikörper am humanen Thymus (CD3 wurde ausgetauscht). CD11c: Nachweis Granulozyten; CD3: Nachweis T-Lymphozyten

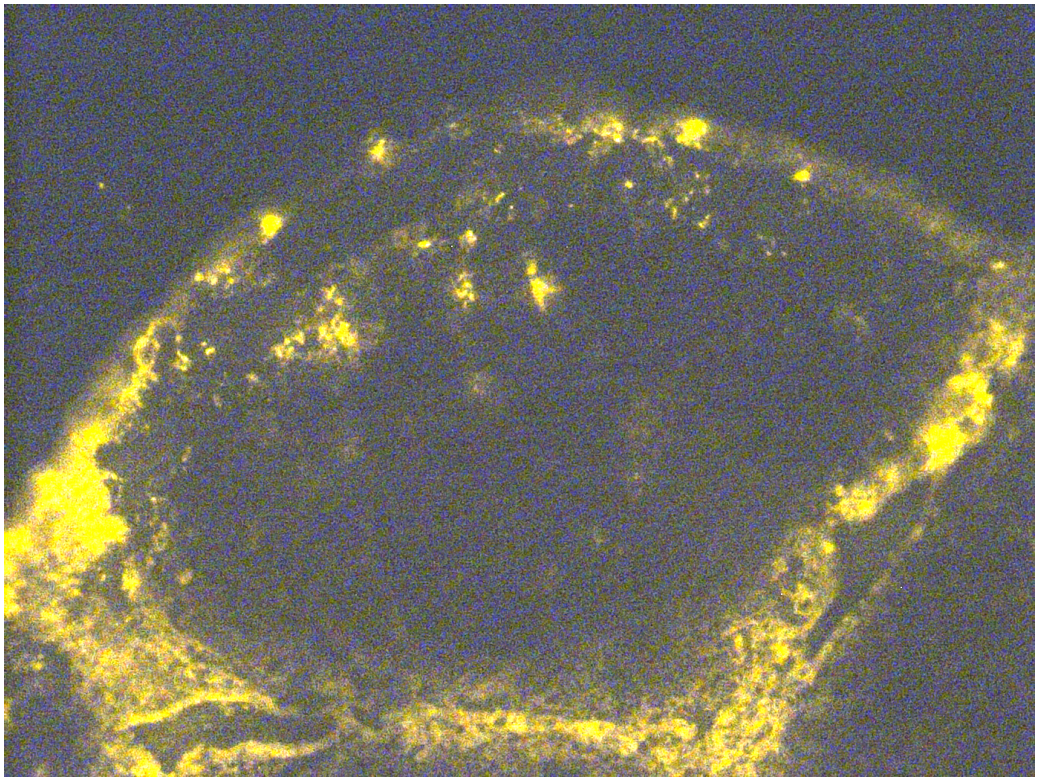


Abbildung 18: S100A9+Calprotectin-Antikörper mit Sekundärantiörper (Cy3), Färbung der T-Zone

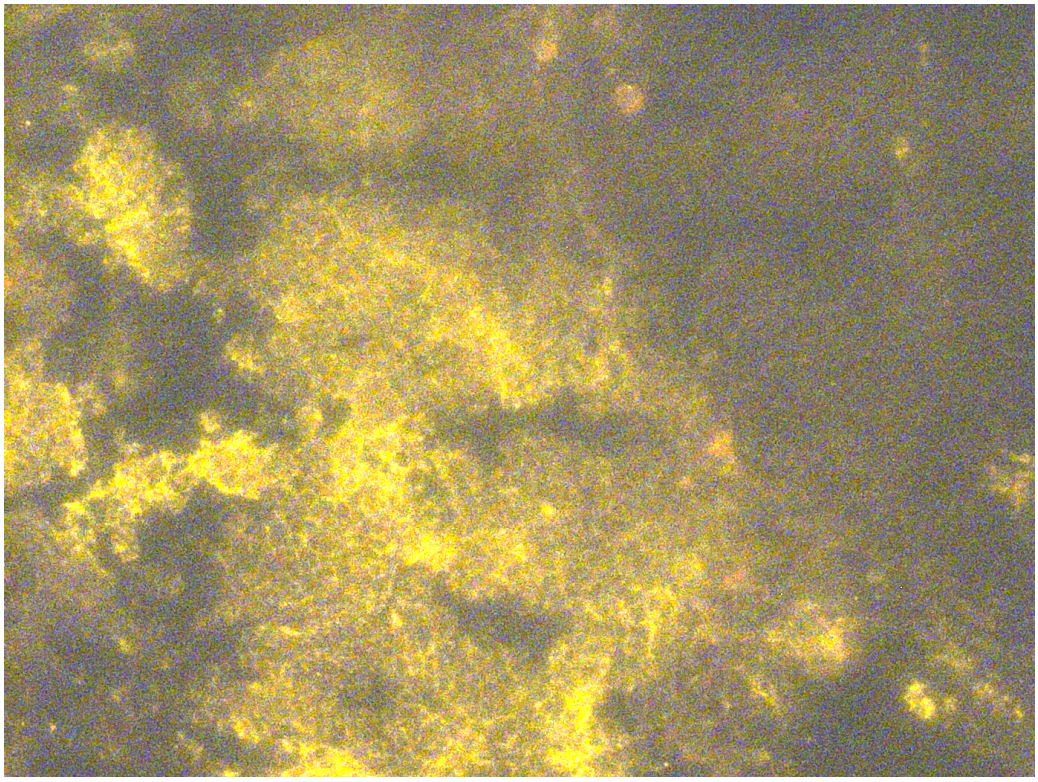


Abbildung 19: CD20 Antikörper mit Sekundärantikörper (Cy3)

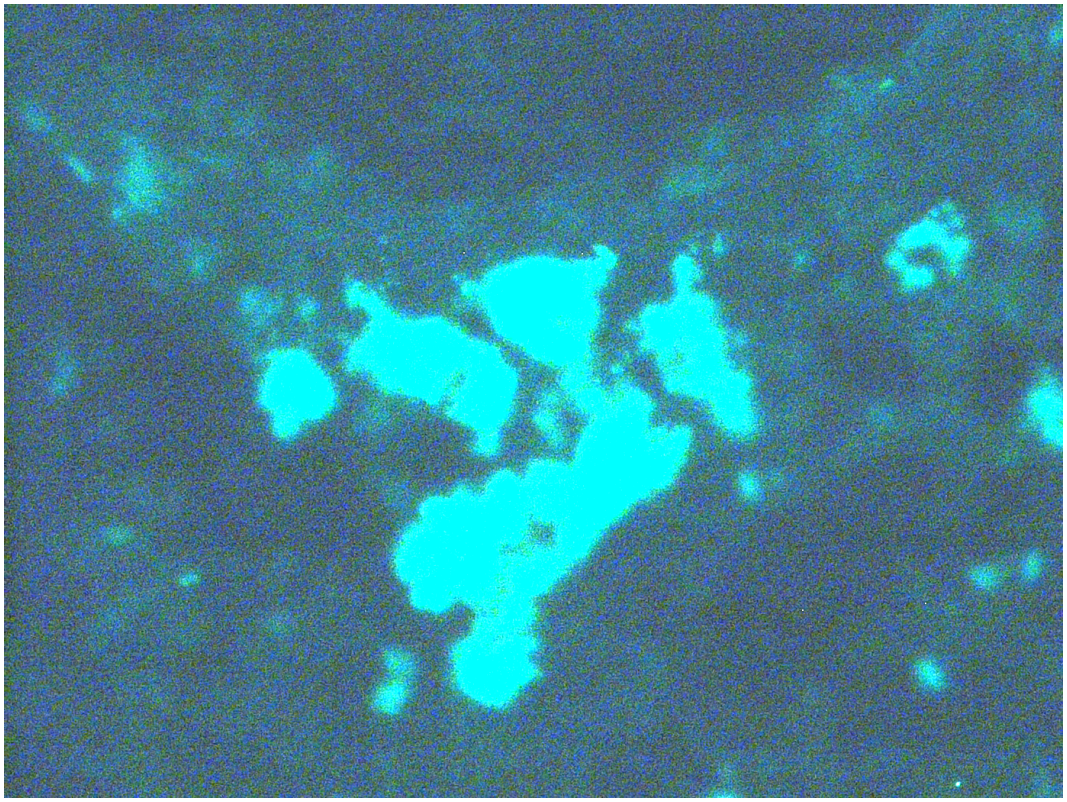


Abbildung 20: CD14-Antikörper mit FITC markiert

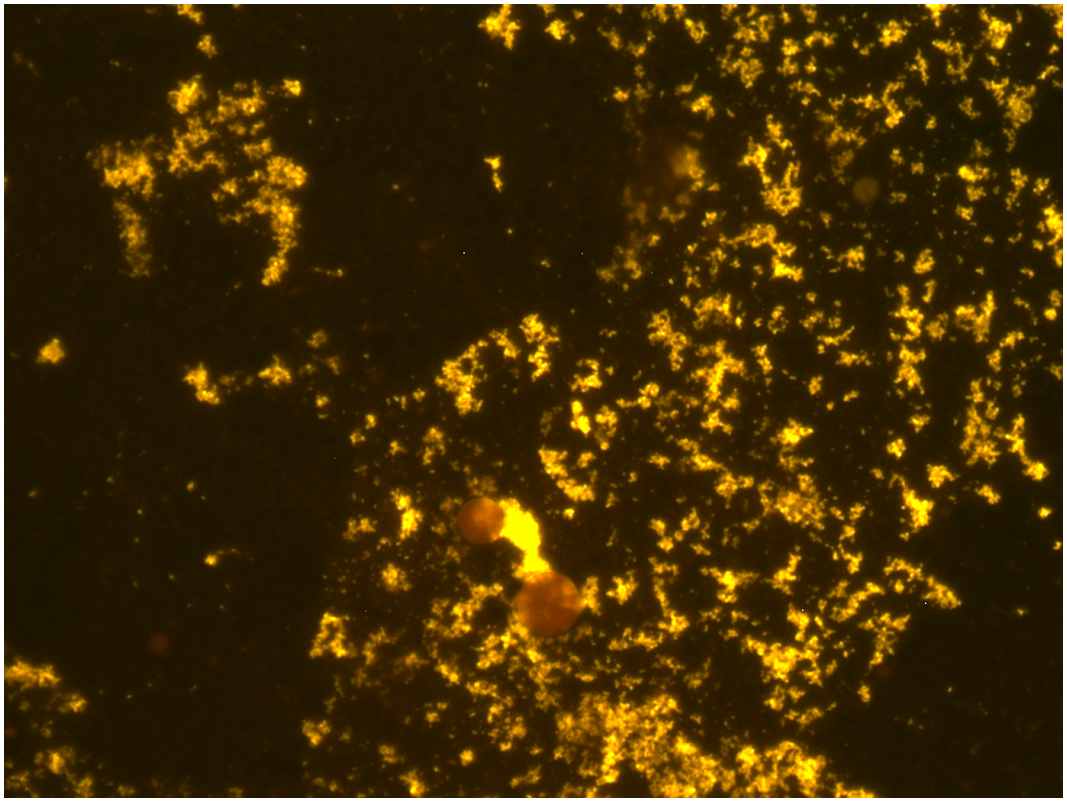


Abbildung 21: CD56-Antikörper mit RFP-Markierung

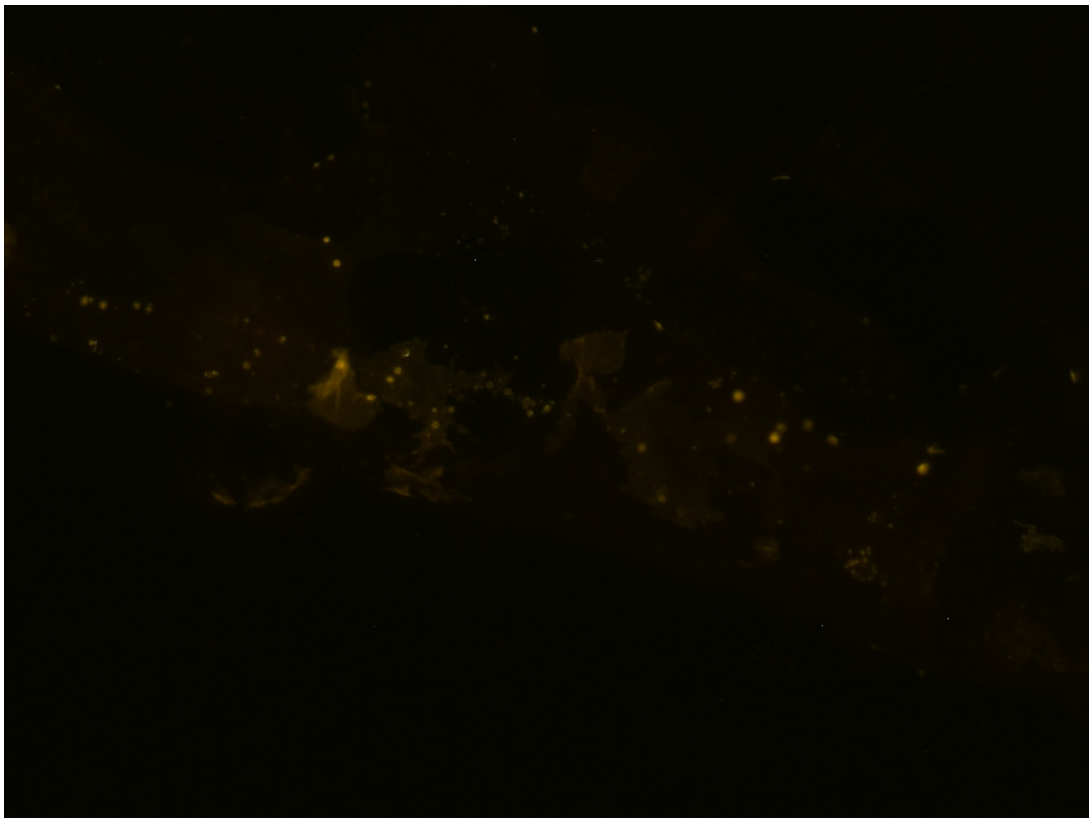


Abbildung 22: CD11c-Antikörper mit PE-Markierung

3.1.3 Immunhistochemie am porcinen Lymphknoten

Folgende Antikörper wurden verwendet:

Reagenz	Markier-ung	Firma	Katalognummer	Klon	Verdünnung
Anti porcine S100A9 + Calprotectin Antikörper	keine	abcam	Ab22506	MAC387	1:100
Anti porcine CD20 Antikörper	keine	abcam	Ab8237	MEM-97	1:100
Anti porcine CD3 Antikörper	keine	Bio-Rad AbD-Serotec	MCA5951GA	PPT3	1:50
Anti porcine CD14 Antikörper	FITC	Bio-Rad-AbD-Serotec	MCA1568F	Tük4	1:10
Anti human CD56 Antikörper	PE	Biolegend	304606	MEM-188	1:20
Anti human CD56 Antikörper	FITC	Arcis	304606	123C3	1:100
Anti-human-CD11c Antikörper	PE	Biolegend	301605	3.9	1:10
Goat-anti-mouse-Antikörper	Cy3	Jackson/Dianova	115165166	polyclonal	1:300

Tabelle 7: Verwendete Antikörper zur Immunhistochemie des porcinen Lymphknotens mit entsprechenem Verdünnungsverhältnis. S100A9+Calprotectin: Nachweis Makrophagen/Monozyten; CD20: Nachweis B-Lymphozyten; CD3: Nachweis T-Lymphozyten; CD14: Nachweis Makrophagen/Monozyten; CD56: Nachweis Granulozyten/NK-Zellen, CD11c: Nachweis Granulozyten; Goat-anti-mouse-Antikörper: Zweitantikörper für ungelabelte Erstantikörper

Aufgrund einer spezifischen Bindungsfähigkeit der verwendeten Antikörper erfolgt nun eine weitere Färbung des porcinen Gewebe. Die Durchführung der Methodik erfolgte entsprechend der Immunhistochemie der Plazenta, entsprechend dem Kapitel 2.2.8.

Die Antikörperfärbungen S100A9+Calprotectin, CD20, CD14, CD56 und CD11c zeigten eine unspezifische Bindung. Da die S100A9+Calprotectin- und CD20-Färbung mit einem gelabelten Zweitantikörper durchgeführt wurde, wurde eine Kreuzreaktivität mit diesem, gegen B-Zellen des Schweinlymphknoten vermutet. Dies ist exemplarisch in Abbildung 23 dargestellt, wo eine Färbung der Negativkontrolle nachvollziehbar ist.

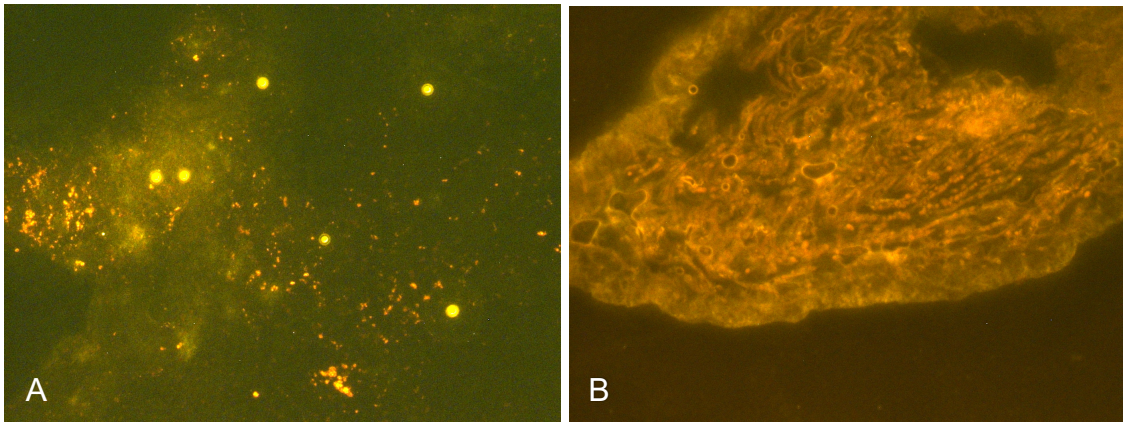


Abbildung 23: S100A9+Calprotectin-Antikörper mit Sekundärantikörper (Cy3), A: Positivkontrolle, B: Negativkontrolle (nur Sekundärantikörper)

Die Antikörperfärbung gegen T-Lymphozyten im Schwein mit CD3-Antikörperfärbung führte zu einer spezifischen Bindung und einer Darstellung der T-Zone im Schweinelymphknoten.

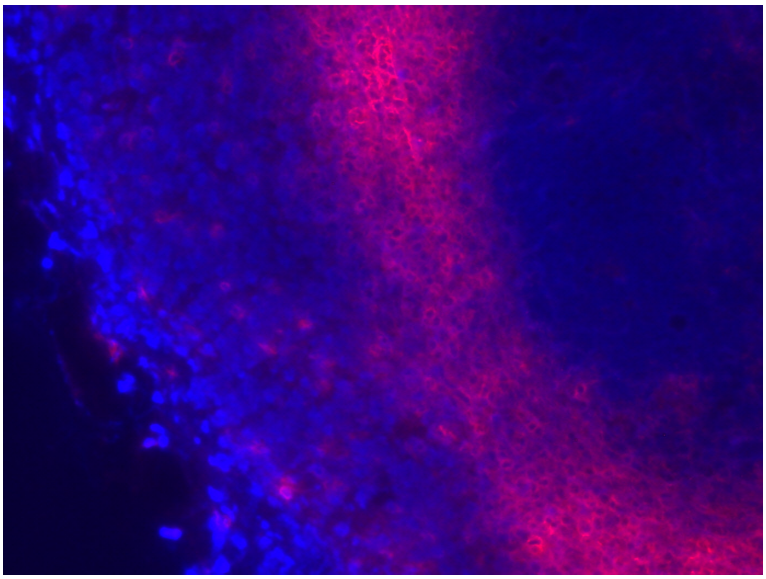


Abbildung 24: CD3-Antikörper mit Sekundärantikörper (Cy3) und DAPI

4 Ergebnisse

4.1 Zellkultur

Die aus dem fetalen und maternalen Anteil der Plazenta isolierten MSC´s, wurden nach anfänglicher Kontaminationsproblematik, in T75 Zellkulturflaschen ausgesäht und in dem entsprechenden Medium kultiviert. Ziel war hier, das Erreichen einer ausreichenden Zellzahl, um die Zellen in weiteren Versuchen auf ihre Differenzierungsfähigkeit und die Expression von MSC-spezifischen Oberflächenstrukturen in den verschiedenen Medien zu untersuchen. Insgesamt wurden die Stammzellen aus 12 Plazenten isoliert, wobei die Populationen der Planzenten 01-19 – 07-19 aus dem fetalen Anteil isoliert und zunächst als ganze Gewebestücke auf einer 6-well-Platte expandiert wurden (siehe Kapitel 2.2.1).

Innerhalb der ersten 2 Wochen entwickelte sich trotz Zusatz von Amphotericin B, Penicillin, Streptomycin und im weiteren Verlauf Gentamycin und Tylosin eine Zellkulturkontamination mit dem Verdacht auf eine bakterielle Besiedlung in den Kulturen der Plazenten 01-19 – 07-19. Mit Auftreten der Kontaminationen wurde eine Wachstums- und Proliferationshemmung der auswachsenden Zellen beobachtet. Auch die Zugabe von Ampicillin und Tetracyclin führte zu keiner Besserung. Eine Verschärfung der hygienischen Standards bei der Zellisolation, durch die Verwendung steriler Handschuhe, steriler Tücher, der Sterilfiltration von Thrombin und Fibrinogen, und der Thrombinverabreichung mittels steriler Pipette brachte keine Verbesserung. Auch die Desinfektion der Gewebsstücke mit Braunol vor der Gewebszerkleinerung und Zellkultivierung, und die Waschung der Zellen mit 10% P/S PBS führte zu keiner Verbesserung. Ein Test auf eine Besiedlung durch Mycoplasmen der Pl 05-19 fiel negativ aus. Daraufhin wurden die Kulturen Pl 01-19 – Pl 07-19 verworfen.

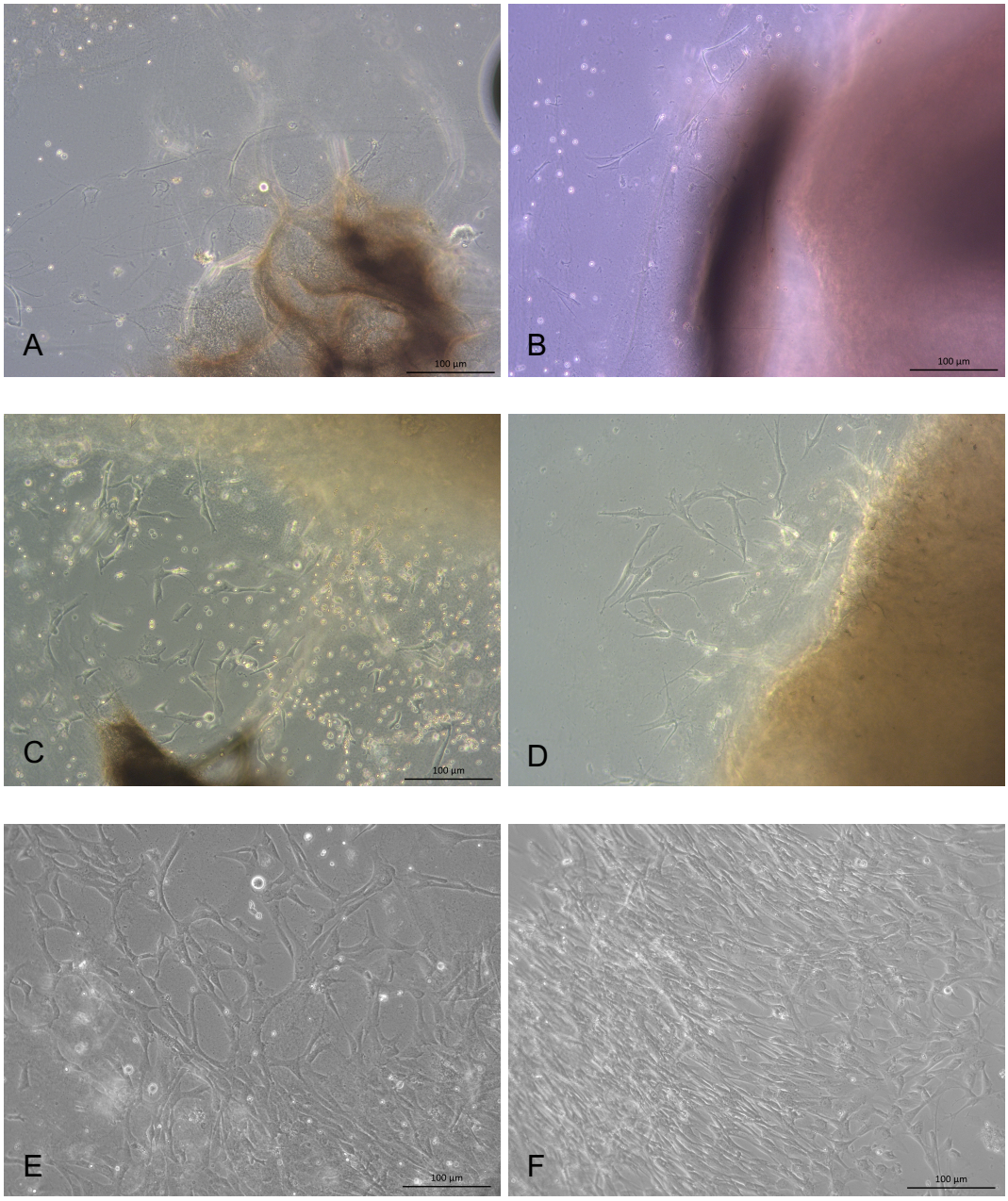


Abbildung 25: Lichtmikroskopiebilder der Zellexpansion der Plazenta 01-19 im zeitlichen Verlauf, A: pfMSCs in Lonza (Tag 3); B: pfMSCs in GMP (Tag 3); C: pfMSCs in Lonza (Tag 10); D: pfMSCs in GMP (Tag 10); E: pfMSCs in Lonza (Tag 14); F: pfMSCs in GMP (Tag 14)

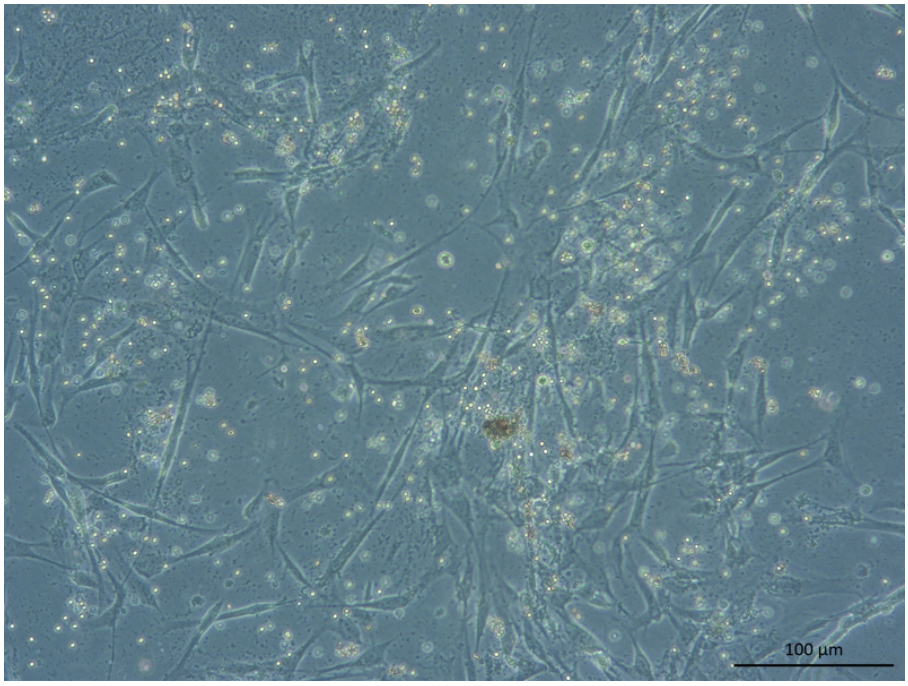


Abbildung 26: Exemplarische Ansicht der Zellkultur Pl 05-19 pfMSCs in GMP Medium mit oben beschriebener Kontamination

Die Populationen der Plazenten 08-19 – 12-19 wurden sowohl aus dem fetalen als auch aus dem maternalen Anteil nach abgewandeltem Protokoll (siehe Kapitel 2.2.3) isoliert. Da mehr maternales Gewebe zur Zellisolation zur Verfügung stand, ist der Anteil der isolierten Zellen höher als der fetale Zellanteil. Das Umsetzten in die erste und zweite Passage erfolgte bei 80%iger Konfluenz. Die folgenden Versuche wurden in der 2. Passage durchgeführt.

4.1.1 Zellmorphologie der pMSCs

Nach der Zellisolation zeigten sich in den Zellkulturen zunächst starke Verunreinigungen durch Zell- und Gewebsreste. Vor allem Erythrozyten waren erkennbar. Die ersten adhärenten Zellen wurden an Tag 2 nach der Zellaussaat sichtbar. Diese zeichneten sich im weiteren Verlauf durch eine fibroblastenartige Morphologie mit langen, schmalen Zellausläufern und mehreren Nukleoli aus. Durch regelmäßige Mediumwechsel und das Passagieren der Zellen, wurden die isolierten Zellkulturen homogener. Die fetalen und maternalen Zellen unterschieden sich in ihrer Morphologie. Besonders die fetalen pMSCs fielen durch ein arkadenartiges Wachstum auf (Abbildung 27, B), während die maternalen pMSCs vor allem in der Primärkultur eher ein verzweigtes Wachstumsmuster zeigten. (Abbildung 27, C,D). Die fetalen pMSCs zeigten im Lonza-Medium in der ersten Passage eine Zellseneszenz. Auffällig war eine zeltartige Aufdehnung der Zellmembran und der anschließende Zellkernverlust (Abbildung 27, A). Aufgrund dieser Zellseneszenz konnten die fetalen Zelllinien im Lonzamedium nicht weiter expandiert werden, weshalb die Durchflusszytometrie und die PCR im weiteren Verlauf ohne diese Zelllinie stattfinden mussten.

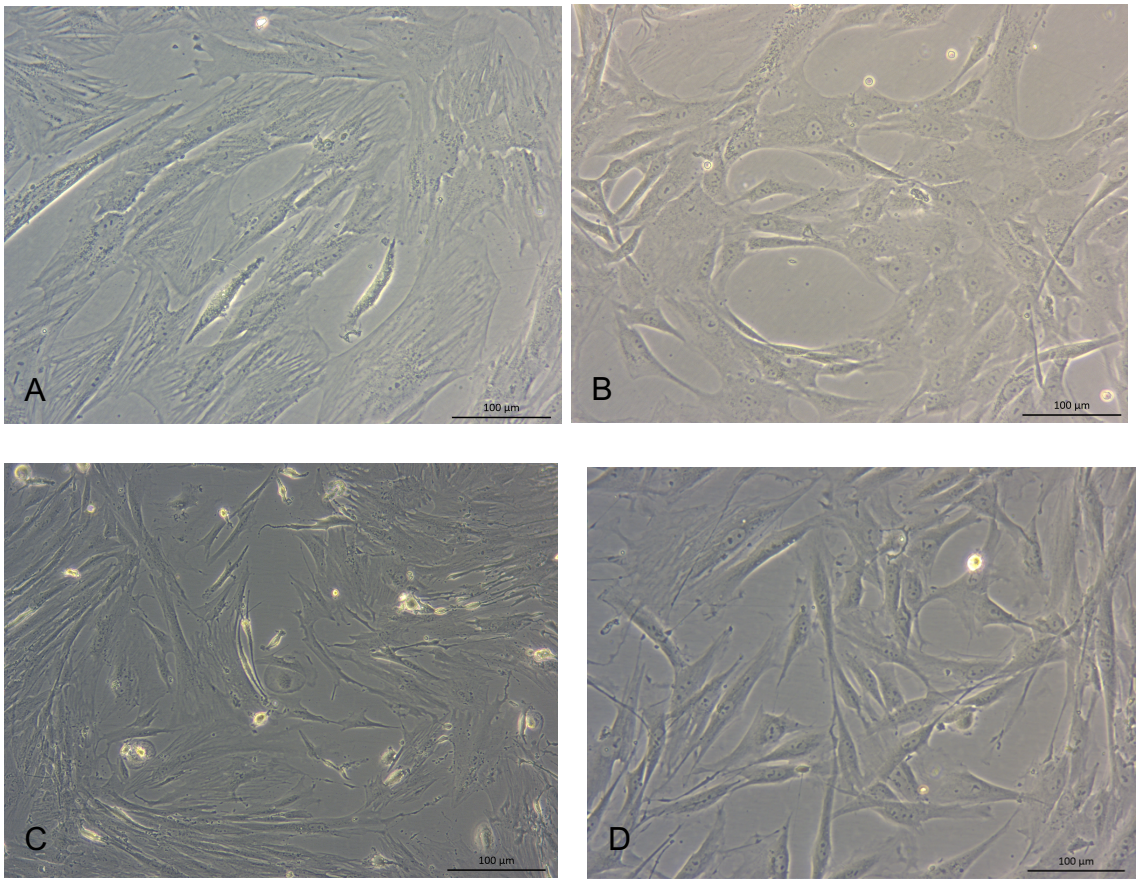


Abbildung 27: Lichtmikroskopiebilder der Zellkultur Pl 08-19 an Tag 12 in der Primärkultur A: pfMSCs in Lonza; B: pfMSCs in GMP; C: pmMSCs in Lonza; D: pmMSCs in GMP

Mit dem Umsetzen der Zellen in die erste Passage, fielen deutliche Unterschiede der Zelltypen in ihrem Wachstumverhalten und ihrer Morphologie auf. Während die maternalen Zellen dichter wuchsen als die fetalen Zellen, zeigte sich im Lonza-Medium der maternalen Zellfraktion ein tentoriales Aufspannen der Zellmembran. Dieses Phänomen im Lonza-Medium konnte schon in der Primärkultur der fetalen Zellfraktion beobachtet werden. Durch eine progrediente Proliferation der fetalen Zellfraktion im GMP-Medium, war das in der Primärkultur beschriebene arkadenartige Zellwachstum der fetalen Zellen deutlich weniger zu erkennen.

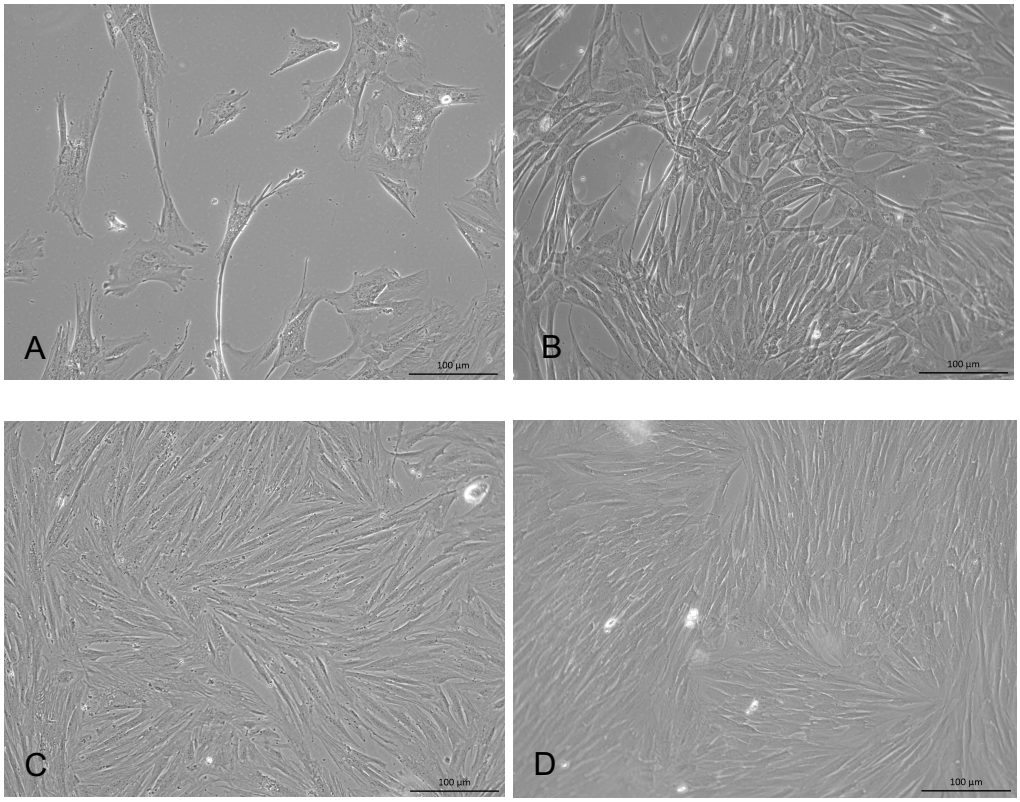


Abbildung 28: Lichtmikroskopiebilder der Zellkultur Pl 10-19 in der 1. Passage an Tag 8 A: pfMSCs in Lonza; B: pfMSCs in GMP; C: pmMSCs in Lonza; D: pmMSCs in GMP

4.1.2 Proliferationsrate

In der Duplikationsrate unterschieden sich die Zelltypen nicht signifikant voneinander. Dies konnte mittels T-Test ermittelt werden. Allerdings konnte eine höhere Duplikationsrate im GMP-Medium verzeichnet werden. Die ermittelte Duplikationsrate der fetalen MSCs war im Lonza Medium geringer.

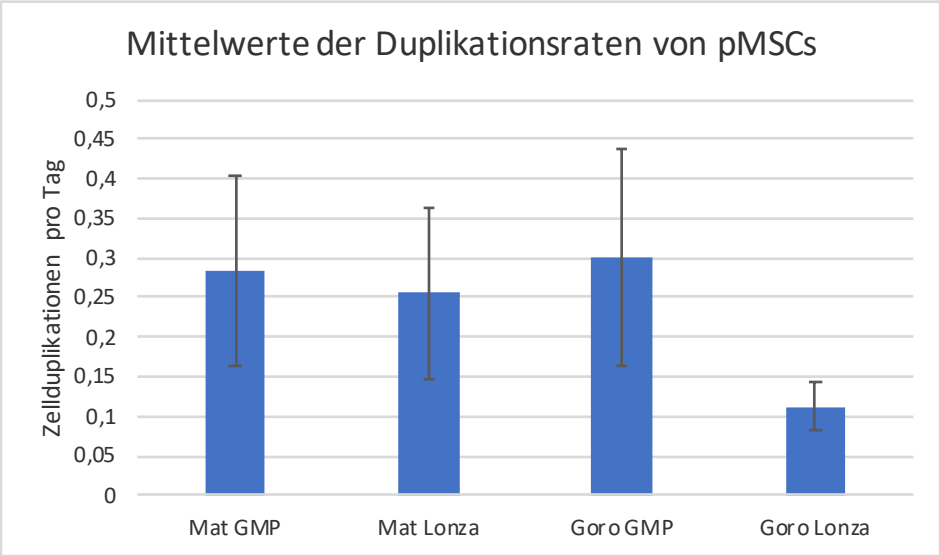


Abbildung 29: Mittelwerte der Duplikationsraten von pMSCs aus 5 verschiedenen Plazenten (n=5) mit eingetragener Standardabweichung (schwarze Linie)

4.1.3 Differenzierung

Ein Kriterium zur Charakterisierung von MSCs ist die adipogene, chondrogene und osteogene Differenzierungsfähigkeit. Hier sollte die adipogene und osteogene Differenzierungsfähigkeit untersucht werden. Dazu wurden die Zellen von 5 Plazenten in der 2. Passage auf 6-well-Platten ausgesäht und in einem osteogenen oder adipogenen Differenzierungsmedium kultiviert. Die Zellen wurden nach 3 Wochen angefärbt. Aufgrund eines Adhärensverlustes in der induzierten osteogenen Differenzierung der pmMSCs der Plazenten Pl 08-19 – Pl 10-19 in GMP-Medium, wurde die Kultivierungszeit auf 2 Wochen verkürzt. Anschließend wurden die Zellen mit einer spezifischen Färbung gefärbt um eine Differenzierung lichtmikroskopisch sichtbar zu machen. Zur Negativkontrolle wurde, anstatt des jeweiligen Differenzierungsmediums, ein Mangelmedium zugesetzt. Auch diese Zellen wurden anschließend angefärbt.

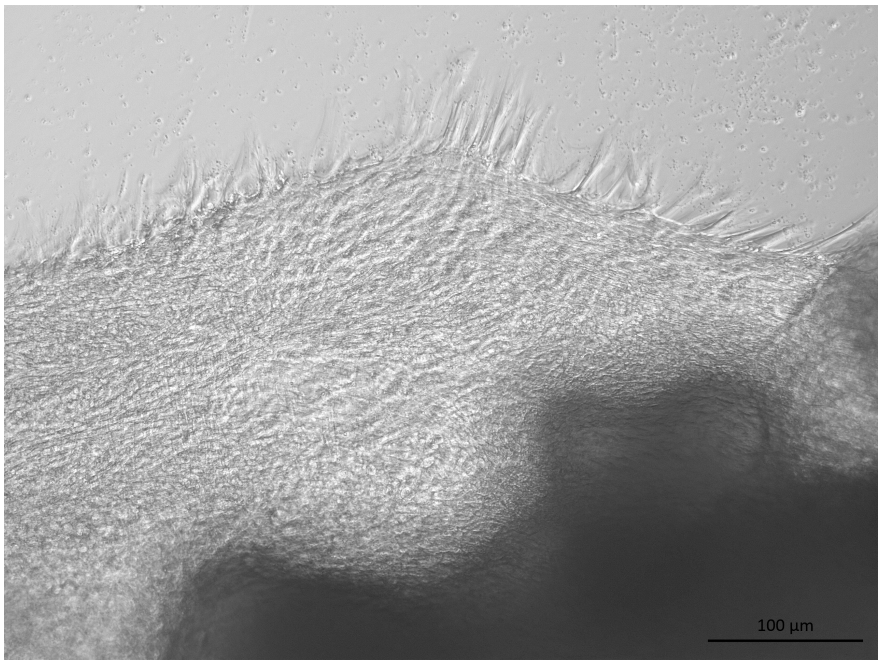


Abbildung 30: Zellkultur Pl 10-19 im osteogenen Differenzierungsmedium der maternalen Fraktion aus dem GMP-Medium an Tag 7, Zellablösung

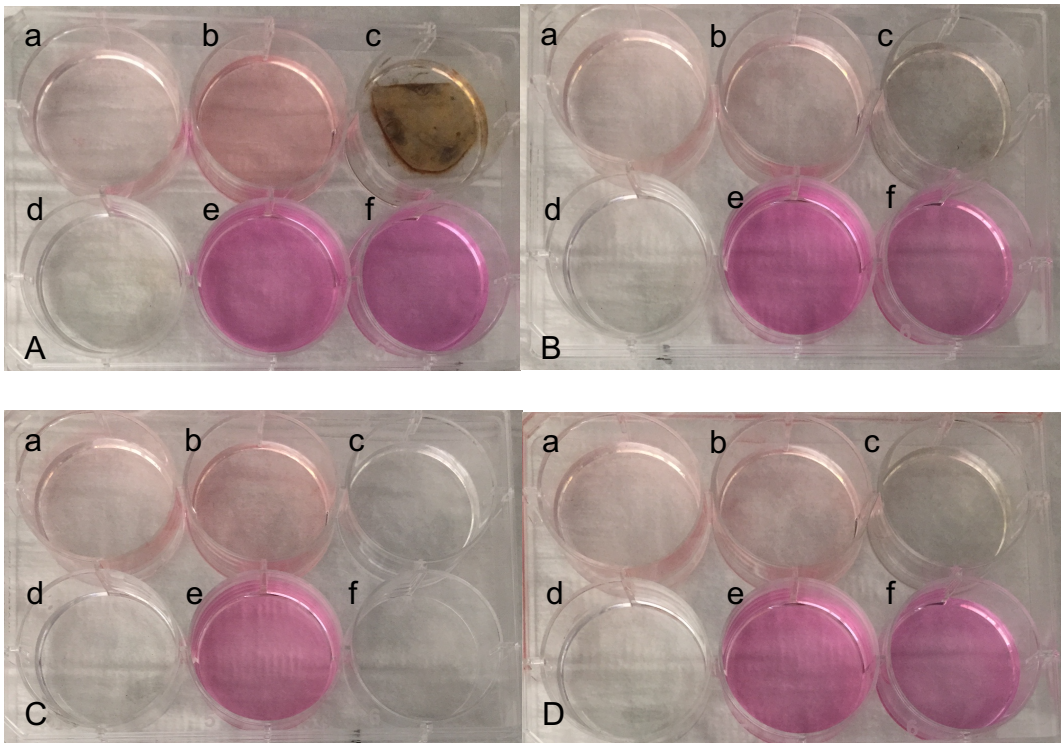


Abbildung 31: Makroskopische Ansicht nach der Differenzierungsfärbung der Pl 10-19; A: pfMSCs in GMP; B: pfMSCs in Lonza; C: pmMSCs in GMP; D: pmMSCs in GMP; a: Oil Red Färbung – Negativkontrolle; b: Oil Red Färbung; c: Von Kossa Färbung; d: Von Kossa Färbung – Negativkontrolle; e,f: keine Färbung

4.1.4 Adipogene Differenzierung

Fettzellen zeichnen sich durch ihre Fähigkeit aus, Lipidvesikel zu bilden und Fett darin speichern zu können. Diese Lipidvesikel lassen sich durch eine Oil Red O Färbung nachweisen. Besteht eine adipogene Differenzierungsfähigkeit der pMSCs, können diese Lipidvesikel im Zytoplasma der Zellen nachgewiesen werden.

In Abbildung 32-35 kann man das mikroskopische Ergebnis der Differenzierungsfärbung sehen. In fast allen Kulturen, mit Ausnahme der fetalen Fraktion in Lonza-Medium, trugen 70-80% der Zellen gefärbte Lipidvesikel. In der fetalen Lonzafraktion konnten nur 40-50% der Zellen gefärbt werden.

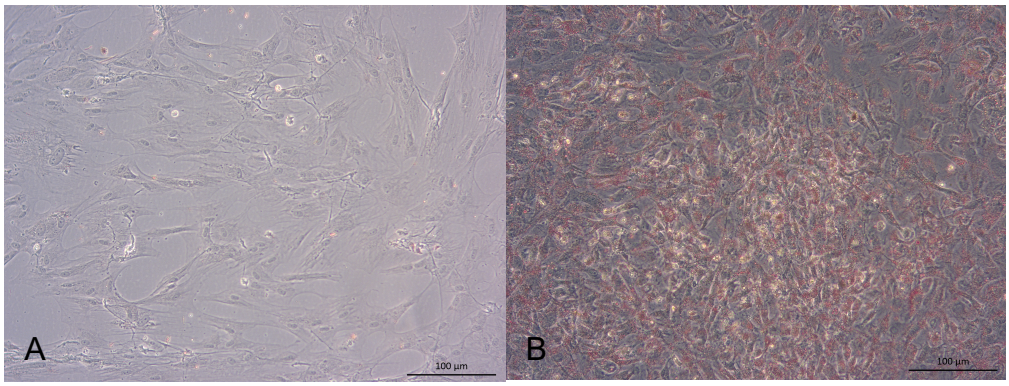


Abbildung 32: Adipogene Differenzierungsfärbung der pfMSCs in GMP der Pl 10-19 an Tag 22; A: Negativkontrolle; B: Färbung der in Differenzierungsmedium kultivierten Zellen

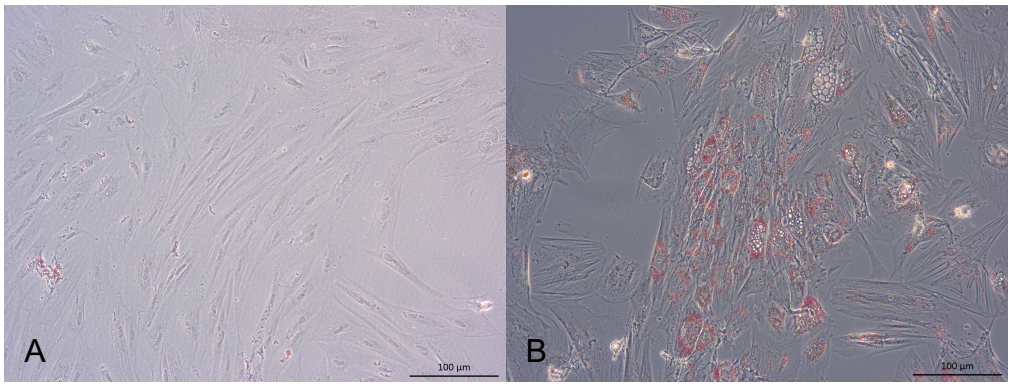


Abbildung 33: Adipogene Differenzierungsfärbung der pfMSCs in Lonza der Pl 10-19 an Tag 22; A: Negativkontrolle; B: Färbung der in Differenzierungsmedium kultivierten Zellen

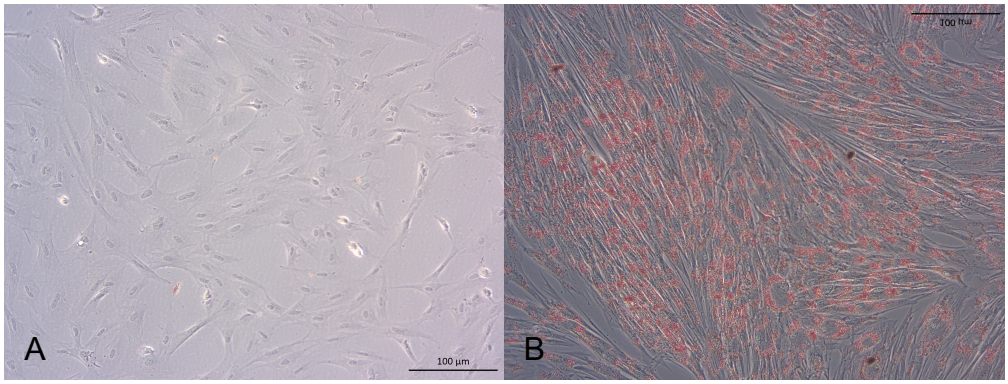


Abbildung 34: Adipogene Differenzierungsfärbung der pmMSCs in GMP der Pl 10-19 an Tag 22; A: Negativkontrolle; B: Färbung der in Differenzierungsmedium kultivierten Zellen

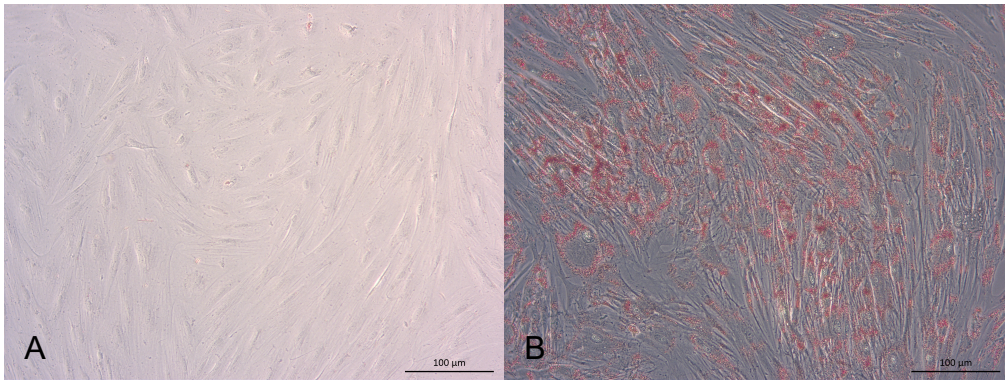


Abbildung 35: Adipogene Differenzierungsfärbung der pmMSCs in Lonza der Pl 10-19 an Tag 22; A: Negativkontrolle; B: Färbung der in Differenzierungsmedium kultivierten Zellen

Zelltyp/Medium	Oil Red O Färbung
pfMSCs/GMP	1/5 schwach **3/5 mittel** 1/5 stark
pfMSCs/Lonza	**2/3 schwach** 1/3 mittel
pmMSCs/GMP	1/5 schwach **3/5 mittel** 1/5 stark
pmMSCs/Lonza	1/5 schwach **4/5 mittel**

Tabelle 8: Qualitative Auswertung der mikroskopischen adipogenen Differenzierungsfärbungen der PI 08-19 – PI 12-19; pfMSC/Lonza wurde bei PI 11-19/12-19 verworfen und konnte nicht gefärbt werden; schwach: 40-60% gefärbt; mittel: 70-80% gefärbt; stark: 90-100% gefärbt

4.1.5 Osteogene Differenzierung

Osteoblasten zeichnen sich durch die Eigenschaft aus, Hydroxyapatit in die extrazelluläre Matrix einbauen zu können. Dies macht man sich bei der Von-Kossa Färbung zu Nutze. Sind die pMSCs in der Lage osteogen zu differenzieren, kann man diese calziumhaltigen Strukturen nachweisen. Bei der Von Kossa-Färbung wird durch die Zugabe von Silbernitrat, Silber an die gebildeten Calciumpräzipitate angelagert und durch Zugabe von Natriumcarbonat zu elementarem Silber reduziert. Dadurch erscheint Calcium im Lichtmikroskopiebild schwarz.

Die Abbildungen 36-38 zeigen die mikroskopischen Ergebnisse. Wie oben beschrieben, war eine Färbung der maternalen Zellfraktion in GMP-Medium aufgrund einer frühzeitigen Zellablösung nicht möglich.

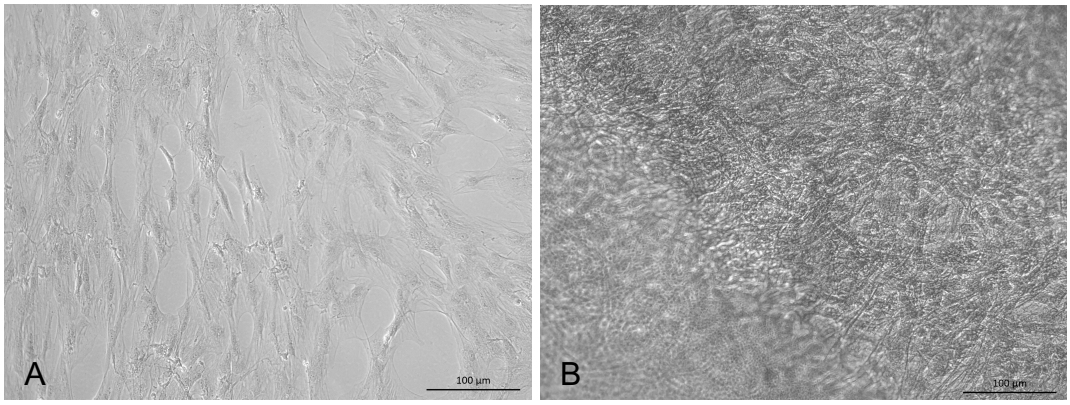


Abbildung 36: Osteogene Differenzierungsfärbung der pfMSCs in GMP der Pl 10-19 an Tag 22; A: Negativkontrolle; B: Färbung der in Differenzierungsmedium kultivierten Zellen

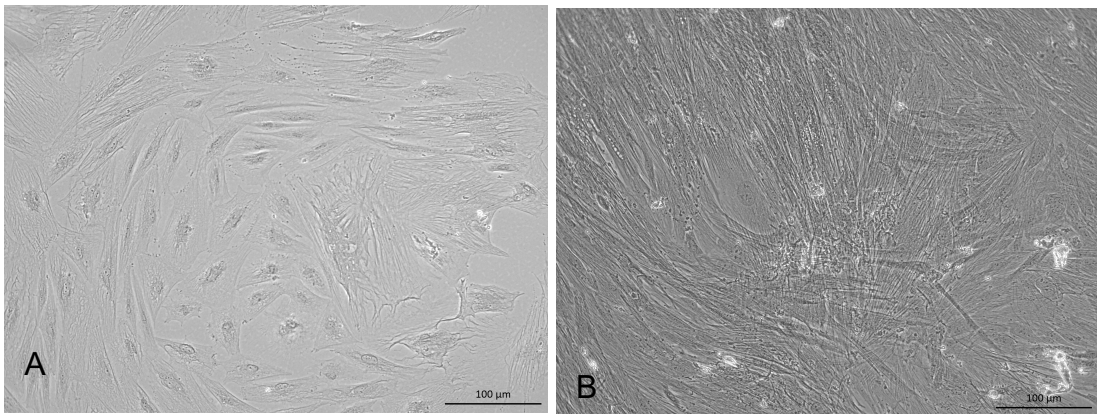


Abbildung 37: Osteogene Differenzierungsfärbung der pfMSCs in Lonza der Pl 10-19 an Tag 22; A: Negativkontrolle; B: Färbung der in Differenzierungsmedium kultivierten Zellen

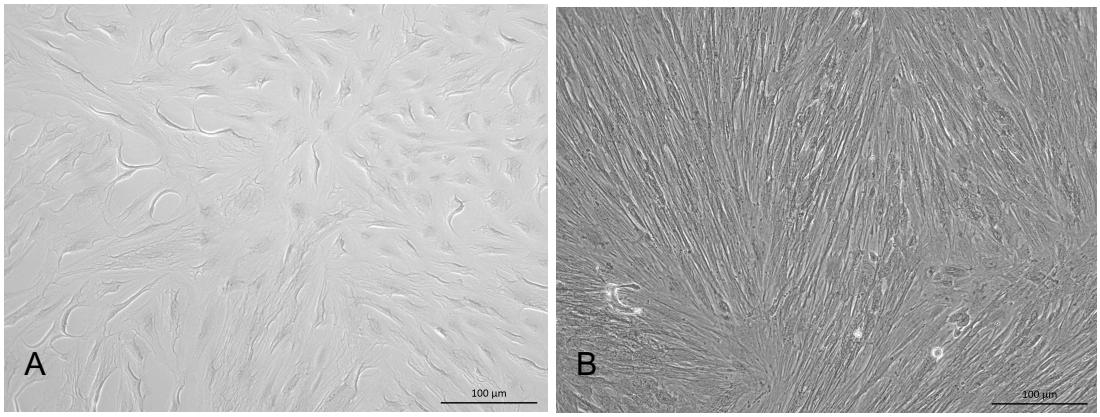


Abbildung 38: Osteogene Differenzierungsfärbung der pmMSCs in Lonza der Pl 10-19 an Tag 22; A: Negativkontrolle; B: Färbung der in Differenzierungsmedium kultivierten Zellen

Zelltyp/Medium	Von Kossa Färbung
pfMSCs/GMP	1/5 schwach **3/5 mittel** 1/5 stark
pfMSCs/Lonza	**2/3 schwach** 1/3 mittel
pmMSCs/Lonza	2/5 schwach **3/5 mittel**

Tabelle 9: Qualitative Auswertung der mikroskopischen osteogenen Differenzierungsfärbungen der Pl 08-19 – Pl 12-19; pfMSC/Lonza der Pl 11-19/12-19 und pmMSC/GMP wurde verworfen und konnte nicht gefärbt werden; schwach: 40-60% gefärbt; mittel: 70-80% gefärbt; stark: 90-100% gefärbt

4.2 Durchflusszytometrische Charakterisierung

Bei der Durchflusszytometrie wurden die jeweiligen Zellpopulationen auf ihre Oberflächenmolekülexpression in vitro untersucht. Eine vollständige Analyse mit den in Kapitell 2.2.6 aufgeführten Antikörpern wurde mit den Plazenten Pl 08-19 – 10-19 durchgeführt. Bei der durchflusszytometrischen Analyse der Plazenten Pl 11-19 und Pl 12-19 wurden ausschließlich die Oberflächenmarker CD146, CD276 und CD105 untersucht. Die pfMSC-Fraktion kultiviert in Lonza-Medium, konnte aufgrund der oben beschriebenen Zellseneszenz, nur für die Plazenta Pl 08-19 untersucht werden.

4.2.1 Erfüllung der Minimalkriterien nach Dominici

Nach den Minimalkriterien zur Identifikation von ,,multipotenten mesenchymalen stromalen Zellen“, müssen im Phänotyp $\geq$ 95% der Zellen CD105, CD73 und CD90 exprimieren, $\leq$ 2% der Zellen dürfen CD45, CD34, CD14 oder CD11b, CD79α oder CD19 und HLA-DR exprimieren. (Dominici et al., 2006) 3 Plazenten wurden auf die oben genannten Oberflächenmarker durchflusszytometrisch untersucht. Bei 2 weiteren Plazenten wurde zusätzlich die Expression von CD105 gemessen.

Exemplarisch werden hier die Ergebnisse der Durchflusszytometrie der Plazenta Pl 08-19 der fetalen Fraktion in GMP Medium dargestellt.

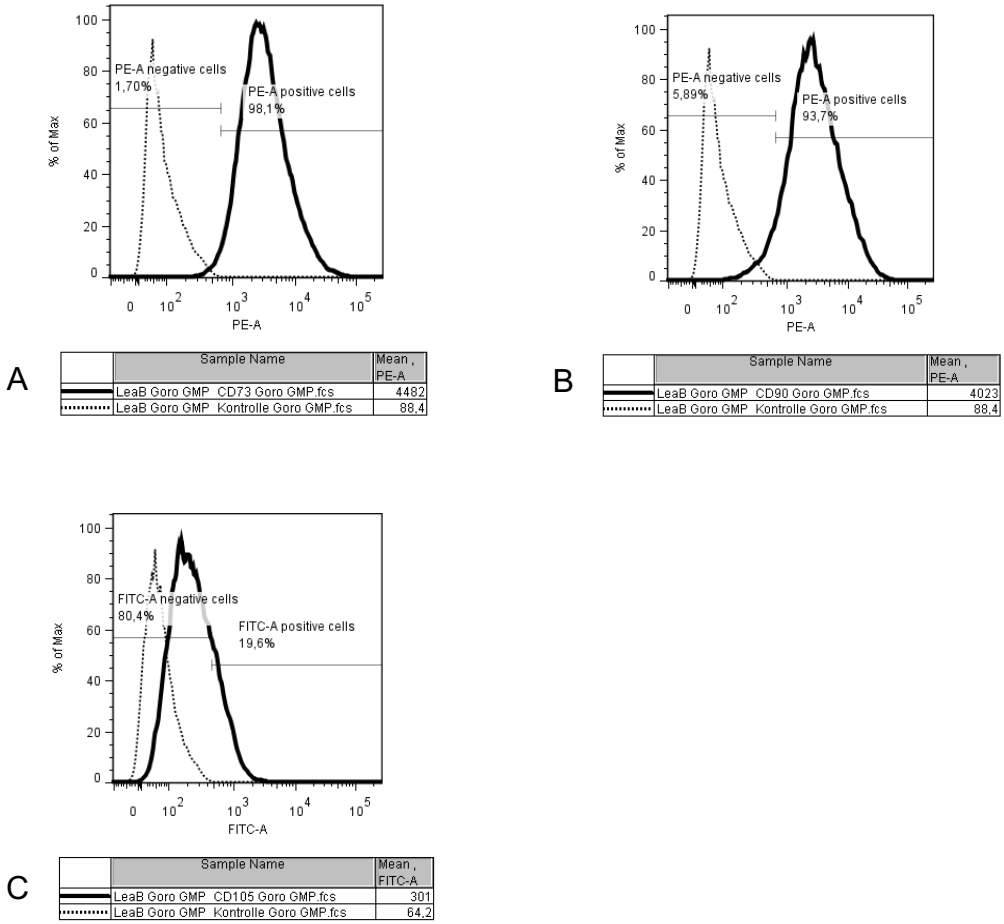


Abbildung 39: Ergebnisse der Durchflusszytometrie der fetalen Fraktion der Pl 08-19, kultiviert in GMP-Medium, Dargestellt sind die untersuchten Positivmarker der Minimalkriterien nach Dominici (≥ 95% Oberflächenmolekülexpression), die dicke schwarze Linie stellt die Fluoreszenz der Positivkontrolle dar, die gepunktete Linie die jeweilige Negativkontrolle ohne Markierung; A: CD73 Oberflächenmolekülexpression, B: CD90 Oberflächenmolekülexpression, C: CD105 Oberflächenmolekülexpression

Wie hier exemplarisch zu erkennen ist, konnte die Bedingung einer ≥ 95%igen Expression nicht in jedem Fall erfüllt werden. CD73 wurde fast in 8 von 10 Fällen ≥ 95% exprimiert, CD105 in keinem Fall. In der CD105-Expression konnten Schwankungen zwischen 20-91% gemessen werden. Es konnte eine höhere Expression von CD105 in der maternalen Fraktion kultiviert in GMP-Medium im Vergleich zur fetalen Zellfraktion kultiviert in GMP-Medium

nachgewiesen werden, welche allerdings mit einem p-Wert von 0,0878617 nicht signifikant war. Die Expression des CD90 Oberflächenmoleküls unterschied sich in der maternalen Fraktion in Abhängigkeit vom entsprechenden Medium signifikant. Hier wurde im Mittel signifikant mehr CD90 im Lonza-Medium exprimiert als im GMP-Medium. Der im T-Test ermittelte p-Wert lag bei 0,00748846. Eine Expression ≥ 95% wurde in einem Fall, in der maternalen GMP-Fraktion, erreicht.

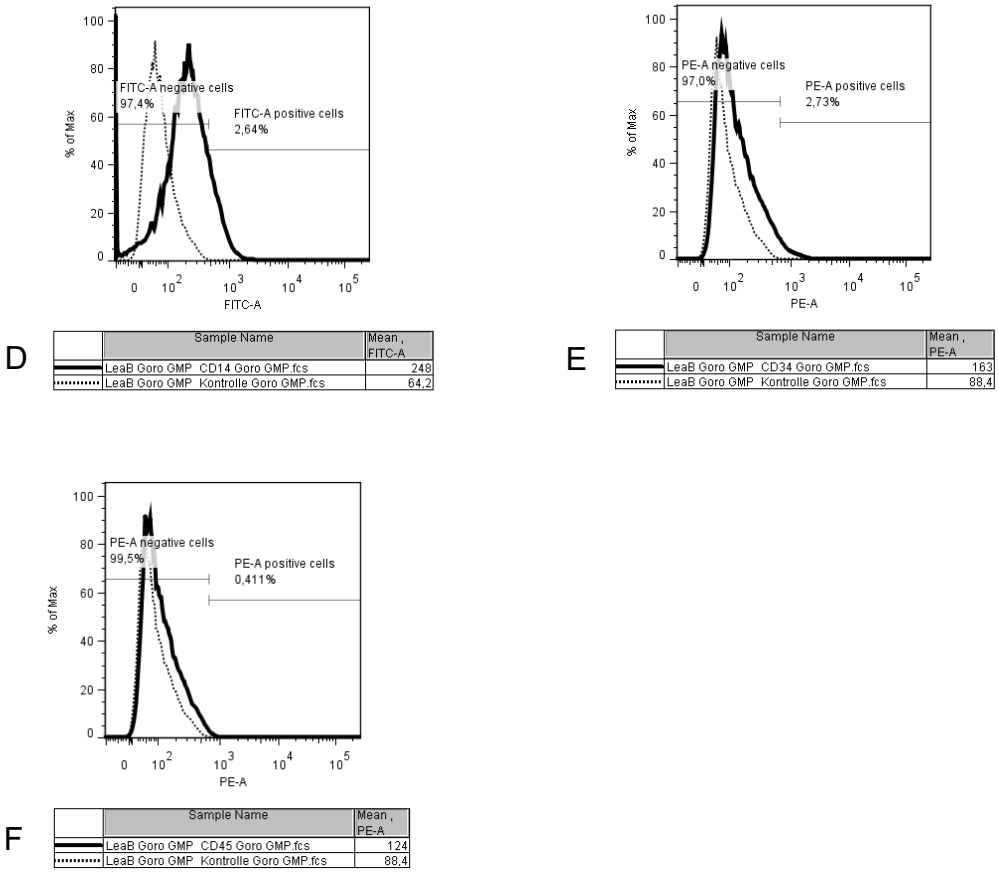
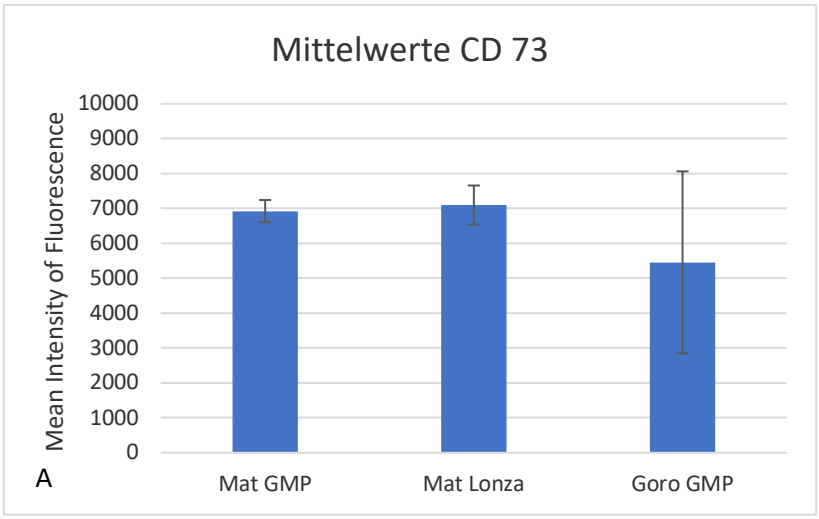


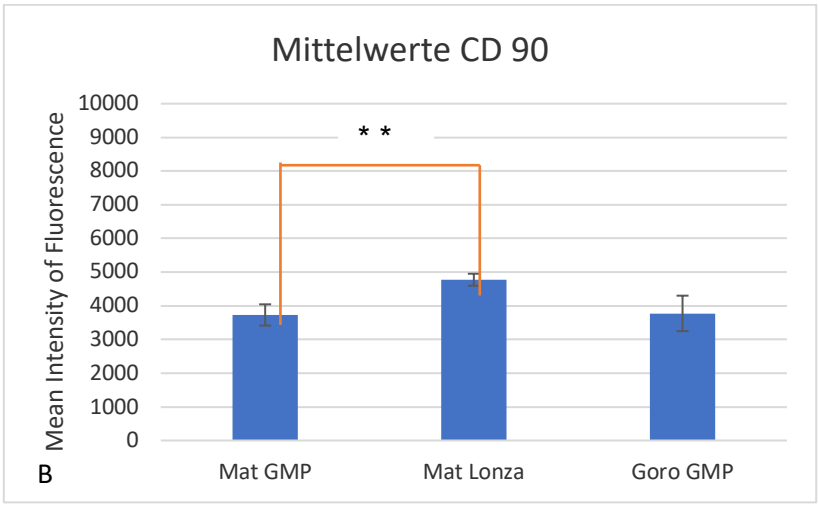
Abbildung 40: Ergebnisse der Durchflusszytometrie der fetalen Fraktion der PI 08-19, kultiviert in GMP-Medium, Dargestellt sind die untersuchten Negativmarker der Minimalkriterien nach Dominici (≤ 2 % Oberflächenmolekülexpression), die dicke schwarze Linie stellt die Fluoreszenz der Positivkontrolle dar, die gepunktete Linie die jeweilige Negativkontrolle ohne Markierung durch ein Fluorochrom; D: CD14 Oberflächenmolekülexpression, E: CD34 Oberflächenmolekülexpression, F: CD45 Oberflächenmolekülexpression

Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Expression der untersuchten Negativmarker CD14, CD34 und CD45 nachgewiesen werden.

CD14 wurde in der fetalen GMP-Fraktion in jedem Fall über 2% exprimiert. Im Lonza-Medium wurde nie eine CD14-Expression ≥ 2% gemessen. Die fetale Fraktion in GMP-Medium erreichte nie einen Wert ≤ 2%, die maternale GMP-Fraktion nur in 2 von 3 Fällen. Eine Expression des CD34 Oberflächenmarkers ≤ 2% wurde im Lonza-Medium immer erreicht werden, im GMP-Medium nie. In allen Fällen wurde eine CD45 Expression ≤ 2% erreicht.

In den folgenden Balkendiagrammen sind die Mittelwerte der Mean Intensity of Flourescence (MFI) aufgetragen. Der Mean-Wert gibt an, wie viele Fluorochrommoleküle an einen Partikel gebunden haben, da die Floureszenzintiensität direkt proportional zur Anzahl der gebunden Fluorochrome ist.





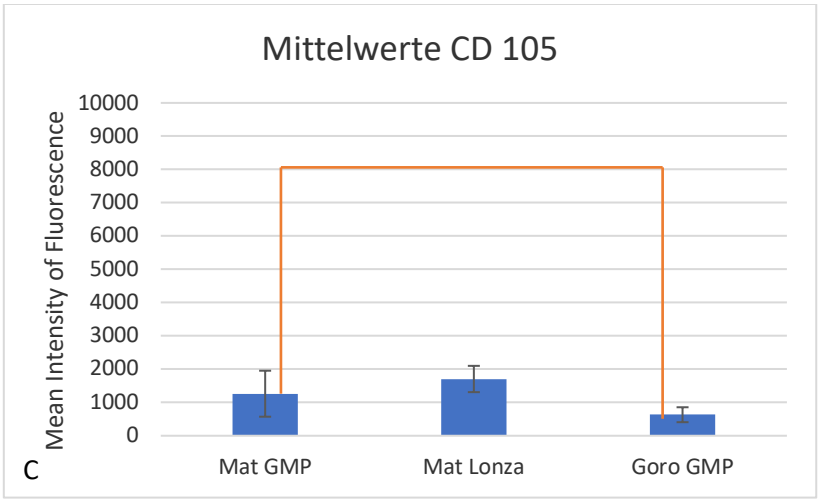
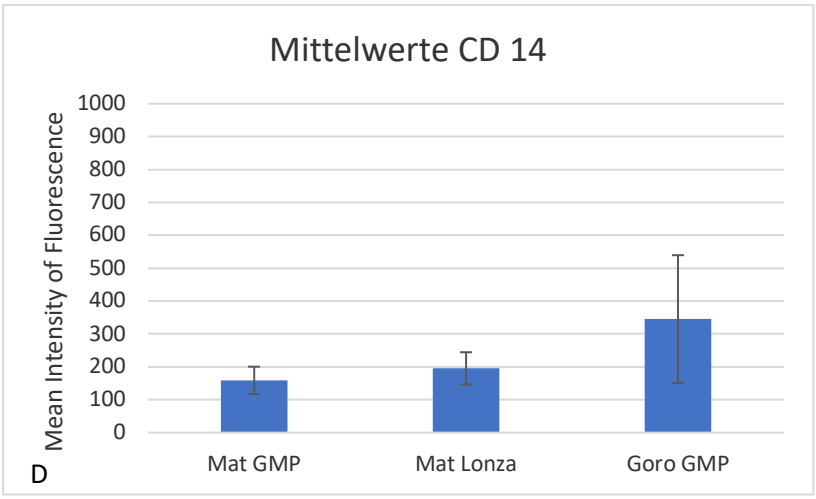
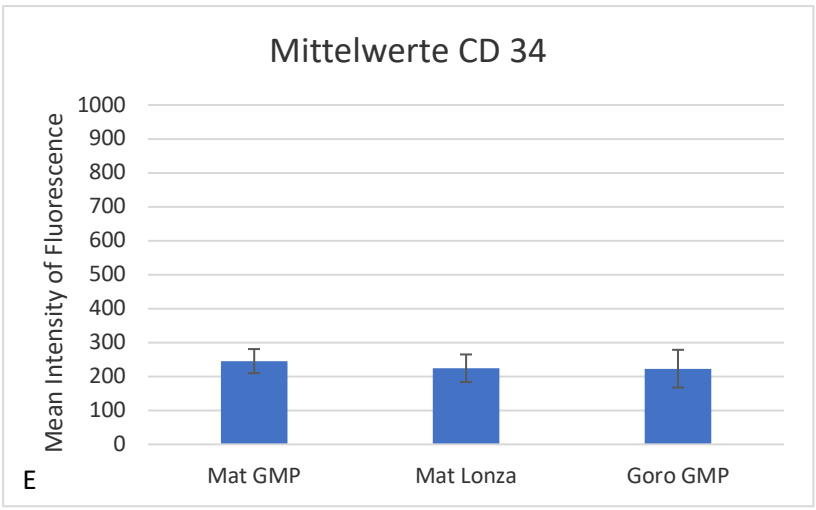


Abbildung 41: Mittelwerte der Mean Intensitiy of Flourescence (MFI) mit eingetragener Standartabweichung (schwarze Linie) und Signifikanz (orangene Linie), Dargestellt in einer absoluten Skalierung, A:Mittelwerte der CD73-Expression von PI 08-19 – PI 10-19; B: Mittelwerte der CD90-Expression von PI 08-19 – 10-19 ** = sehr signifikant; C: Mittelwerte der CD105-Expression von PI 08-19 – PI 12-19





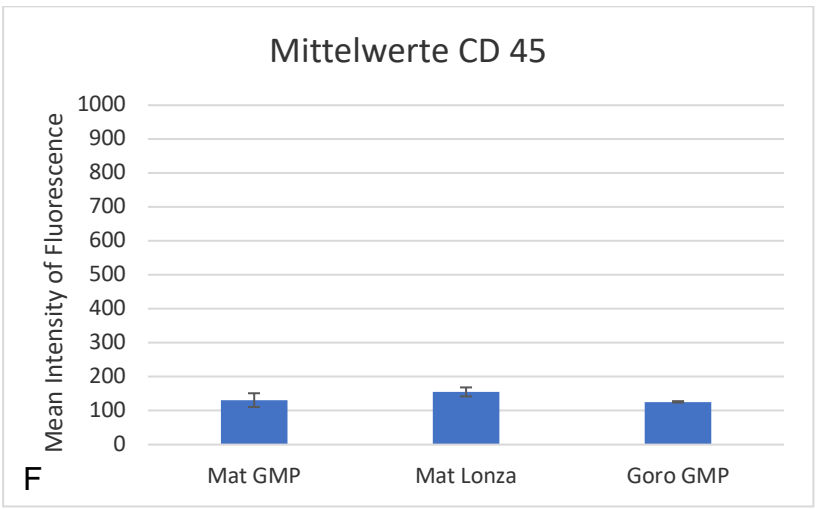


Abbildung 42: Mittelwerte der Mean Intensitiy of Flourescence (MFI) mit eingetragener Standartabweichung (schwarze Linie), Dargestellt in einer absoluten Skalierung, D:Mittelwerte der CD14-Expression von PI 08-19 – PI 10-19; E: Mittelwerte der CD34-Expression von PI 08-19 – 10-19; F: Mittelwerte der CD45-Expression von PI 08-19 – PI 10-19

Oberflächenmarker	T-Test Medien pmMSCs (GMP vs. Lonza)	T-Test Fraktion GMP (pfMSCs vs. pmMSCs)
CD 73	0,6626283	0,38818465
CD 105	0,4120756	0,0878617
CD 90	0,00748846	0,90152978
CD 14	0,38364826	0,17956166
CD 34	0,53741012	0,58954672
CD 45	0,15673473	0,69296822

Tabelle 10: Ermittelte P-Werte im T-Test in Abhängigkeit der Mean fluorescence intensity (MFI) der Durchflusszytometrie, ≤ 0,05 = signifikanter Wert; ≤ 0,01 = sehr signifikanter Wert; ≤ 0,001 = hoch signifikanter Wert, rot markiert: Signifikante Werte

4.2.2 Charakterisierung der pMSCs durch Oberflächenproteine

In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass mesenchymale Stammzellen in der Lage sind CD146, CD276 und auch SushiD2 zu exprimieren. Demnach könnten diese Moleküle als potenzielle Stammzellmarker für pMSCs eine Rolle spielen. Es wurden die Zelllinien der Plazenta Pl 08-19 – Pl 12-19 auf die CD146- und CD276-Expression untersucht. Die Untersuchung der SushiD2-Expression wurde mit den Linien der Plazenten Pl 08-19 – Pl 10-19 durchgeführt.

Exemplarisch werden hier die Ergebnisse der Durchflusszytometrie der Pl 08-19 der maternalen Zellfraktion in GMP-Medium vorgestellt.

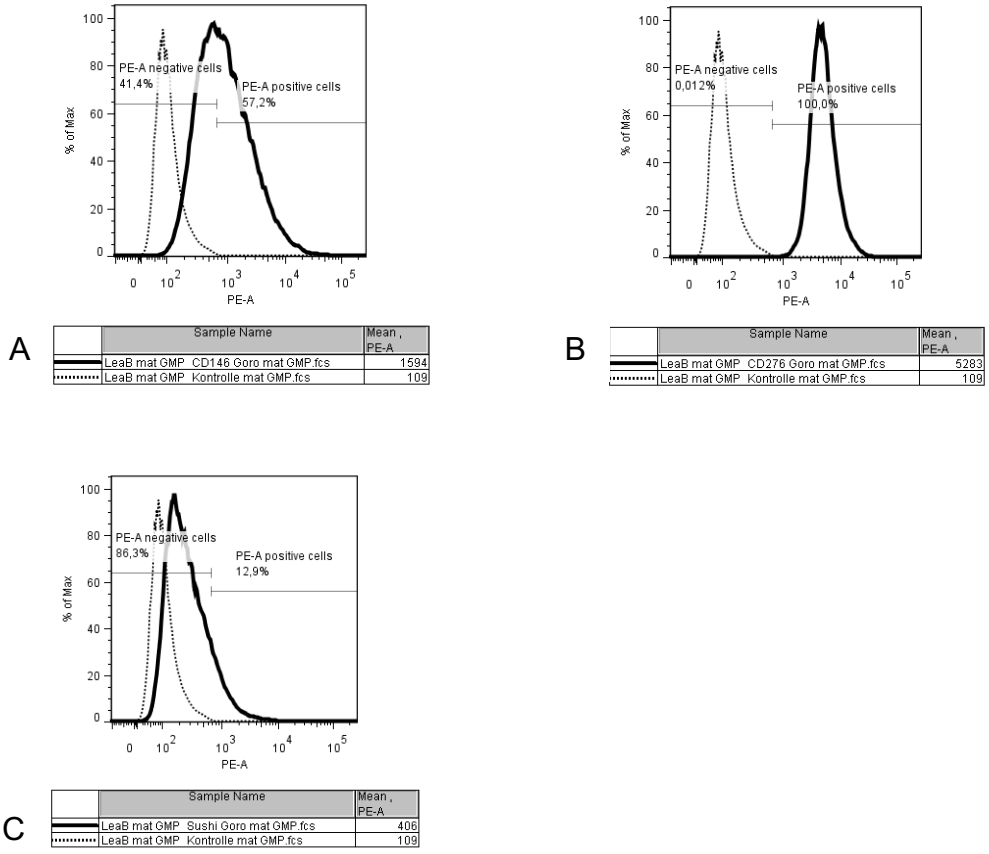
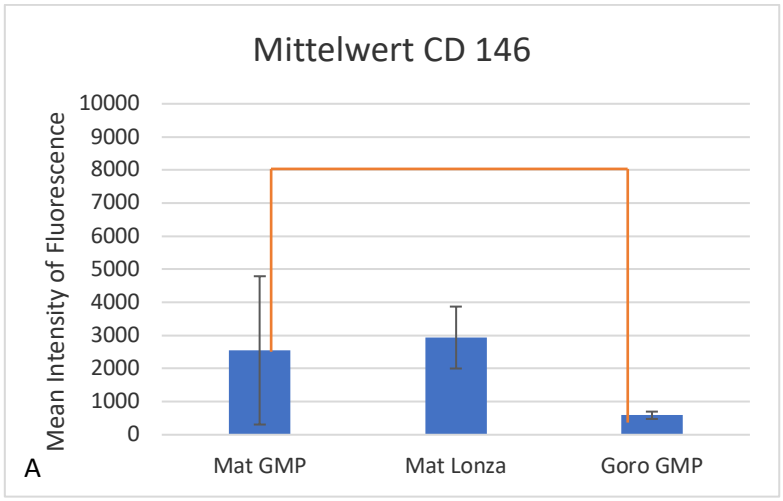
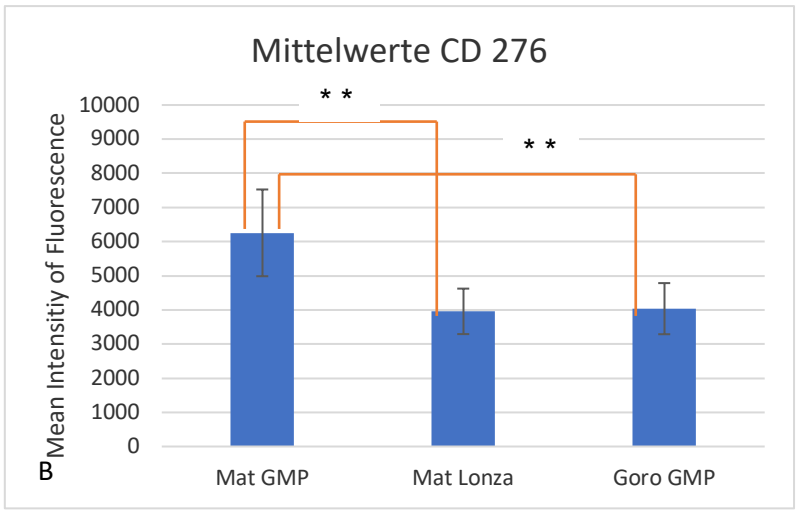


Abbildung 43: Ergebnisse der Durchflusszytometrie der maternalen Fraktion der Pl 08-19, kultiviert in GMP-Medium, Dargestellt sind die potenziellen Stammzellmarker, die dick markierte Linie stellt die Fluoreszenz der Positivkontrolle dar, die gepunktete Linie die jeweilige Negativkontrolle ohne Markierung durch ein Fluorochrom; A: CD146 Oberflächenmolekülexpression, B: CD276 Oberflächenmolekülexpression, C: SushiD2 Oberflächenmolekülexpression

Auffällig war eine sehr starke CD276-Expression von bis zu 100% in allen Zelllinien und eine sehr schwache ShushiD2- Expression von maximal 28%. Die CD146-Expression lag bei Werten zwischen 20 – 75%. In der maternalen GMP-Fraktion wurde im Mittel mehr CD146 exprimiert als in der fetalen GMP-Fraktion, allerdings ergeben sich im T-Test keine signifikanten Werte. Signifikant war eine höhere Expression von CD 276 in der maternalen Zellpopulation kultiviert in GMP, im Vergleich zur Zellkultur in Lonza-Medium, mit einem p-Wert von 0,00714662. Im GMP-Medium wurde im Mittel signifikant mehr CD 276 in der maternalen Fraktion exprimiert, als in der fetalen Fraktion. Der P-Wert lag hier bei 0,00983584.





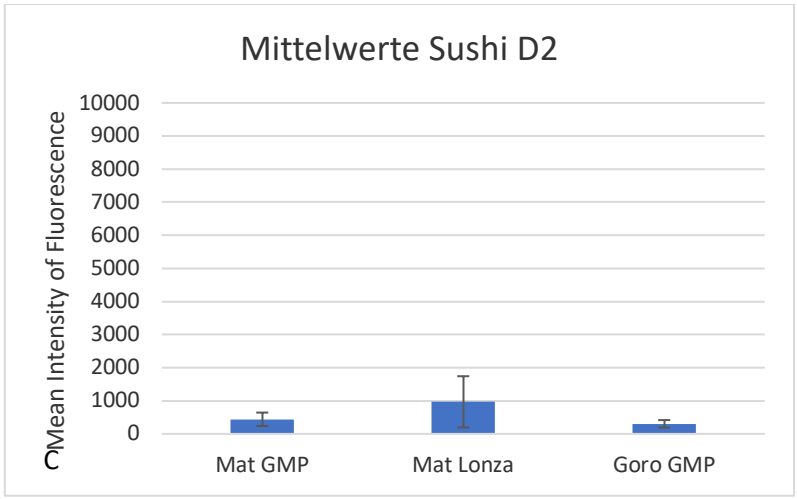


Abbildung 44: Mittelwerte der Mean Intensitiy of Flourescence (MFI) mit eingetragener Standartabweichung (schwarze Linie) und Signifikanz (orangene Linie), Dargestellt in einer absoluten Skalierung, A:Mittelwerte der CD146-Expression von PI 08-19 – PI 12-19; B: Mittelwerte der CD276-Expression von PI 08-19 – 12-19, ** = sehr signifikant; C: Mittelwerte der SushiD2-Expression von PI 08-19 – PI 10-19

Oberflächenmarker	T-Test Medien pmMSCs (GMP vs. Lonza)	T-Test Fraktion GMP (pfMSCs vs. pmMSCs)
CD 146	0,85655074	0,08641673
CD 276	0,00714662	0,00983584
Sushi D2	0,31677392	0,36730661

Tabelle 11: Ermittelte P-Werte im T-Test in Abhängigkeit der Mean fluorescence intensity (MFI) der Durchflusszytometrie, ≤ 0,05 = signifikanter Wert; ≤ 0,01 = sehr signifikanter Wert; ≤ 0,001 = hoch signifikanter Wert, rot markiert: Signifikante Werte

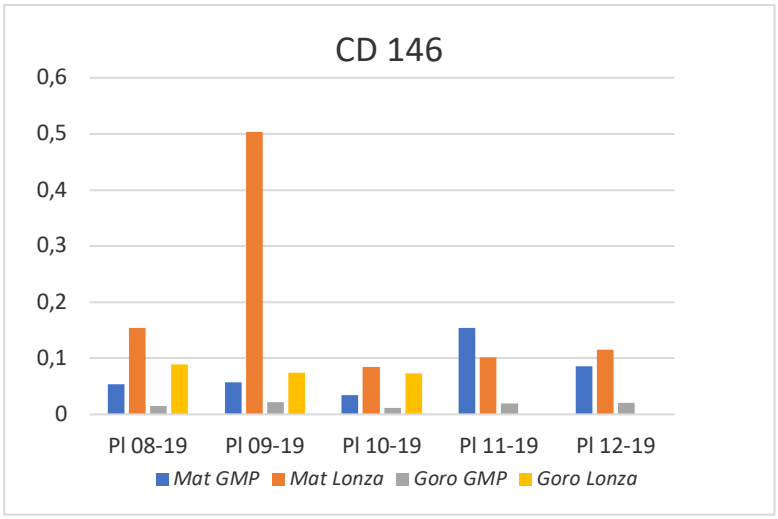
4.3 Quantitative RT-PCR zum Nachweis der Genexpression

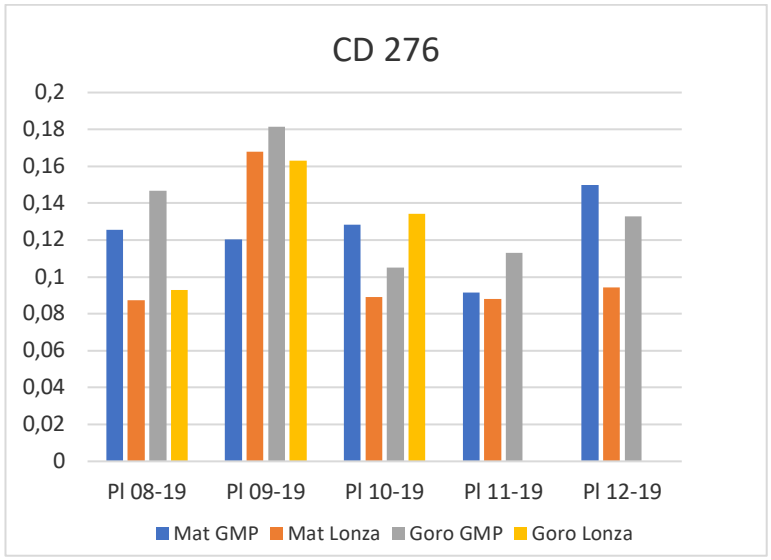
Zur Ermittlung der jeweiligen Genexpression auf Transkriptionsebene wurde eine RT-PCR der Zelllinien aller 5 Plazenten durchgeführt. Dabei wurden die Primer CD146, CD 276 und SushiD2 getestet. Die Effektivität der Primer wurde in vorherigen Versuchen von Mitarbeiter der Arbeitsgruppe ermittelt. Aufgrund der in Kapitel 4.1 beschriebenen Zellseneszenz der fetalen Zellpopulation im Lonza-Medium, konnte keine RT-PCR dieser Population der Plazenten Pl 11-19 und Pl 12-19 durchgeführt werden.

Allgemein zeigte sich ein sehr heterogenes Bild auf Transkriptionsebene. Hochsignifikante Unterschiede zeigten sich im T-Test mit einem p-Wert von 0,00000898025 bei der CD146-Expression der pfMSCs. Hier wurde im Lonza-Medium signifikant mehr CD146 exprimiert, als im GMP-Medium. Im GMP-Medium exprimierten die maternalen Zellen im Mittel signifikant mehr CD146 als die fetalen.

Aufgrund der starken Wertabweichungen der Pl 09-19 von den anderen Werten, wurde ein weiterer T-Test mit Ausnahme dieser Werte durchgeführt. Dadurch erhielt man weitere signifikante Werte in der CD276-Expression. Mit einem p-Wert von 0,03144883 wurde in der pmMSC-Fraktion in GMP mehr CD276 exprimiert als im Lonza-Medium.

SushiD2 wurde im Mittel im Lonza-Medium etwas höher exprimiert als im GMP-Medium. Die maternalen MSCs exprimierten im Mittel etwas mehr SushiD2 als die fetalen MSCs. Die Werte wiesen allerdings eine breite Streuung auf und waren nicht signifikant.





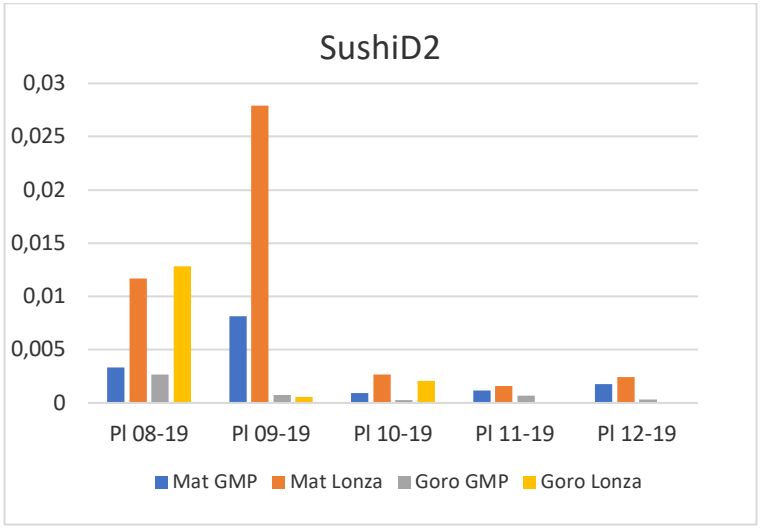
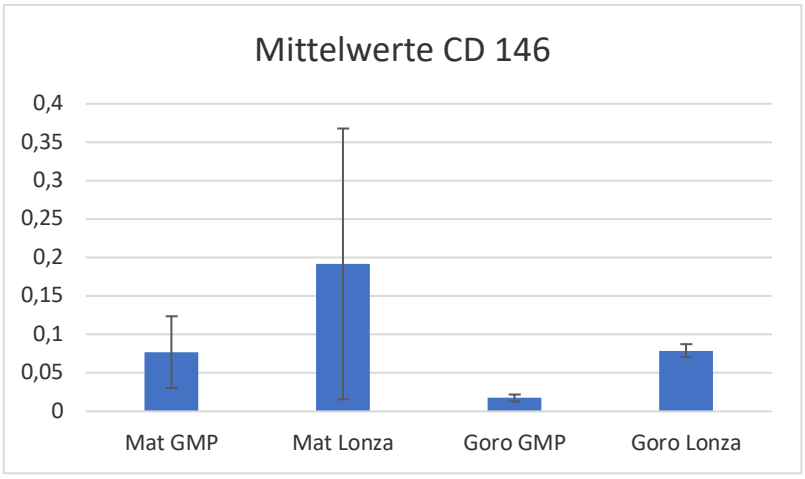
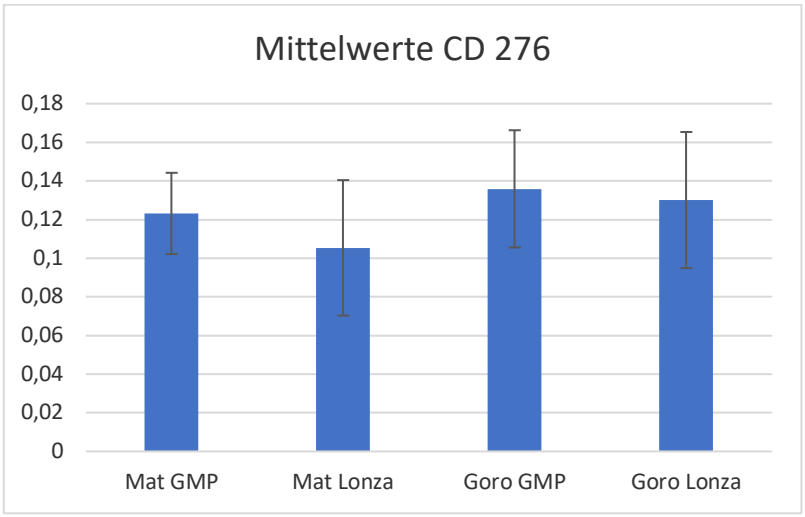


Abbildung 45.: Target/Reference der einzelnen RT-PCRs der Plazenten Pl 08-19 – Pl 12-19, Mat entspricht hier der pmMSC-Fraktion; Goro entspricht hier der pfMSC-Fraktion





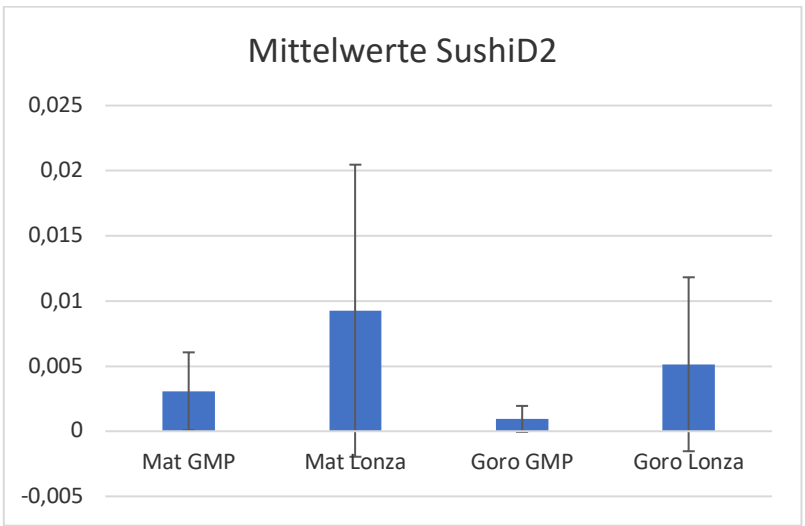


Abbildung 46: Mittelwerte der Target/Reference der PI 08-19 und PI 10-19 – PI 12-19, Eingetragen ist außerdem die jeweilige Standardabweichung (schwarze Linie)

4.4 Immunhistochemische Darstellung der pMSCs

Zur Untersuchung der Oberflächenmolekülexpression in vivo, wurden Gefrierschnitte von Gewebeproben der fetalen äußeren Chorionschicht und des maternalen intervillösen Raums der Plazenta Pl 10-19 – Pl 12-10 angefertigt. Diese wurden anschließend mit Antikörpern gegen CD90, CD 105, CD73, CD271, CD146, CD276 und NG2 gefärbt und mit dem Immunfluoreszenz-mikroskop dargestellt. Ziel war hier die Untersuchung der Oberflächenmolekül-expression im Vergleich der maternalen zur fetalen Zellfraktion und die Erfüllung der Minimalkriterien in vivo. CD276 könnte hier perspektivisch einen weiteren potenzieller MSC-Marker darstellen. Die Zellkerne wurden mit Dapi eingefäbt.

4.4.1 Expression der MSC Marker nach Dominici

Untersucht wurden die Positivmarker CD90, CD73 und CD105 in vivo. Sowohl im maternalen, als auch im fetalen Gefrierschnitt konnte ein spezifisches Signal des CD90, des CD73 und des CD105 Oberflächenmarkers in allen 3 Plazenten detektiert werden.

CD90 – positive Zellen konnten sowohl im kollagenen Bindegewebe der äußeren Chorionplatte (Abbildung 47, A), als auch im Zentrum der Chorionzotten im intervillösen Raum (Abbildung 48,C) nachgewiesen werden.

Exemplarisch werden die Aufnahmen der Plazenta Pl 11-19 gezeigt.

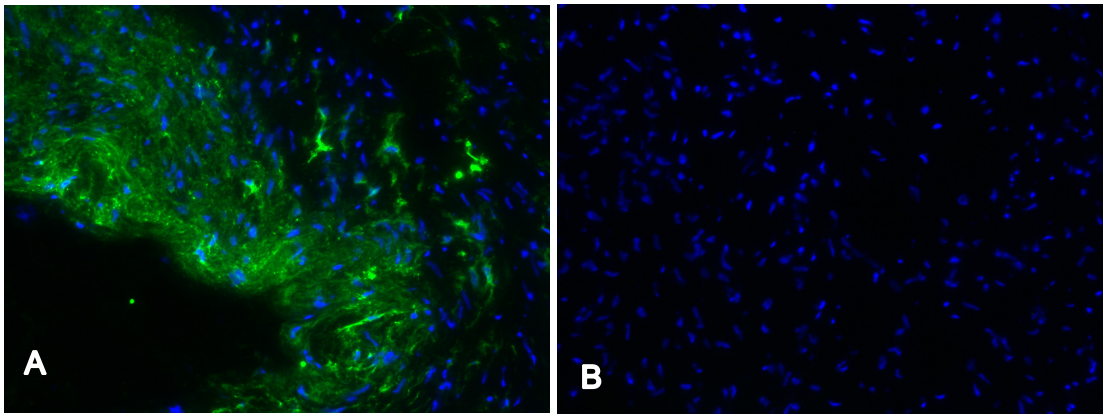


Abbildung 47.: Immunhistochemie eines 10 µm dicken Gefrierschnitts der äußeren Chorionplatte (fetal) der PI 11-19 in 20-facher Vergrößerung, A: Färbung mit Anti-human CD90 Antikörper (Primärantikörper, Markierung: FITC), blau: DAPI; B: Negativkontrolle

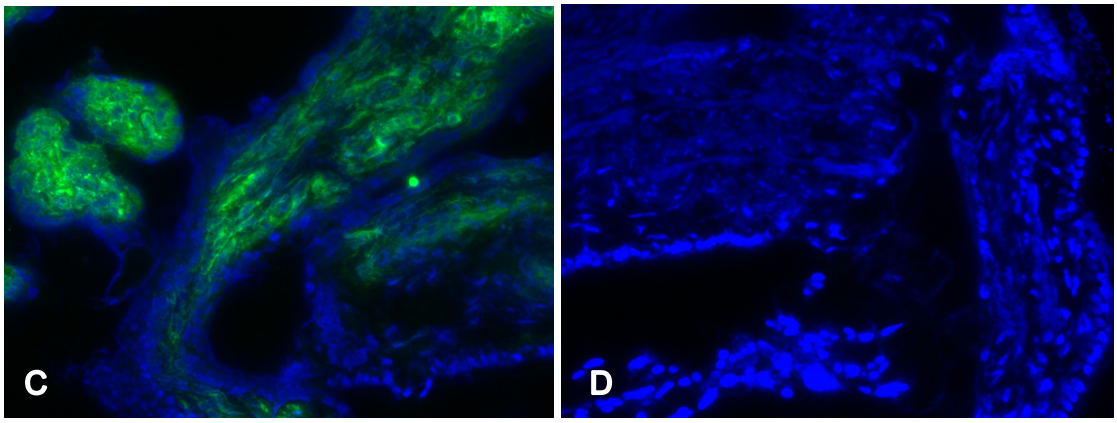


Abbildung 48: Immunhistochemie eines 10 µm dicken Gefrierschnitts des intervillösen Raums (maternal) der PI 11-19 in 20-facher Vergrößerung, C: Färbung mit Anti-human CD90 Antikörper (Primärantikörper, Markierung: FITC), blau: DAPI; D: Negativkontrolle

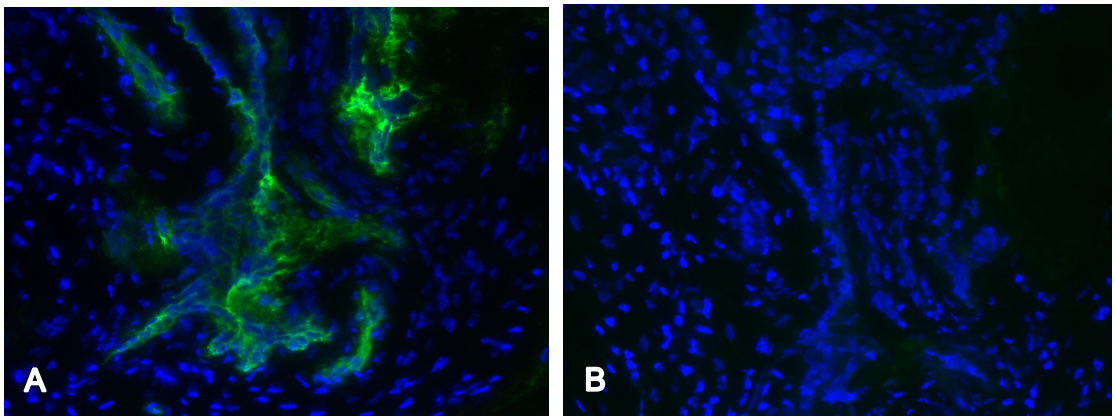


Abbildung 49: Immunhistochemie eines 10 µm dicken Gefrierschnitts der äußeren Chorionplatte (fetal) der PI 11-19 in 20-facher Vergrößerung, A: Färbung mit Anti- human CD 73 Antikörper (unmarkiert), 2. AK: Donkey-anti-mouse F (ab`) Alexa Fluor 488) blau: DAPI; B: Negativkontrolle

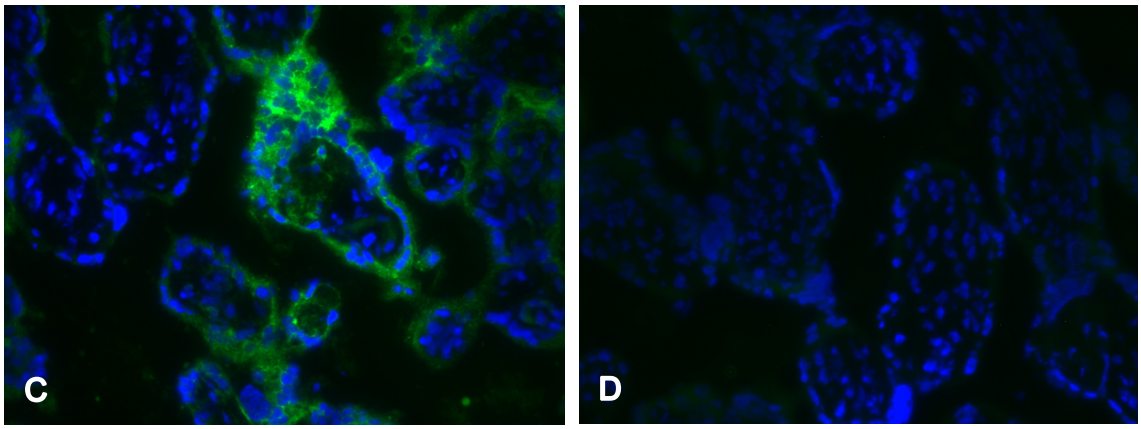


Abbildung 50: Immunhistochemie eines 10 µm dicken Gefrierschnitts des intervillösen Raums (maternal) der PI 11-19 in 20-facher Vergrößerung, C: Färbung mit Anti- human CD 73 Antikörper (unmarkiert), 2. AK: Donkey-anti-mouse F (ab`) Alexa Fluor 488) blau: DAPI; D: Negativkontrolle

Sowohl im kollagenen Bindegewebe der äußeren Chorionplatte (fetaler Teil) (Abbildung 49, A), als auch im intervilliösem Raum (maternaler Teil) (Abbildung 50, C) konnten CD73 – positive Zellen nachgewiesen werden. Dabei schien sich die Färbung in der maternal/fetalen Mischzone auf die Synzytiotrophoblastenzellen zu begrenzen.

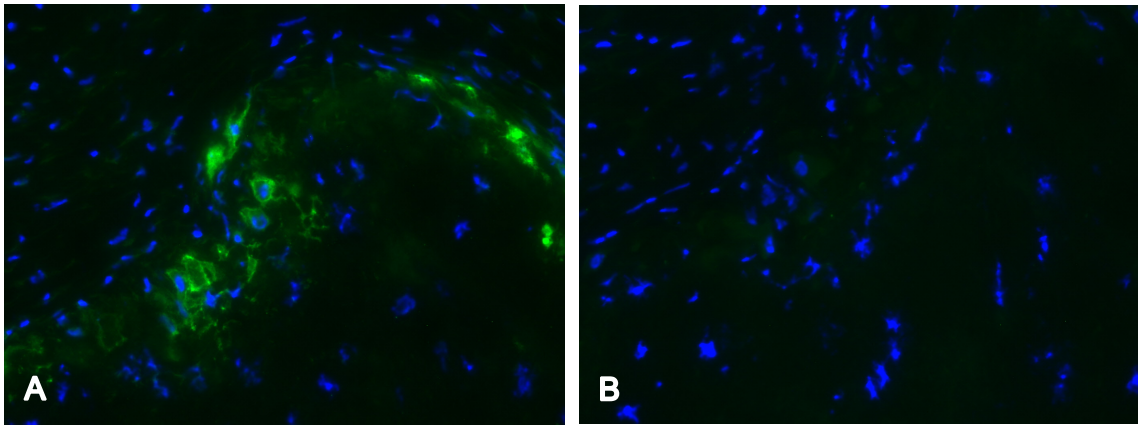


Abbildung 51: Immunhistochemie eines 10 µm dicken Gefrierschnitts der äußeren Chorionplatte (fetal) der PI 11-19 in 20-facher Vergrößerung, A: Färbung mit Anti- human CD 105 Antikörper (unmarkiert), 2. AK Donkey-anti-mouse F(ab`) Alexa Fluor 488) blau: DAPI; B: Negativkontrolle

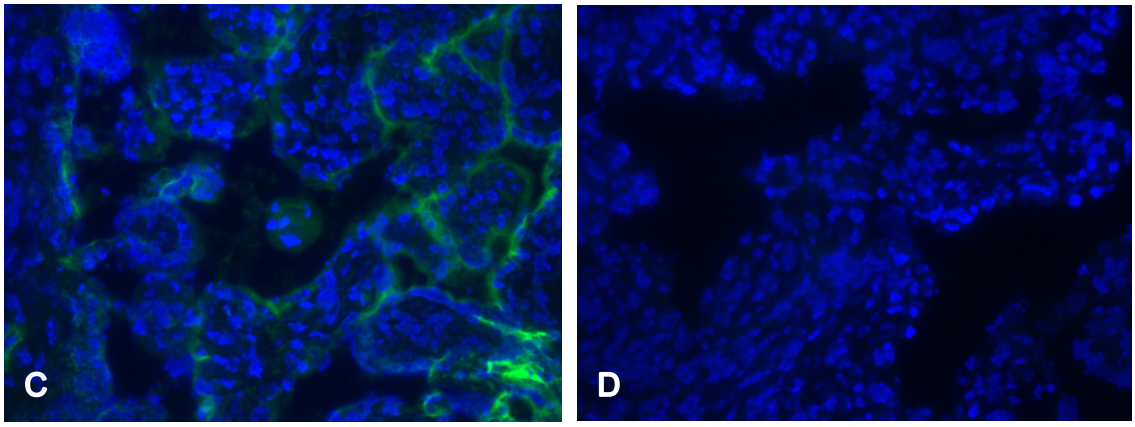


Abbildung 52: Immunhistochemie eines 10 µm dicken Gefrierschnitts des intervillösen Raums (maternal) der PI 11-19 in 20-facher Vergrößerung, C: Färbung mit Anti- human CD 105 Antikörper (unmarkiert), 2. AK Donkey-anti-mouse F(ab`) Alexa Fluor 488) blau: DAPI; D: Negativkontrolle

Der CD105 – Marker gilt sowohl als MSC-Marker, als auch als Marker für den Synzythiotrophoblasten, dessen Zellen sich im intervillösen Raum am Rand der Chorionzotten befinden und ein flaches, isoprismatisches Epithel bilden (Abbildung 52, C). Auch in der fetalen äußeren Chorionplatte konnte dieser Marker spezifisch angefärbt werden (Abbildung 51, A).

4.4.2 Expression von CD 146 im fetalen und maternalen Teil in vivo

Bei der in vivo Expression von CD146 konnten qualitative Unterschiede zwischen der Expression im fetalen zum maternalen Gewebeschnitt festgestellt werden. Dabei wurde in 2 von 3 Fällen eine stärkere spezifische Immunhistochemische Färbung des CD146 - Markers im maternalen Teil beobachtet.

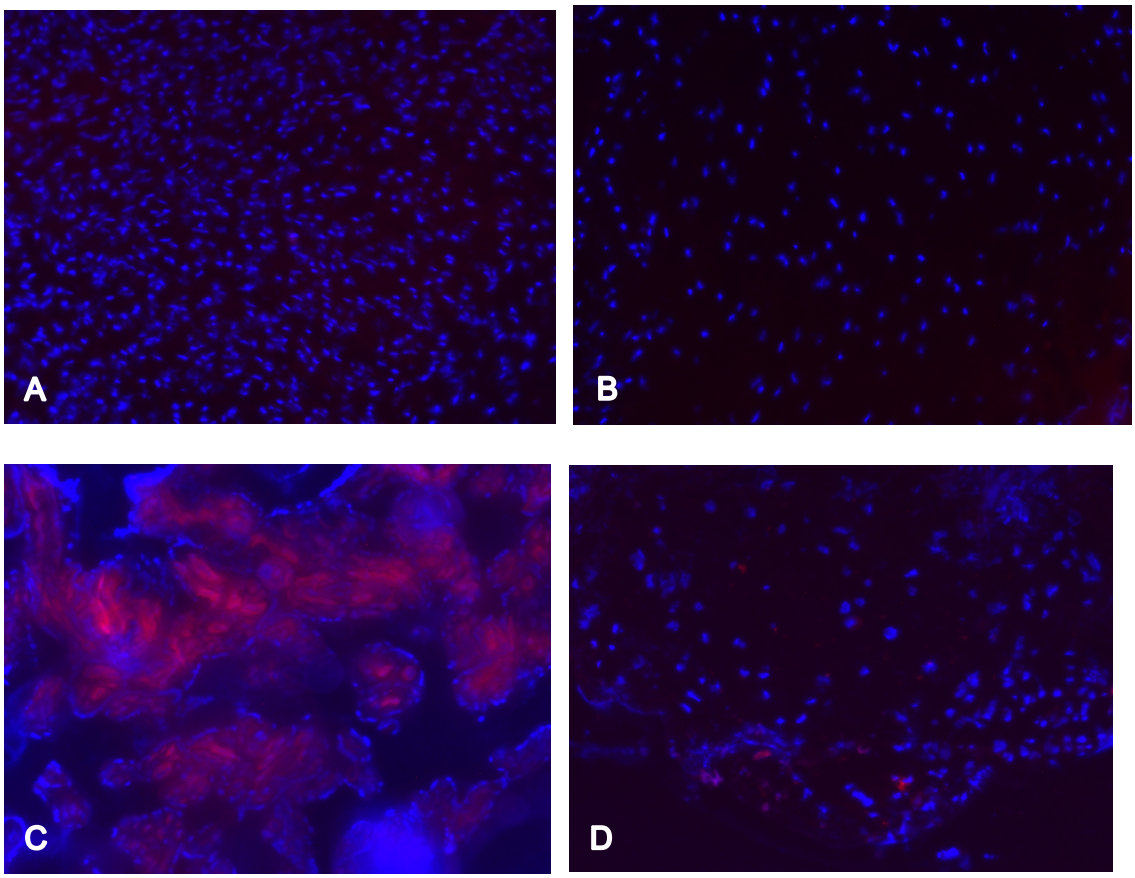


Abbildung 53: Immunhistochemie mehrerer 10µm dicken Gefrierschnitte aus der Plazenta Pl 10-19, 10 x Vergrößerung, blau: Dapi , A: äußere Chorionplatte (fetal) mit Färbung durch Anti-human CD146 Antikörper (markiert mit PE); B: Negativkontrolle von A; C: intervillöser Raum (maternal) mit Färbung durch Anti-human CD146 Antikörper (markiert mit PE); D: Negativkontrolle von C

Die Färbung CD146-positiver Zellen beschränkte sich auf das Zentrum der Chorionzotten im maternalen Anteil der Plazenta, welches bindegewebig mit Mesenchymzellen, Fibroblasten, Makrophagen und Kapillaren durchzogen war.

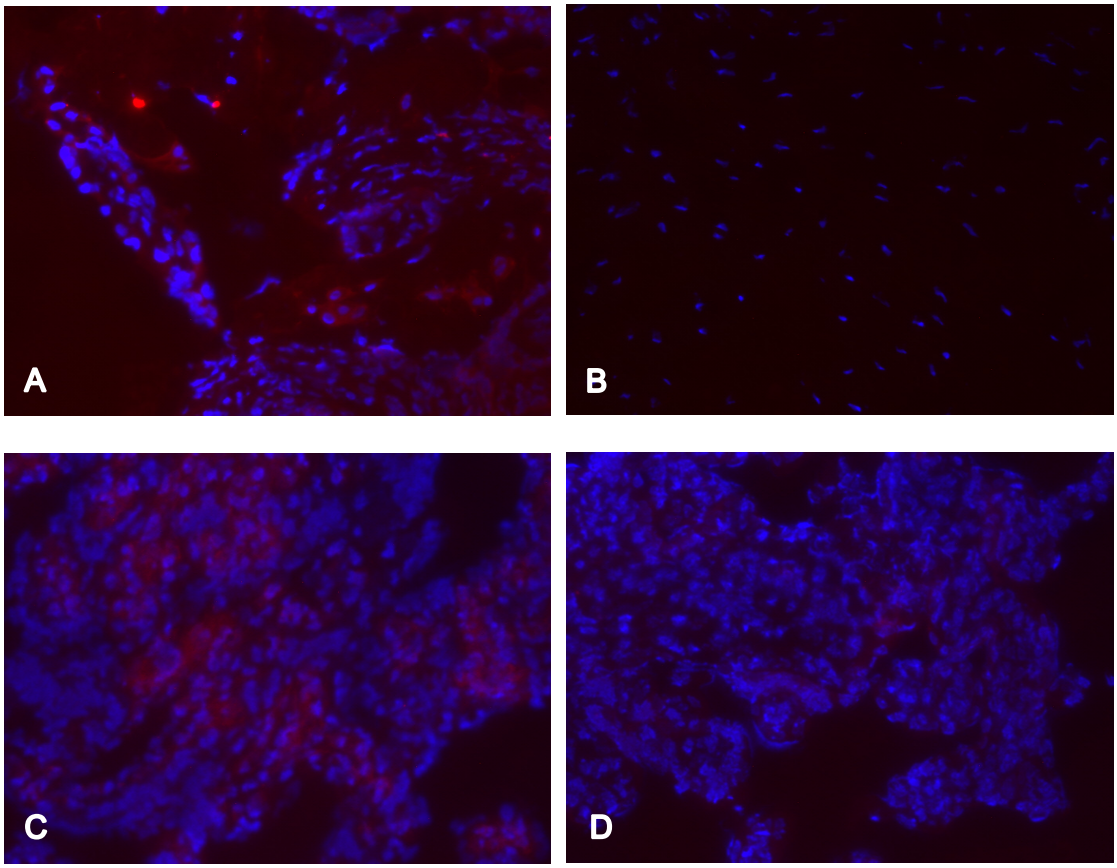


Abbildung 54: Immunhistochemie mehrerer 10µm dicken Gefrierschnitte aus der Plazenta Pl 11-19, 20 x Vergrößerung, blau: Dapi , A: äußere Chorionplatte (fetal) mit Färbung durch Anti-human CD146 Antikörper (markiert mit PE); B: Negativkontrolle von A; C: intervillöser Raum (maternal) mit Färbung durch Anti-human CD146 Antikörper (markiert mit PE); D: Negativkontrolle von C

Bei der Plazenta Pl 11-19 zeigte sich eine eher schwache, diffuse Färbung sowohl im fetalen als auch im maternalen Anteil.

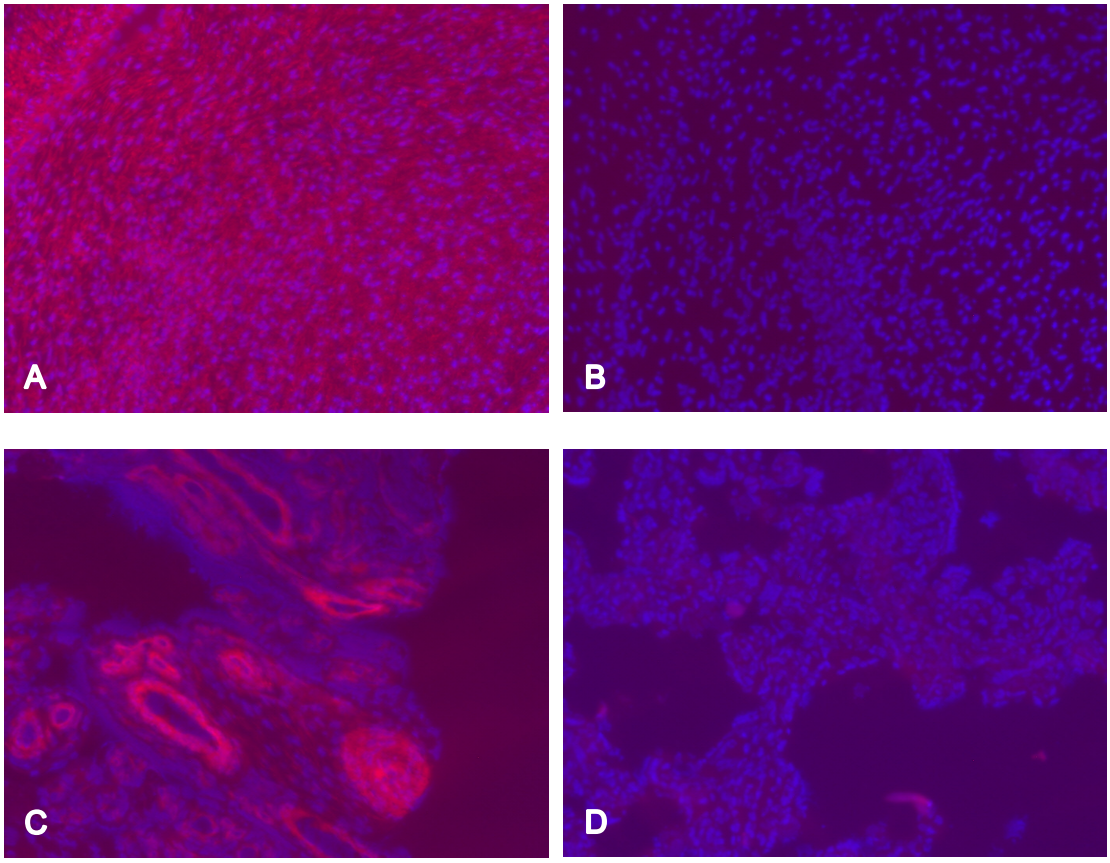


Abbildung 55: Immunhistochemie mehrerer 10µm dicken Gefrierschnitte aus der Plazenta Pl 12-19, 10 x Vergrößerung, blau: Dapi , A: äußere Chorionplatte (fetal) mit Färbung durch Anti-human CD146 Antikörper (markiert mit PE); B: Negativkontrolle von A; C: intervillöser Raum (maternal) mit Färbung durch Anti-human CD146 Antikörper (markiert mit PE); D: Negativkontrolle von C

Bei der Plazenta Pl 12-19 konnte eine zellreiche, bindegewebig erscheinende Struktur mit vielen CD146 – positiven Zellen im fetalen Anteil dargestellt werden. Im maternalen Anteil konnten vor allem CD146 – positive Zellen im Zentrum der Chorionzotten nachgewiesen werden, welche von Bindegewebe und fetalen Gefäßen durchzogen waren.

4.4.3 Expression von CD 276 im fetalen und maternalen Teil in vivo

In allen untersuchten Gewebeschnitten konnte eine starke immunhistochemische Färbung durch den CD276 Antikörper festgestellt werden. Dabei gab es keine qualitativen Unterschiede in der fetalen zur maternalen Immunhistochemie.

Exemplarisch werden hier die Bilder der Plazenta Pl 10-19 gezeigt.

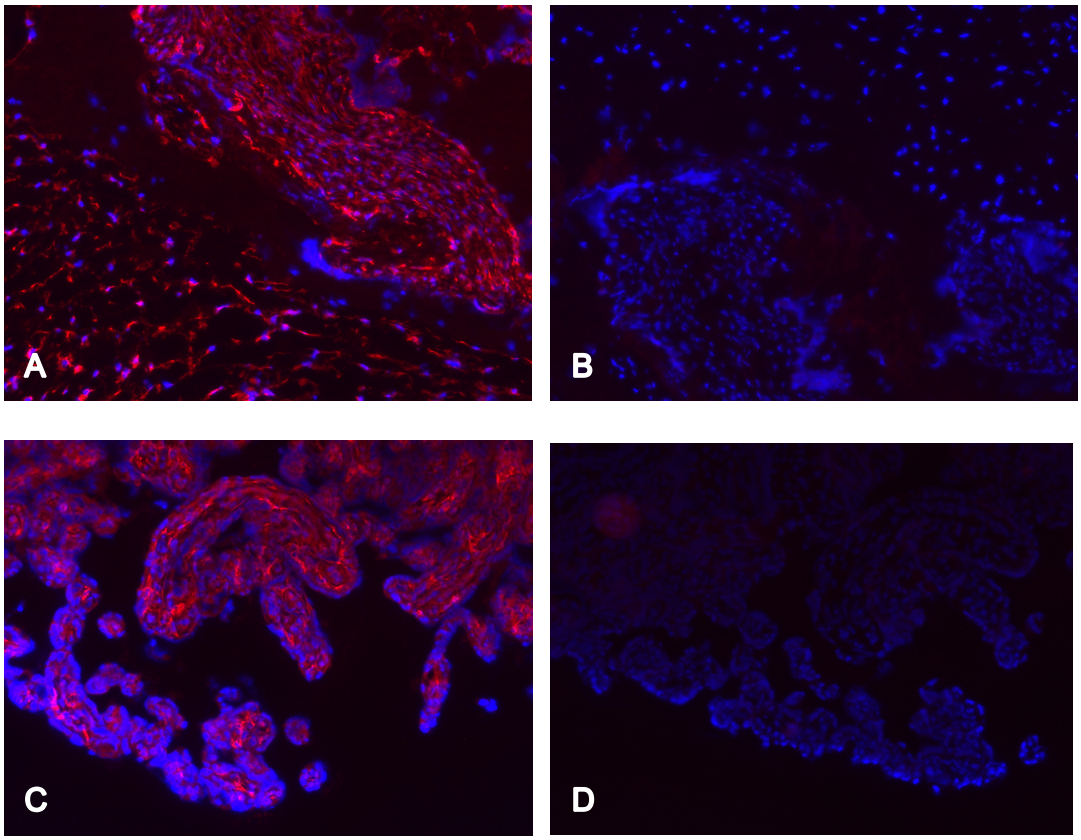


Abbildung 56: Immunhistochemie verschiedener 10µm dicken Gefrierschnitte aus der Plazenta Pl 10-19, 10 x Vergrößerung, blau: Dapi , A: äußere Chorionplatte (fetal) mit Färbung durch Anti-human CD 276 Antikörper (unmarkiert), 2. AK: Goat-anti-Rabbit Cy3 markiert, B: Negativkontrolle von A; C: intervillöser Raum (maternal) mit Färbung durch Anti-human CD 276 Antikörper (unmarkiert), 2. AK: Goat-anti-Rabbit Cy3 markiert D: Negativkontrolle von C

Im fetalen Anteil zeigte sich eine starke Färbung einer bindegewebigen Struktur, mit fibroblastenartig erscheinenden Zellen. Analog dazu fand sich eine starke Anfärbung in der maternalen/fetalen Mischzone im Kern der Chorionzotten, welche bindegewebig durchzogen war.

4.4.4 Expression von CD271 im fetalen und maternalen Teil in vivo

In 2 von 3 Fällen gab es keinen Unterschied in der immunhistochemischen Färbung im Vergleich zur Negativkontrolle. Demnach konnte lediglich das Ergebnis der Plazenta Pl 11-19 ausgewertet werden. Hier zeigte sich eine starke Färbung im maternalen Gewebeschnitt (Abbildung 57, C und D) und eine schwache Färbung im fetalen Gewebeschnitt (Abbildung 57, A und B).

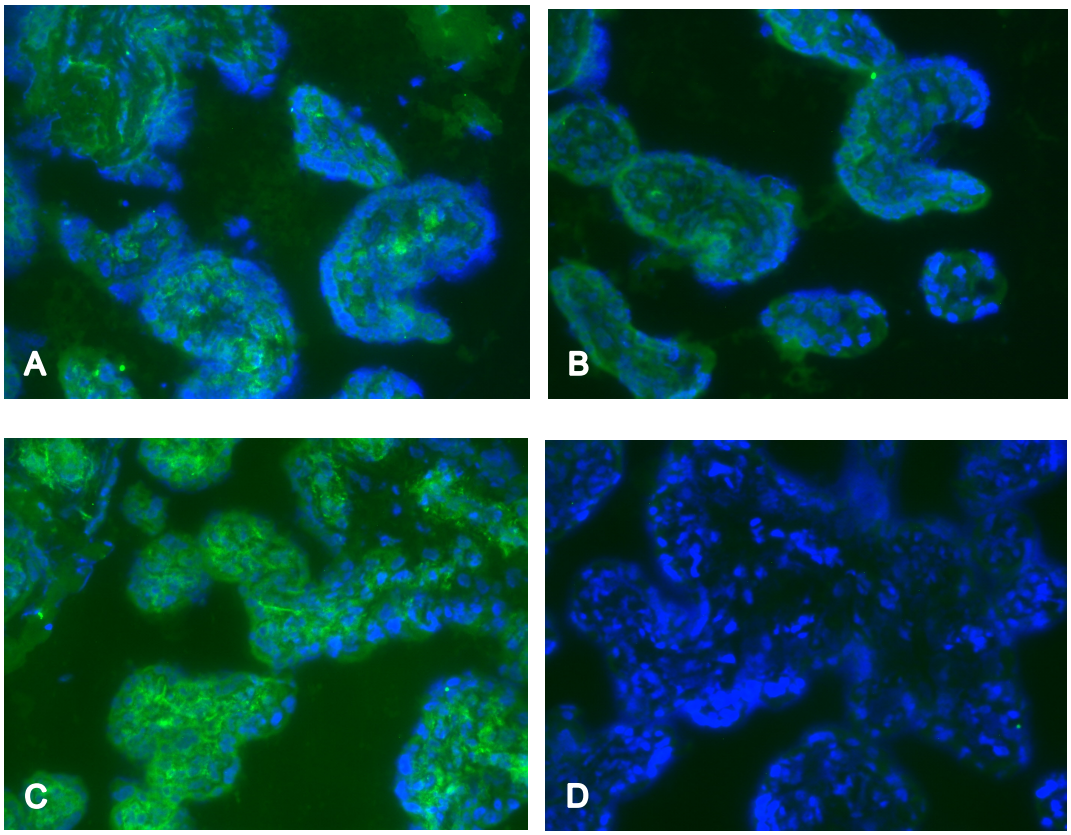


Abbildung 57: Immunhistochemie verschiedener 10µm dicken Gefrierschnitte aus der Plazenta Pl 10-19, 10 x Vergrößerung, blau: Dapi , A: äußere Chorionplatte (fetal) mit Färbung durch Anti- human CD271 Antikörper (markiert mit Pe, Kopplung an Donkey-Anti-Mouse F (ab`) Alexa Fluor 488) B: Negativkontrolle von A; C: intervillöser Raum (maternal) mit Färbung durch Anti-human CD271 Antikörper (markiert mit PE, Kopplung an Donkey-Anti-Mouse F (ab`) Alexa Fluor 488) D: Negativkontrolle von C

Sowohl im fetalen, als auch im maternalen Gewebeschnitt fanden sich Anschnitte von Chorionzotten. Im fetalen Anteil ließ sich im Vergleich zur Negativkontrolle eine stärkere Anfärbung von im Zentrum der Zotte gelegenen Zellen erahnen. (Abbildung 57: A, B) In der maternalen Immunhistochemie

konnte eine deutliche Anfärbung der im Zentrum der Zotten gelegenen Zellen beobachtet werden.

4.4.5 Expression von NG2 im fetalen und maternalen Teil in vivo

In fast allen Gewebeschnitten, mit Ausnahme der äußeren Chorionplatte der Plazenta Pl 10-19, konnte eine spezifische Bindung des NG2-Antikörpers festgestellt werden. Dabei befanden sich die angefärbten Zellen primär im Zentrum der angeschnittenen Chorionzotten. Dies ließ sich sowohl im fetalen, als auch im maternalen Schnitt beobachten.

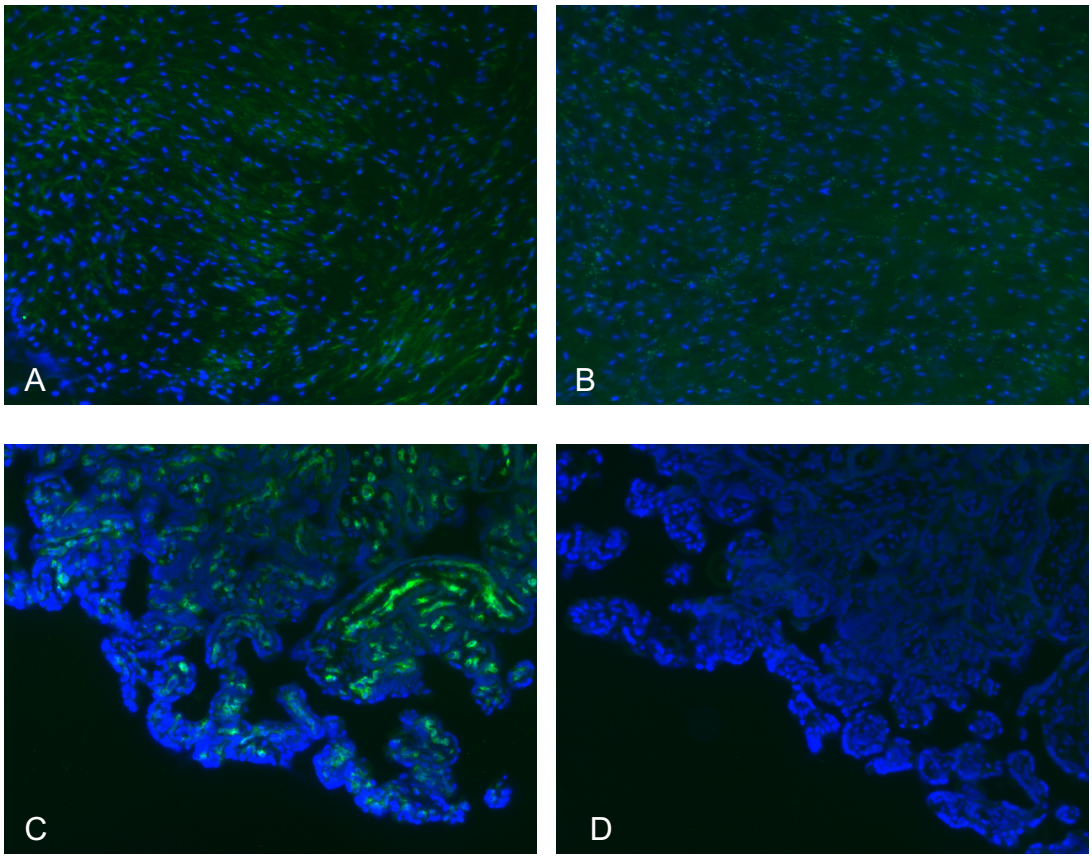


Abbildung 58: Immunhistochemie verschiedener 10µm dicken Gefrierschnitte aus der Plazenta Pl 10-19, 10 x Vergrößerung, blau: Dapi , A: äußere Chorionplatte (fetal) mit Färbung durch Anti- human NG2 Antikörper (Markierung: FITC, Kopplung an 2. AK: Donkey-anti-mouse F (ab`) Alexa Fluor 488) B: Negativkontrolle von A; C: intervillöser Raum (maternal) mit Färbung durch Anti- human

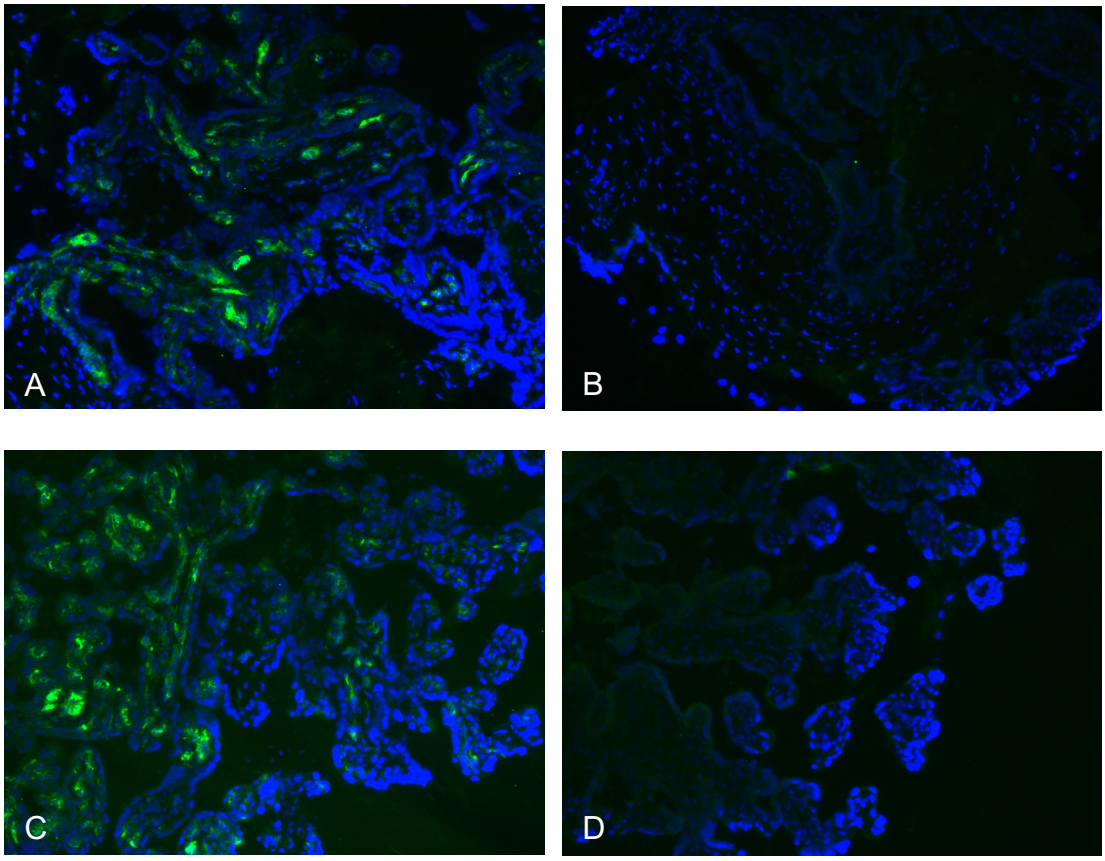


Abbildung 59: Immunhistochemie verschiedener 10µm dicken Gefrierschnitte aus der Plazenta PI 11-19, 10 x Vergrößerung, blau: Dapi , A: äußere Chorionplatte (fetal) mit Färbung durch Anti- human NG2 Antikörper (Markierung: FITC, Kopplung an 2. AK: Donkey-anti-mouse F (ab`) Alexa Fluor 488) B: Negativkontrolle von A; C: intervillöser Raum (maternal) mit Färbung durch Anti- human NG2 Antikörper (Markierung: FITC, Kopplung an 2. AK: Donkey-anti-mouse F (ab`) Alexa Fluor 488)D: Negativkontrolle von C

5 Diskussion

5.1 Zellkultur der pMSCs

Die humane Plazenta ist eine Stammzellquelle, aus der sich vergleichsweise viele humane Stammzellen isolieren lassen. Hierbei stellte sich die Art der Stammzellisolation und -expansion als eine besondere Herausforderung dar. In der in Kapitel 2.2.1 beschriebenen Stammzellisolation mittels Inkubation ganzer Gewebestücke auf mit Fibrin beschichteten 6-well-Platten, konnte eine mögliche Hefepilzkontamination und eine bakterielle Besiedlung ausgemacht werden. Trotz zusätzlicher Gewebedesinfektion mit Braunol, Waschung mit Pen/Strep und weiterer Zugabe von Amphothericin B und Tetracyclin, wurde eine Persistenz der Kontamination beobachtet. Da infolge der auftretenden Kontaminationen, die hygienischen Bedingungen, mittels Nutzung steriler Handschuhe und steriler Tücher bei der Gewebeaufarbeitung und die Sterilfiltration der Medien und Thrombin/Fibrinogen, verschärft wurden, sind diese als Kontaminationsquelle auszuschließen. Offen bleibt die Frage, ob eine frühzeitige Kontamination des Organs durch eine längere Lagerung auf dem Instrumentiertisch im Operationssaal, durch unsterile Lagerung des Organs im Kreissaal oder durch den Transport des Organs infrage kommt. Tatsache ist hier, dass eine durch die Klinikroutine bedingte Kontamination nicht auszuschließen ist. Auch durch die Inkubation ganzer Gewebestücke könnte das Wachstum des entsprechenden Hefepilzes bzw. Bakteriums begünstigt worden sein, da das Gewebe die Erreger von den zugegebenen Antibiotika bzw. Amphothericin B abgeschottet haben könnte. Begünstigt worden könnte dies, durch die Proteolyse der extrazellulären Matrix mittels Trypsin/EDTA, in der ursprünglich Platz für stromales Wachstum der pMSCs geschaffen werden sollte. Durch die Adaptation der Gewebestücke auf Fibrin könnte ein zusätzlicher abgeschlossener Raum für das Erregerwachstum geschaffen worden sein. Um einer weiteren Kontamination vorzubeugen, wurden die Stammzellen zunächst durch Enzymverdau aus der extrazellulären Matrix gelöst und isoliert auf 6-well-Platten inkubiert. Auch hier konnte eine bakterielle Besiedlung beobachtet werden. Feuchtigkeit zwischen der 6-well-Platte und dem Deckel, kommt als eine mögliche, begünstigende Ursache für bakterielles

Wachstum infrage. Erst die Lösung der Zellen durch Enzymverdau und Inkubation in T75-Flaschen führte zu sauberen Zellkulturen.

Aufgrund der vorangegangenen Kontaminationen, wurde die Methodik angepasst und eine aufwändigere Methode zur Stammzellisolation genutzt, in welcher maternale Stammzellen, getrennt von fetalen Stammzellen, isoliert und expandiert wurden.(Ulrich et al., 2015) Da die fetalen Stammzellen lediglich aus der äußeren Chorionschicht isoliert wurden, konnten weniger fetale als maternale Stammzellen gewonnen werden. Trotzdem konnten in beiden Fällen ausreichend Zellen für die Durchführung der folgenden Versuche gewonnen werden. Bei beiden Zellkulturen zeigte sich eine Heterogenität in der Primärkultur, welche sich vor allem durch das Vorhandensein von Erythrozyten und Zellfragmenten darstellte. Durch regelmäßige Medienwechsel und Passagen zeigte sich in beiden Zellkulturen eine Homogenität der Zellen, die sich durch eine fibroblastenartige Morphologie und Plastikadhärenz auszeichnete. In beiden Kulturen konnte somit das 1. MSC-Kriterium nach Dominici, die Plastikadhärenz „in vitro“, erfüllt werden.(Dominici et al., 2006)

Obwohl eine fibroblastenartige Morphologie in beiden Kulturen zu erkennen war, zeigten sich dennoch Unterschiede bezüglich des Wachstumsverhaltens. Die maternalen Zellen zeigten ein verzweigtes und dichtes Wachstum, während sich die fetalen Zellen vor allem in der Primärkultur und in der ersten Passage durch ein arkadenartiges Wachstum auszeichneten. Auffällig war außerdem eine frühe Zellseneszenz der fetalen Zellen in Lonza-Medium währen maternale Zellen, zumindest mikroskopisch betrachtet, eher eine geringe Zellseneszenz in Lonza-Medium zeigten. Dies wurde aber nicht systematisch durch Analyse, beispielsweise der β – Galaktosidase-Expression untersucht. Trotzdem könnte es ein Hinweis darauf sein, dass es sich hier um zwei unterschiedliche Zellpopulationen handelte.

Das Lonza-Medium ist explizit, nach Herstellerangaben, für humane Gelenkschrondrozyten, humane bmMSCs und dentale Pulpastammzellen geeignet. Dies lässt darauf schließen, dass maternale pMSCs möglicherweise mehr Eigenschaften mit den oben genannten Zelltypen teilen, als fetale pMSCs,

was sich durch eine geringere Zellsenszenz der maternalen Zellen in Lonza-Medium zeigte. Aufgrund der beschriebenen Zellseneszenz in Lonza-Medium war die Proliferationsrate im GMP-Medium vergleichsweise höher.

5.2 Differenzierung der pMSCs

Die Untersuchung der Differenzierungsfähigkeit von maternalen und fetalen pMSCs erfolgte nach der Zellkultur in Lonza – und GMP-Medium durch Zugabe eines entsprechenden Differenzierungsmediums und der anschließenden Anfärbung osteogener bzw. adipogener Strukturen. Auf den Nachweis differenzierungsspezifischer Transkriptionsfaktoren, wie PPARγ (adipogen) bzw. Runx2 (osteogen) wurde verzichtet. Eine Differenzierung war bei jedem Zelltyp sowohl in die osteogene, als auch in die adipogene Richtung möglich, jedoch vergleichsweise zu bmMSCs schwach ausgeprägt.

5.2.1 Adipogene Differenzierung

Die Induktion der adipogenen Differenzierung erfolgte „in vitro“ durch die Zugabe des jeweiligen Differenzierungsmediums und damit durch eine Veränderung des Mikromilieus. Die MSCs werden dadurch zu Präadipozyten. Es kommt zu einem Wachstumsstopp durch Kontaktinhibition und einer anschließenden Morphologieänderung der fibroblastenartigen Zellen mit langen Ausläufern zu einem runden Zelltyp. Dies geht zunächst mit einer Änderung der Transkriptionsfaktorexpression über C/EBPβ / C/EBPδ zu PPARγ / C/EBP$\propto$ einher, die zur Expression adipozytenspezifischer Gene und einer darauf folgenden Synthese von Fettlipiden führt.(Rosen, Walkey, Puigserver, & Spiegelman, 2000) PPARγ / C/EBP$\propto$ sind die Hauptregulatoren der Adipogenese. (Rosen & MacDougald, 2006) Der Nachweis einer gelungenen adipogenen Differenzierung erfolgt durch die Anfärbung der durch Adipozyten gebildeten Lipidvesikel.

<u>Expansion</u>

Besonders bei den fetalen pMSCs kultiviert in GMP-Medium mit Plättchenlysat/Serum war ein frühes Abkugeln der Zellen ab Tag 4 nach Expansion zu beobachten, während in beiden maternalen pMSC-Fraktionen ein

tentoriales Aufspannen der Zellen ab Tag 4 zu erkennen war. Die fetale pMSC-Fraktion in Lonza-Medium zeichnete sich äquivalent zur Zellkultur durch eine beständige Zellseneszenz aus. Das könnte darauf schließen lassen, dass in fetalen MSCs kultiviert in GMP-Medium, eine Adipogenese sehr schnell induziert werden kann, da die Morphologieänderung mit der Umwandlung zu Präadipozyten einhergehen könnte. Die optimale Zellkonfluenz lag bei 70%, vor der Expansion.

Differenzierungsfärbung

In der Differenzierungsfärbung zeigte sich in 3 von 5 Fällen eine 70-80%ige Anfärbung von feinen Lipidvesikeln sowohl in der fetalen als auch in der maternalen pMSC-Fraktion kultiviert in GMP mit Plättchenlysat und Serum. In der maternalen pMSC-Fraktion kultiviert in Lonza zeigte sich sogar in 4 von 5 Fällen eine 70-80%ige Anfärbbarkeit. Die fetalen pMSCs in Lonza-Medium zeigten eine schwächere Anfärbbarkeit. Hier ist allerdings die in Kapitel 5.1 beschriebene Zellseneszenz dieser Zellpopulation zu nennen, welche die entsprechende Differenzierungsfärbung schwer auswertbar macht. Die Negativkontrollen wiesen keine Anfärbbarkeit auf.

Auffällig war eine gewissen Inhomogenität innerhalb der Differenzierungsfärbung, welche durch bereits vordifferenzierte Subpopulationen zustande gekommen sein könnte. Diese wären damit nicht mehr in der Lage zu Adipozyten auszureifen.

Es ist bereits bekannt, dass Biomoleküle im Plättchenlysat die adipogene Differenzierungsfähigkeit stimulieren können. (Fekete et al., 2012) Dieses ist dem GMP-Medium zugesetzt worden. Zellen, welche im Lonza-Medium kultiviert wurden, scheinen zumindest in der maternalen Fraktion ein stärkeres adipogenes Differenzierungspotenzial zu besitzen, als Zellen, die im GMP-Medium kultiviert wurden. Das Lonza-Medium könnte das adipogene Differenzierungspotenzial verstärken. Dies wirft die Frage auf, welche Faktoren im Lonza-Medium zu einer verstärkten adipogenen Differenzierung führen. Da die Zusammensetzung des Lonza-Mediums unbekannt ist, kann diese Frage im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden.

Nach Barlow et.al. besitzen bmMSCs ein höheres Potenzial zur adipogenen Differenzierung als pMSCs. (Barlow et.al, 2008) Dabei wurden ausschließlich maternale pMSCs mit bmMSCs verglichen. Generell ist davon auszugehen, dass die maternalen pMSC-Fraktionen ein höheres adipogenes Differenzierungspotenzial besitzen als die fetalen Zellfraktionen. (Gucciardo et al., 2009) Die maternalen pMSCs welche in Lonzamedium kultiviert wurden scheinen hier tatsächlich ein stärkeres adipogenes Differenzierungspotenzial zu haben. Meine Ergebnisse der Zellkultur im GMP-Medium passen nicht zu den Ergebnissen von Gucciardo et al.. Dies könnte mit der Präparation des Plättchenlysates zusammenhängen, da die Methode zur Herstellung von Labor zu Labor variiert. Um signifikante Werte zu erhalten, müssten weitere Differenzierungsfärbungen und der Nachweis der Transkriptionsfaktoren PPARγ / C/EBP$\propto$ erfolgen, um einen adipogene Differenzierung quantitativ nachzuweisen.

5.2.2 Osteogene Differenzierung

Die Induktion der osteogenen Differenzierung erfolgte über die Änderung des Mirkomilieus, durch Zugabe des entsprechenden Differenzierungsmediums. Dadurch werden die MSCs über die Differenzierung zu Osteoprogenitorzellen zu Osteoblasten und anschließend zu Osteozyten. Die Osteoblasten stellen den aktiven Zelltyp dar, welcher sogenannte Osteoide bildet und Calciumpräzipitate einlagert. Diese werden mittels der „Von-Kossa-Färbung“ nachgewiesen.

Expansion

Die maternalen pMSCs kultiviert in GMP-Medium zeigten ab Tag 7 in Expansion einen Adhärensverlust an Plastik und damit eine Ablösung des Gewebestücks. Mikroskopisch waren in allen Kulturen kompakte, zusammenhängende Gewebestücke zu erkennen, welche im Laufe der Zeit an Dichte zugenommen hatten. Die frühzeitige Gewebeablösung könnte mit einem höheren Stoffwechsel und damit einhergehend mit einer verstärkten osteogenen Differenzierung zusammenhängen. Dadurch bedingt könnte ein relativer Mangel an Nährstoffen Ursache des Adhärenzverlustes sein.

Es gibt Hinweise darauf, dass eine höhere CD146-Expression mit einem stärkeren ostegenen Differenzierungspotenzial einhergeht.(Ulrich et al., 2015) Sowohl in der Immunhistochemie („in vivo“) des maternalen Gewebes, als auch in der Durchflusszytometrie der maternalen pMSCs in GMP zeigte sich eine höhere CD146-Expression als im fetalen Gewebe bzw. in den fetalen pMSCs. Diese Ergebnisse stützen die These einer verstärkten osteogenen Differenzierung in der maternalen pMSC-Fraktion in GMP. In der durchgeführten Durchflusszytometrie konnte eine signifikant höhere CD276-Expression in der maternalen pMSC-Fraktion in GMP nachgewiesen werden. Eine starke CD276-Expression scheint sich positiv auf die Knochendichte während der Entwicklung auszuwirken. (Suh et al., 2004) Somit könnte eine stärkere osteogene Differenzierung zusätzlich mit der CD276-Expression in Zusammenhang stehen.

Weiterhin war eine Zellseneszenz der fetalen pMSCs aus der Lonza-Zellkultur zu beobachten. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass die ohnehin geringeren Zellausbeute bei der Zellisolation in Kombination mit der beobachteten schlechteren Proliferation von pMSCs in Lonza-Medium eine höhere Zellpassagefrequenz notwenig gemacht hätte.

Differenzierungsfärbung

In der Differenzierungsfärbung nach Von-Kossa zeigte sich eine 70-80%ige Anfärbbarkeit der Calciumpräzipitate in 3 von 5 Fällen in der fetalen pMSC-Fraktion kultiviert in GMP und in der maternalen pMSC-Fraktion kultiviert in Lonza. In 2 von 3 Fällen zeigte sich eine 40-50%ige Anfärbbarkeit in der fetalen pMSC-Fraktion kultiviert in Lonza-Medium. Die maternalen pMSCs kultiviert in GMP-Medium konnten aufgrund des Adhärenzverlustes nicht angefärbt werden. Äquivalent zu den Forschungsergebnissen von Pilz et.al. konnte im direkten Vergleich mit Bildern von Differenzierungsfärbungen von bmMSCs, eine deutlich schwächere Färbung aller pMSCs festgestellt werden.

Auffällig war, dass sowohl bei fetalen Zellen in GMP, als auch bei maternalen Zellen in Lonza eine ähnlich starke osteogene Differenzierung stattgefunden hatte. Lediglich in 1 von 5 Fällen war die osteogene Differenzierung bei fetalen

Zellen in GMP in der subjektiven Auswertung sehr stark ausgeprägt, wobei dies bei maternalen Zellen in Lonza nicht der Fall war. Narasaiya et al. konnten in früheren Versuchen eine schlechtere osteogene Differenzierungsfähigkeit von pMSCs in Medium mit humanem Serum in direkten Vergleich mit Medium mit humanem Plasmazusatz feststellen. Im verwendeten GMP-Medium wurde humanes Serum zugesetzt, was die osteogene Differenzierungsfähigkeit zum Negativen beeinflusst haben könnte. Ulrich et al. konnte auf der anderen Seite feststellen, dass fetale pMSCs eine höhere Expression osteogener Markergene zeigen, als maternale pMSCs. Somit könnten sich beide Faktoren gegenseitig beeinflusst haben, sodass es hier zu einer moderaten osteogenen Differenzierung der fetalen pMSCs in GMP gekommen sein könnte.

In einer früheren Arbeit wurde die These aufgestellt, dass das Lonza-Medium während der Expansion zu einer osteogenen Vorprägung der pMSCs führen könnte. (Verpoorten et al., 2014) In Verbindung mit einer geringeren Expression von osteogenen Markergenen in maternalen pMSCs (Ulrich et al., 2013), könnte dies ebenfalls zu einer moderaten Färbung in der osteogenen Differenzierung geführt haben.

Eine vergleichsweise schwache Differenzierungsfähigkeit der maternalen pMSCs in Lonza-Medium, könnte mit der oben beschriebenen Zellsenezenz in Verbindung stehen.

Um die oben aufgestellten Thesen zu bestätigen, müssten weitere pMSCs der maternalen und fetalen Zellfraktionen isoliert, differenziert und anschließend quantitativ mittels Messung der Expression osteogener Markergene ausgewertet werden. Bisher erfolgten hier ausschließlich qualitative Auswertungen, welche nur bedingt aussagekräftig waren.

5.3 Durchflusszytometrische Charakterisierung

Erfüllung der Dominici-Kriterien

Die Dominici-Kriterien konnten, vor allem aufgrund des fehlenden Nachweises der CD105-Expression, nicht erfüllt werden. Die Bedingung einer ≥95%igen CD105 Expression wurde in keinem Fall erfüllt. Die Werte schwankten

zwischen einer 19,6%igen Expression und einer 91%igen Expression, wobei die höchste Expression in der maternalen GMP-Fraktion zu messen war, die geringste Expression in der fetalen GMP-Fraktion. Trotzdem ließ sich kein regelhaftes Muster in der CD105 Expression erkennen. Eine mögliche Erklärung dafür ist, das TGF-β Bestandteil des Zellkulturmediums ist, welches an CD105 binden kann, und dadurch der CD105-Antikörper nur bedingt nachgewiesen wird. CD105 stellt einen Rezeptorkomplex für TGF-β dar.(Pierelli et al., 2001) Wahrscheinlich ist jedoch, das in den Proben andere Zellen vorhanden waren, welche wenig oder kaum CD105 exprimieren.(Cleary et.al., 2016)

Außerdem fiel auf, dass sich die Zellkultur im Lonza-Medium zu Gunsten der Erfüllung der Domenici-Kriterien auswirkte. Die CD90-Expression war in der maternalen pMSC-Fraktion in Lonza-Medium signifikant höher als in der maternalen Zellkultur in GMP. Auch CD105 wurde im Mittel in Lonza etwas höher exprimiert. Die Negativmarker CD14, CD34 und CD45 waren in Lonza im Gegensatz zum GMP immer negativ. Dies lässt darauf schließen, dass eine pMSC-Zellkultur in Lonza, den Erhalt der MSC-Charakteristika stärker fördern könnte als die Zellkultur in GMP-Medium. Lonza hat somit möglicherweise ein besseres Potenzial zur MSC-Expansion und zur Untersuchung von Stammzellmarkern.

Die fetalen pMSCs in GMP zeigten im Mittel eine CD14-Expression $>2\%$, die maternalen pMSCs erreichen nur in 2 von 3 Fällen eine CD14 Expression $\leq$ 2%. Grund dafür könnte zumindest in frühen Passagen eine Verunreinigung der Zellkultur mit Monozyten, Makrophagen oder Endothelzellen sein. Da auch die CD34-Expression im GMP-Medium nie $\leq$ 2% lag und beide Marker als Endothelzellmarker gelten, liegt eine Verunreinigung durch Endothelzellen nahe. Ein weiterer Erklärungsansatz für die relativ hohe CD34-Expression ist, dass eine Ausreifung $CD34^+$ humaner embryonaler Stammzellen zu MSCs durch die Zellkultur in GMP weniger gefördert werden könnte als in Lonza.

Die fetalen pMSCs konnten in Lonza-Medium nicht expandiert werden, was unter Annahme der Hypothese, dass Lonza das Stammzellpotenzial unterstützt,

bedeuten könnte, dass es sich bei der untersuchten Population nicht um MSC-ähnliche Zellen handelt.

Eine weitere Hypothese könnte sein, dass die Dominici-Kriterien, welche für die Charakterisierung von bmMSCs gelten, in einem strikteren Sinn nicht für fetale MSCs der Platzenta gelten. Möglicherweise wäre hier die Aufstellung neuer pMSC-Kriterien, mit der Entdeckung pMSC-spezifischer Oberflächenstrukturen, sinnvoll.

Untersuchung auf andere Oberflächenstrukturen

CD276 wurde in allen Zelllinien sehr stark (bis zu 100%) exprimiert. Dabei war die CD276-Expression der maternalen Fraktion in GMP signifikant höher als in Lonza. Die maternalen MSCs in GMP exprimierten auch im Vergleich zu den fetalen MSCs in GMP signifikant mehr CD276. Es ist bekannt, dass eine hohe CD276 Expression möglicherweise mit einer Downregulation der T-Zellen und damit mit einer Unterdrückung der Immunantwort einhergeht. (Castellanos et al., 2017) Zudem wird mit der CD276 Expression eine Zellmigration durch endothelial-mesenchymale Transition (EMT) begünstigt.(Jiang et al., 2016) Dies könnte eine mögliche Erklärung für die Immuntoleranz der Mutter bei der Implantation der Trophoblastenzellen in das Interstitium der mütterlichen Uterusschleimhaut sein.

Wie in Kapitel 5.2.2 beschrieben, könnte die starke osteogene Differenzierung der maternalen Zellen in GMP-Medium mit der hohen CD 276 Expression in Zusammenhang stehen. Zusätzlich fällt in der Durchflusszytometrie eine nicht signifikant höhere CD146-Expression in der maternalen GMP-Fraktion, als in der fetalen GMP-Fraktion auf. Wang et al. konnte einen starken parakrinen proosteogenen Effekt bei der Markerkombination von $CD146^{+}$- Perizyten und $CD34^{+}$-Adventitiazellen nachweisen. Diese Ergebnisse verhalten sich proportional, zu der hier nachgewiesenen hohen CD146-Expression und CD34-Expression der maternalen MSCs in GMP-Medium, wodurch es ebenfalls zu einer höheren osteogenen Differenzierung gekommen sein könnte.

Shih et al. konnte eine Beteiligung des CD146 Oberflächenmoleküls an der Implantation des Trophoblasten nachweisen. Dies ist ebenfalls mit einer hohen Expression von CD146 in der maternalen MSC-Fraktion vereinbar.

SushiD2 konnte durchflusszytometrisch nur sehr schwach nachgewiesen werden. Die Expression betrug maximal 28%, dabei wurde es in Lonza etwas höher exprimiert als in GMP. Sollte es sich bei SushiD2 um einen geeigneten pMSC-Marker handeln, würde dies die These stützen, dass Lonza im Vergleich zu GMP das Stammzellpotenzial fördert. Eine geringere SushiD2-Expression könnte allerdings auch mit dem Zusatz von humanem Plättchenlysat zum GMP-Medium in Zusammenhang stehen. Peißert et al konnte bereits nachweisen, dass humanes Plättchenlysat zu einer geringeren SushiD2-Expression führt.

5.4 Oberflächenmarkerexpression auf Transkriptionsebene

Bei der PCR wurden 5 von 5 Plazenten auf die Transkriptionsprodukte CD146, CD276 und SushiD2 untersucht. Dabei konnten in der fetalen Lonza-Fraktion nur 3 von 5 Plazenten, aufgrund der Zellseneszenz in der Zellkultur, untersucht werden.

Auffällig war eine hochsignifikant höhere Expression von CD146 der fetalen Zellen in Lonza-Medium im Vergleich zum GMP-Medium. Dies könnte zum einen an der kleinen Kohorte liegen (3 von 5 Plazenten), sodass der Wert nicht repräsentativ ist, oder aber es handelt sich bei den untersuchten Zellpopulationen um Kontaminationen mit Endothelzellen, welche bekanntermaßen viel CD146 exprimieren. Äquivalent zur Durchflusszytometrie konnte auch auf Transkriptionsebene signifikant mehr CD146 in der maternalen Zellfraktion in GMP nachgewiesen werden, als in der fetalen Zellfraktion. Dies könnte ein höheres Implantationspotenzial der maternalen Zellen in das Myometrium und ein höheres osteogenes Differenzierungspotenzial der maternalen Zellen erklären. Zusätzlich schien die Translation des CD146-Oberflächenmarkers nicht beeinflusst zu sein, da sich die Ergebnisse mit denen der Durchflusszytometrie decken.

Äquivalent zur Durchflusszytometrie ist auch eine signifikant höhere CD276 Expression der maternalen Zellfraktion in GMP-Medium im Vergleich zur Zellkultur im Lonza-Medium auf Transkriptionsebene zu beobachten. Sollte das Lonza-Medium tatsächlich das Stammzellpotenzial fördern, spräche dies gegen CD276 als geeigneten MSC-Marker.

Bei der Zellkultur in GMP-Medium konnte eine höhere Proliferationsrate beobachtet werden. (Felka et.al.,2009) Möglicherweise könnte hier ein Zusammenhang zwischen der höheren CD276-Expression und einer gesteigerten Proliferation in GMP bestehen. Da CD276 auf verschiedenen Krebsformen nachgewiesen werden konnte, gilt es zu klären, ob das GMP-Medium einen Einfluss auf die Proliferationsrate der Zellen und damit auf das cancerogene Potenzial hat. Passend dazu, wäre der geringere Nachweis von stammzellspezifischen Oberflächenmarkern durch die Zellkultur in GMP-Medium.

SushiD2 konnte auf Transkriptionsebene ebenfalls in geringen Mengen nachgewiesen werden. Wie in der Durchflusszytometrie wurde eine höhere Expression in Lonza als in GMP gemessen. In den maternalen Zellen wurde mehr SushiD2 nachwiesen als in den fetalen Zellen. Unter der Annahme, dass es sich bei den maternalen Zellen eher um MSCs handelt als bei den fetalen Zellen, könnte SushiD2 als MSC-Marker infrage kommen.

5.5 Immunhistochemische Darstellung im Vergleich

Die Immunhistochemie wurde mit Gefrierschnitten der Plazenten 10-19 – 12-19 mit maternalem und fetalem Gewebe durchgeführt und diente dem Nachweis und direktem Vergleich der „in vivo“ Expression der Oberflächenmoleküle CD90, CD73, CD105, CD146, CD276, CD271 und NG2.

Bei der Untersuchung der Oberflächenmarker CD90, CD73 und CD105 konnte in allen Gewebeschnitten ein spezifisches Signal detektiert werden. Dabei beschränkte sich die CD73-/ und CD105-Antikörperfärbung im maternalen Gewebe auf die Epithelzellen des Synzytiotrophoblasten, während mit der CD90-Antikörperfärbung Zellen des Zentrums der Chorionzotten angefärbt wurden. Im fetalen Gewebe konnten die Zellen im kollangenen Bindegewebe

angefärbt werden. Eine spezifische Anfärbbarkeit der Positivmarker nach Dominici, sprach zunächst für die Präsenz von MSCs sowohl im fetalen als auch im maternalen Gewebe.

Auffällig war ein qualitativer Unterschied in der Immunhistochemie des CD146-Oberflächenmarkers. Hier zeigte sich in 2 von 3 Fällen eine stärkere Anfärbbarkeit des maternalen Gewebes im Zentrum der Chorionzotten. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass maternale MSCs „in vivo“ mehr CD146 exprimieren als fetale MSCs. Da eine CD146-Expression mit einer Implantationsfähigkeit in das Myometrium assoziiert wird (Shih, 1999), würde eine höhere Expression im maternalen Gewebe durchaus Sinn machen.

In alle Gewebetypen war eine starke immunhistochemische Färbung des CD276 Oberflächenmarkers zu beobachten. Dies spricht für eine hohe „in vivo“-Expression, wodurch die Umgehung des mütterlichen Immunsystems bei der Implantation möglich gemacht werden könnte, indem CD276 die Immunantwort unterdrückt.

Batulla et al konnte bereits zeigen, dass pMSCs weniger CD271 exprimieren als bmMSCs. Deshalb stelle CD271 keinen geeigeten Marker für pMSCs dar. Diese These konnte mit der durchgeführten Immunhistochemie bestätigt werden, in welcher nur in 1 von 6 Färbungen, ein starkes spezifisches immunhistochemisches Signal detektierbar war.

Eine spezifische Färbung des NG2-Oberflächenmoleküls war, außer im fetalen Gewebe der Plazenta 10-19, immer möglich. Dabei ließen sich keine qualitativen Unterschiede ausmachen. Barilani et al konnte zeigen, dass in fetalen MSCs mehr NG2 exprimiert wird als in adulten MSCs. Dies konnte hier nicht bestätigt werden. Da NG2 als Perizytenmarker gilt, ist eine Anfärbung von Plazentagefäßen wahrscheinlich. Eine mangelnde Anfärbbarkeit des fetalen Gewebes der Plazenta 10-19 könnte durch einen Gewebeanschnitt ohne Gefäße bedingt sein.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die MSC-ähnlichen Stromazellen des fetalen und maternalen Anteils der Plazenta in Lonza- und GMP-Medium bezüglich ihrer Oberflächenmolekülexpression in vivo und in vitro und ihrer Differenzierungsfähigkeit untersucht und verglichen. Ziel war hierbei die Untersuchung einer potenziellen Stammzellressource zum therapeutischen Einsatz bei akuten Gewebsverlusten, beispielsweise als Injektion in den Blasenspinkter bei degenerativer Harninkontinenz. Hierzu wurden die Immunhistochemie, die Durchflusszytometrie, die RT-PCR und die adipogene und osteogene Differenzierungsfärbung durchgeführt.

Dabei konnte eine hohe CD146- und CD276-Expression in der maternalen Zellfraktion in vivo und in vitro nachgewiesen werden. Außerdem konnte ein stärkeres osteogenes Differenzierungspotenzial der maternalen pMSCs beobachtet werden. Dabei schien besonders das GMP-Medium einen fördernden Einfluss auf die osteogene Differenzierungsfähigkeit zu haben. Bezüglich der adipogenen Differenzierung waren die Ergebnisse uneindeutig. Des Weiteren konnte ein begünstigender Einfluss des Lonza-Mediums auf die Expression MSC-spezifischer Oberflächenmoleküle beobachtet werden, dies ging allerdings mit einer geringeren Proliferationsrate einher. Die für bmMSCs spezifischen Dominici-Kriterien traten im engeren Sinne nicht für die hier untersuchten Zellen zu.

Es ist bekannt, dass eine hohe CD146-Expression mit einem höheren osteogenen Differenzierungspotenzial einhergeht. Demnach wären die hier untersuchten maternalen pMSCs ungeeignet für eine therapeutische Implantation zur Regeneration von Muskelgewebe. Die hohe Expression von CD276 auf maternalen Zellen könnte mit der Implantation des Trophoblasten zusammenhängen, da CD276 möglicherweise eine Hemmung der T-Zell-Aktivierung bewirkt, was eine mütterliche Immuntoleranz erklären könnte. Die signifikante Expression von CD276 auf pMSCs in GMP-Medium könnte auch zur Untersuchung der Mechanismen der CD276 Regulation genutzt werden.

7 Literaturverzeichnis

Alvarez-Viejo, M., Menendez-Menendez, Y., Blanco-Gelaz, M. A., Ferrero-Gutierrez, A., Fernandez-Rodriguez, M. A., Gala, J., & Otero-Hernandez, J. (2013). Quantifying mesenchymal stem cells in the mononuclear cell fraction of bone marrow samples obtained for cell therapy. *Transplant Proc, 45*(1), 434-439. doi:10.1016/j.transproceed.2012.05.091

Amend, B., Kelp, A., Vaegler, M., Klunder, M., Frajs, V., Klein, G., . . . Aicher, W. K. (2017). Precise injection of human mesenchymal stromal cells in the urethral sphincter complex of Gottingen minipigs without unspecific bulking effects. *Neurourol Urodyn, 36*(7), 1723-1733. doi:10.1002/nau.23182

Bardin, N., Frances, V., Combes, V., Sampol, J., & Dignat-George, F. (1998). CD146: biosynthesis and production of a soluble form in human cultured endothelial cells. *FEBS Lett, 421*(1), 12-14. doi:10.1016/s0014-5793(97)01455-5

Barilani, M., Banfi, F., Sironi, S., Ragni, E., Guillaumin, S., Polveraccio, F., . . . Lazzari, L. (2018). Low-affinity Nerve Growth Factor Receptor (CD271) Heterogeneous Expression in Adult and Fetal Mesenchymal Stromal Cells. *Sci Rep, 8*(1), 9321. doi:10.1038/s41598-018-27587-8

Barlow S, Brooke G, Chatterjee K, et al. Comparison of human placenta- and bone marrow-derived multipotent mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2008;17(6):1095-1107. doi:10.1089/scd.2007.0154

Battula, V. L., Treml, S., Abele, H., & Buhring, H. J. (2008). Prospective isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human placenta using a frizzled-9-specific monoclonal antibody. *Differentiation, 76*(4), 326-336. doi:10.1111/j.1432-0436.2007.00225.x

Buganim, Y., Faddah, D. A., & Jaenisch, R. (2013). Mechanisms and models of somatic cell reprogramming. *Nat Rev Genet, 14*(6), 427-439. doi:10.1038/nrg3473

Castellanos, J. R., Purvis, I. J., Labak, C. M., Guda, M. R., Tsung, A. J., Velpula, K. K., & Asuthkar, S. (2017). B7-H3 role in the immune landscape of cancer. *Am J Clin Exp Immunol, 6*(4), 66-75. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28695059

Codispoti, B., Marrelli, M., Paduano, F., & Tatullo, M. (2018). NANOmetric BIO-Banked MSC-Derived Exosome (NANOBIOME) as a Novel Approach to Regenerative Medicine. *J Clin Med, 7*(10). doi:10.3390/jcm7100357

Cleary MA, Narcisi R, Focke K, van der Linden R, Brama PA, van Osch GJ. Expression of CD105 on expanded mesenchymal stem cells does not predict their chondrogenic potential. *Osteoarthritis Cartilage*. 2016;24(5):868-872. doi:10.1016/j.joca.2015.11.018

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., . . . Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy, 8*(4), 315-317. doi:10.1080/14653240600855905

Dorronsoro, A., Fernandez-Rueda, J., Fechter, K., Ferrin, I., Salcedo, J. M., Jakobsson, E., & Trigueros, C. (2013). Human mesenchymal stromal cell-mediated immunoregulation: mechanisms of action and clinical applications. *Bone Marrow Res, 2013*, 203643. doi:10.1155/2013/203643

Earl, L. A., & Baum, L. G. (2008). CD45 glycosylation controls T-cell life and death. *Immunol Cell Biol, 86*(7), 608-615. doi:10.1038/icb.2008.46

Espagnolle, N., Guilloton, F., Deschaseaux, F., Gadelorge, M., Sensebe, L., & Bourin, P. (2014). CD146 expression on mesenchymal stem cells is associated with their vascular smooth muscle commitment. *J Cell Mol Med, 18*(1), 104-114. doi:10.1111/jcmm.12168

Farini, A., Sitzia, C., Erratico, S., Meregalli, M., & Torrente, Y. (2014). Clinical applications of mesenchymal stem cells in chronic diseases. *Stem Cells Int, 2014*, 306573. doi:10.1155/2014/306573

Felka T, Schäfer R, Schewe B, Benz K, Aicher WK. Hypoxia reduces the inhibitory effect of IL-1beta on chondrogenic differentiation of FCS-free expanded MSC. *Osteoarthritis Cartilage*. 2009;17(10):1368-1376. doi:10.1016/j.joca.2009.04.023

Fekete, N., Gadelorge, M., Furst, D., Maurer, C., Dausend, J., Fleury-Cappellesso, S., . . . Rojewski, M. T. (2012). Platelet lysate from whole blood-derived pooled platelet concentrates and apheresis-derived platelet concentrates for the isolation and expansion of human bone marrow mesenchymal stromal cells: production process, content and identification of active components. *Cytotherapy, 14*(5), 540-554. doi:10.3109/14653249.2012.655420

Graf, T. (2011). Historical origins of transdifferentiation and reprogramming. *Cell Stem Cell, 9*(6), 504-516. doi:10.1016/j.stem.2011.11.012

Gucciardo, L., Lories, R., Ochsenbein-Kolble, N., Done, E., Zwijsen, A., & Deprest, J. (2009). Fetal mesenchymal stem cells: isolation, properties and potential use in perinatology and regenerative medicine. *BJOG, 116*(2), 166-172. doi:10.1111/j.1471-0528.2008.02005.x

Guezguez, B., Vigneron, P., Lamerant, N., Kieda, C., Jaffredo, T., & Dunon, D. (2007). Dual role of melanoma cell adhesion molecule (MCAM)/CD146 in lymphocyte endothelium interaction: MCAM/CD146 promotes rolling via microvilli induction in lymphocyte and is an endothelial adhesion receptor. *J Immunol, 179*(10), 6673-6685. doi:10.4049/jimmunol.179.10.6673

Harkness, L., Zaher, W., Ditzel, N., Isa, A., & Kassem, M. (2016). CD146/MCAM defines functionality of human bone marrow stromal stem cell populations. *Stem Cell Res Ther, 7*, 4. doi:10.1186/s13287-015-0266-z

Hiyama, E., & Hiyama, K. (2007). Telomere and telomerase in stem cells. *Br J Cancer, 96*(7), 1020-1024. doi:10.1038/sj.bjc.6603671

In 't Anker, P. S., Scherjon, S. A., Kleijburg-van der Keur, C., de Groot-Swings, G. M., Claas, F. H., Fibbe, W. E., & Kanhai, H. H. (2004). Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells, 22*(7), 1338-1345. doi:10.1634/stemcells.2004-0058

Jarocha, D., Lukasiewicz, E., & Majka, M. (2008). Adventage of mesenchymal stem cells (MSC) expansion directly from purified bone marrow CD105+

and CD271+ cells. *Folia Histochem Cytobiol, 46*(3), 307-314. doi:10.2478/v10042-008-0046-z
Jiang, B., Zhang, T., Liu, F., Sun, Z., Shi, H., Hua, D., & Yang, C. (2016). The co-stimulatory molecule B7-H3 promotes the epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer. *Oncotarget, 7*(22), 31755-31771. doi:10.18632/oncotarget.9035
Jones, D. L., & Wagers, A. J. (2008). No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol, 9*(1), 11-21. doi:10.1038/nrm2319
Kang, F. B., Wang, L., Jia, H. C., Li, D., Li, H. J., Zhang, Y. G., & Sun, D. X. (2015). B7-H3 promotes aggression and invasion of hepatocellular carcinoma by targeting epithelial-to-mesenchymal transition via JAK2/STAT3/Slug signaling pathway. *Cancer Cell Int, 15*, 45. doi:10.1186/s12935-015-0195-z
Kirches, E., Steffen, T., Waldt, N., Hebert, E., Pachow, D., Wilisch-Neumann, A., . . . Mawrin, C. (2018). The expression of the MSC-marker CD73 and of NF2/Merlin are correlated in meningiomas. *J Neurooncol, 138*(2), 251-259. doi:10.1007/s11060-018-2807-7
Kopher, R. A., Penchev, V. R., Islam, M. S., Hill, K. L., Khosla, S., & Kaufman, D. S. (2010). Human embryonic stem cell-derived CD34+ cells function as MSC progenitor cells. *Bone, 47*(4), 718-728. doi:10.1016/j.bone.2010.06.020
Lim, S., Liu, H., Madeira da Silva, L., Arora, R., Liu, Z., Phillips, J. B., . . . Tan, M. (2016). Immunoregulatory Protein B7-H3 Reprograms Glucose Metabolism in Cancer Cells by ROS-Mediated Stabilization of HIF1alpha. *Cancer Res, 76*(8), 2231-2242. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-1538
Lüllmann-Rauch, R., & Asan, E. (2003). *Taschenlehrbuch Histologie* (6th ed. Vol. 781).
Moore, K., & Persaud,T.V.N. (2007): Embryologie. Entwicklungsstadien, Frühentwicklung, Organogenese, Klinik, 5.Auflage, München: Elsevier
Morrison, S. J., & Kimble, J. (2006). Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature, 441*(7097), 1068-1074. doi:10.1038/nature04956
NCBI. (2019, 18-11-2019). TGFB1 transforming growth factor beta 1 *Gene ID:7040.*
NCBI.(2020, 27-02-2020). CD276 molecule Gene ID:80381
Ni, L., & Dong, C. (2017). New B7 Family Checkpoints in Human Cancers. *Mol Cancer Ther, 16*(7), 1203-1211. doi:10.1158/1535-7163.MCT-16-0761
Nombela-Arrieta, C., Ritz, J., & Silberstein, L. E. (2011). The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol, 12*(2), 126-131. doi:10.1038/nrm3049
O'Connor, K. C. (2019). Molecular Profiles of Cell-to-Cell Variation in the Regenerative Potential of Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cells Int, 2019*, 5924878. doi:10.1155/2019/5924878
Ozerdem, U., Grako, K. A., Dahlin-Huppe, K., Monosov, E., & Stallcup, W. B. (2001). NG2 proteoglycan is expressed exclusively by mural cells during vascular morphogenesis. *Dev Dyn, 222*(2), 218-227. doi:10.1002/dvdy.1200

Pan, W., Cheng, Y., Zhang, H., Liu, B., Mo, X., Li, T., . . . Han, W. (2014). CSBF/C10orf99, a novel potential cytokine, inhibits colon cancer cell growth through inducing G1 arrest. *Sci Rep, 4*, 6812. doi:10.1038/srep06812

Parolini, O., Alviano, F., Bagnara, G. P., Bilic, G., Buhring, H. J., Evangelista, M., . . . Strom, S. C. (2008). Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Stem Cells, 26*(2), 300-311. doi:10.1634/stemcells.2007-0594

Peißert, F. (2017) Human platelet lysate as a supplement in cell expansion media regulates expression of CD146 and SUSD2 in human placenta-derived mesenchymal stromal cells. Bachelorarbeit an der Medizinischen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen

Pierelli, L., Bonanno, G., Rutella, S., Marone, M., Scambia, G., & Leone, G. (2001). CD105 (endoglin) expression on hematopoietic stem/progenitor cells. *Leuk Lymphoma, 42*(6), 1195-1206. doi:10.3109/10428190109097744

Pilz, G. A., Ulrich, C., Ruh, M., Abele, H., Schafer, R., Kluba, T., . . . Aicher, W. K. (2011). Human term placenta-derived mesenchymal stromal cells are less prone to osteogenic differentiation than bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Stem Cells Dev, 20*(4), 635-646. doi:10.1089/scd.2010.0308

Ramos.T.L., Sanchez-Abarca, L. I., Muntion, S., Preciado, S., Puig, N., Lopez-Ruano, G., . . . del Canizo, C. (2016). MSC surface markers (CD44, CD73, and CD90) can identify human MSC-derived extracellular vesicles by conventional flow cytometry. *Cell Commun Signal, 14*, 2. doi:10.1186/s12964-015-0124-8

Rapanotti, M. C., Campione, E., Spallone, G., Orlandi, A., Bernardini, S., & Bianchi, L. (2017). Minimal residual disease in melanoma: circulating melanoma cells and predictive role of MCAM/MUC18/MelCAM/CD146. *Cell Death Discov, 3*, 17005. doi:10.1038/cddiscovery.2017.5

Resta, R., Yamashita, Y., & Thompson, L. F. (1998). Ecto-enzyme and signaling functions of lymphocyte CD73. *Immunol Rev, 161*, 95-109. doi:10.1111/j.1600-065x.1998.tb01574.x

Rosen, E. D., & MacDougald, O. A. (2006). Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol, 7*(12), 885-896. doi:10.1038/nrm2066

Rosen, E. D., Walkey, C. J., Puigserver, P., & Spiegelman, B. M. (2000). Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev, 14*(11), 1293-1307. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10837022

Saalbach, A., Haustein, U. F., & Anderegg, U. (2000). A ligand of human thy-1 is localized on polymorphonuclear leukocytes and monocytes and mediates the binding to activated thy-1-positive microvascular endothelial cells and fibroblasts. *J Invest Dermatol, 115*(5), 882-888. doi:10.1046/j.1523-1747.2000.00104.x

Sadler, Thomas W., (2014). Taschenlerhbuch Embryologie, 12. Auflage, Stuttgart: Georg Thieme Verlag

Saunders, A. E., & Johnson, P. (2010). Modulation of immune cell signalling by the leukocyte common tyrosine phosphatase, CD45. *Cell Signal, 22*(3), 339-348. doi:10.1016/j.cellsig.2009.10.003

Shi, T., Ma, Y., Cao, L., Zhan, S., Xu, Y., Fu, F., . . . Zhang, X. (2019). B7-H3 promotes aerobic glycolysis and chemoresistance in colorectal cancer cells by regulating HK2. *Cell Death Dis, 10*(4), 308. doi:10.1038/s41419-019-1549-6

Shih, I. M. (1999). The role of CD146 (Mel-CAM) in biology and pathology. *J Pathol, 189*(1), 4-11. doi:10.1002/(SICI)1096-9896(199909)189:1<4::AID-PATH332>3.0.CO;2-P

Sivasubramaniyan, K., Harichandan, A., Schumann, S., Sobiesiak, M., Lengerke, C., Maurer, A., . . . Buhring, H. J. (2013). Prospective isolation of mesenchymal stem cells from human bone marrow using novel antibodies directed against Sushi domain containing 2. *Stem Cells Dev, 22*(13), 1944-1954. doi:10.1089/scd.2012.0584

Soncini, M., Vertua, E., Gibelli, L., Zorzi, F., Denegri, M., Albertini, A., . . . Parolini, O. (2007). Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes. *J Tissue Eng Regen Med, 1*(4), 296-305. doi:10.1002/term.40

Spradling, A., Drummond-Barbosa, D., & Kai, T. (2001). Stem cells find their niche. *Nature, 414*(6859), 98-104. doi:10.1038/35102160

Suh, W. K., Wang, S. X., Jheon, A. H., Moreno, L., Yoshinaga, S. K., Ganss, B., . . . Mak, T. W. (2004). The immune regulatory protein B7-H3 promotes osteoblast differentiation and bone mineralization. *Proc Natl Acad Sci U S A, 101*(35), 12969-12973. doi:10.1073/pnas.0405259101

Thomas, E. D., Storb, R., Fefer, A., Slichter, S. J., Bryant, J. I., Buckner, C. D., . . . Lerner, K. E. (1972). Aplastic anaemia treated by marrow transplantation. *Lancet, 1*(7745), 284-289. doi:10.1016/s0140-6736(72)90292-9

Ulfig, N., & Brand-Sabei, B. (2005). Kurzlehrbuch Embryologie, 3. Auflage, Stuttgart: Georg Thieme Verlag

Ulrich, C., Abruzzese, T., Maerz, J. K., Ruh, M., Amend, B., Benz, K., . . . Aicher, W. K. (2015). Human Placenta-Derived CD146-Positive Mesenchymal Stromal Cells Display a Distinct Osteogenic Differentiation Potential. *Stem Cells Dev, 24*(13), 1558-1569. doi:10.1089/scd.2014.0465

Ulrich, C., Rolauffs, B., Abele, H., Bonin, M., Nieselt, K., Hart, M. L., & Aicher, W. K. (2013). Low osteogenic differentiation potential of placenta-derived mesenchymal stromal cells correlates with low expression of the transcription factors Runx2 and Twist2. *Stem Cells Dev, 22*(21), 2859-2872. doi:10.1089/scd.2012.0693

Verpoorten, A., Abruzzese, T., Pilz, A., Abele, H., Hart, M. L., & Aicher, W. K. (2017). Expression of CD146 on Human Placenta-Derived Mesenchymal Stromal Cells and their Osteogenic Differentiation Capacity are Modulated by Factors Contained in Platelet Lysate. *Journal of Regenerative Medicine*, 4. doi:10.4172/2325-9620.1000133

Verpoorten, S. (2014) Untersuchung osteogener Vorprägung und Injektion heilungskompetenter humaner mesenchymaler Stammzellen mit

Trägermaterial unter Anwendung der Wasserstrahl Technologie. Masterarbeit der Fakultät für Medizin an der Eberhard Karls Universität Tübingen

Wang, Y., Xu, J., Chang, L., Meyers, C. A., Zhang, L., Broderick, K., . . . James, A. W. (2019). Relative contributions of adipose-resident CD146(+) pericytes and CD34(+) adventitial progenitor cells in bone tissue engineering. *NPJ Regen Med, 4*, 1. doi:10.1038/s41536-018-0063-2

Watson, A. P., Evans, R. L., & Egland, K. A. (2013). Multiple functions of sushi domain containing 2 (SUSD2) in breast tumorigenesis. *Mol Cancer Res, 11*(1), 74-85. doi:10.1158/1541-7786.MCR-12-0501-T

Winkler, T., Perka, C., von Roth, P., Agres, A. N., Plage, H., Preininger, B., . . . Volk, H. D. (2018). Immunomodulatory placental-expanded, mesenchymal stromal cells improve muscle function following hip arthroplasty. *J Cachexia Sarcopenia Muscle, 9*(5), 880-897. doi:10.1002/jcsm.12316

Yuan, Q. L., Zhang, Y. G., & Chen, Q. (2019). Mesenchymal Stem Cell (MSC)-Derived Extracellular Vesicles: Potential Therapeutics as MSC Trophic Mediators in Regenerative Medicine. *Anat Rec (Hoboken)*. doi:10.1002/ar.24186

Zahavi-Goldstein, E., Blumenfeld, M., Fuchs-Telem, D., Pinzur, L., Rubin, S., Aberman, Z., . . . Ofir, R. (2017). Placenta-derived PLX-PAD mesenchymal-like stromal cells are efficacious in rescuing blood flow in hind limb ischemia mouse model by a dose- and site-dependent mechanism of action. *Cytotherapy, 19*(12), 1438-1446. doi:10.1016/j.jcyt.2017.09.010

Zenke, M., Marx-Stölting, L., & Schickl, H. (2018). *Stammzellforschung. Aktuelle wissenschaftliche und gesellschaftliche Entwicklung*: Berlin-Brandenburgische Akademie der Wissenschaften.

8 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im Zentrum für Medizinische Forschung des Universitätsklinikums Tübingen in der Universitätsklinik für Urologie unter der Betreuung von Prof. Dr. rer. nat. Wilhelm K. Aicher durchgeführt.

Die Planung und Durchführung der Versuche erfolgte in enger Zusammenarbeit mit Frau Tanja Abruzzese und Frau Conny Bock. Der Fokus lag hier in der Einarbeitung in die Zellkultur, die Zelldifferenzierung, die FACS-Färbung, die Immunhistochemie und die RT-PCR. Mit Ausnahme der FACS-Messung und der FACS-Färbung der Zelllinien der Plazenta Pl 09-19, welche von Frau Tanja Abruzzese durchgeführt wurde, wurden die Experimente nach der Einarbeitung selbstständig durchgeführt.

Die Methodik zur Stammzellisolation des fetalen Anteils der Plazenta erfolgte zunächst mithilfe der Methodik von Herrn Prof. Raphael Gorodetsky der Universität Jerusalem.

Die statistische Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Aicher.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

9 Danksagung

Ein großes Dankeschön geht vor allem an die Mitarbeiter des Forschungsinstituts der Urologie der Universitätsklinik Tübingen, die mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Besonders bedanken möchte ich mich hier bei Tanja Abruzzese, die mich mit großer Sorgfalt und Geduld in die Durchführung der Experimente eingearbeitet hat. Nur dadurch war mir eine gewissenhafte Durchführung und Planung der Versuche und ein optimales wissenschaftliches Arbeiten möglich.

Außerdem bedanke ich mich bei den Mitarbeitern des Kreißsaals der Frauenklinik der Universität Tübingen, durch die die Plazentaspende und damit die Zellisolation erst möglich gemacht wurde.

Vor allem möchte ich mich bei der Laborleitung, Herrn Prof. Dr. Wilhelm K. Aicher für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung bedanken.