

Anhaftung multipotenter humaner mesenchymaler  
Stromazellen an spezifischen Peptiden

Studie zur Untersuchung von Zell-Zellmatrix-Interaktionen

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von

Roncoroni, Lorenzo Pietro

2015

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichtstatter: Professor Dr. W. K. Aicher

2. Berichtstatter: Professor Dr. K. Schenke-Layland

Diese Arbeit ist in gleichem Maße  
meinem Vater, meiner Mutter und meiner Schwester gewidmet,  
welche durch ihre Intelligenz, Güte und Sympathie  
stets für mich ein Vorbild sind  
und immer sein werden.

**Inhaltsverzeichnis**

<b>Widmung</b>	<b>III</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>VII</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>VIII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>X</b>
<b>Kapitel 1: Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Grundlagen	1
1.2 Regeneration und Entwicklung	4
1.3 Stammzellnische	5
1.4 Mesenchymale Stromazellen	6
1.5 Zielsetzung	9
<b>Kapitel 2: Material und Methoden</b>	<b>10</b>
2.1 Geräte	10
2.2 Materialien	11
2.3 Substanzen	13
2.4 Software	16
2.5 Untersuchte Gewebe	16
2.6 Untersuchte Peptide	17
2.7 Zusammensetzung der Nährmedien	18
2.8 Zellisolierung aus humanem Knochenmark	19
2.9 Zellisolierung aus humaner postnataler Plazenta	21
2.10 Zellkultur	23
2.11 Kryokonservierung	25
2.12 Auftauen kryokonservierter Zellen	26
2.13 Zelluntersuchung mittels fluorescence activated cell sorting (FACS)	27
2.14 Adipogene / osteogene Differenzierung	29
2.15 Konjugation modifizierter Peptide (MP) mit aktiviertem bovinem Serumalbumin (aBSA)	32
2.16 Centrispin-Aufreinigung der Konjugate	36

2.17	Photometrische Konzentrationsbestimmung der gereinigten Konjugate	38
2.18	Überprüfung der Konjugationen mittels Lithiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (LDS-PAGE)	40
2.19	Modifikation der Herstellung des MP4-Konjugates	42
2.20	Gleichsetzung der Konjugatmassen für die Anhaftungsversuche	43
2.21	Anhaftungsversuche	44
2.22	Peptiduntersuchung basierend auf der Hydropathie jeder einzelnen Aminosäure	48
<b>Kapitel 3: Ergebnisse</b>		<b>49</b>
3.1	Photometrische Messung der Konjugatkonzentrationen	49
3.2	Auswertung einer exemplarischen LDS-PAGE	50
3.3	Merkmale der Zellproben von der 2. Passage bis zum Anhaftungsversuch	52
3.4	Proliferationsmessungen in vitro	53
3.5	FACS-Analyse	53
3.6	Exemplarische Darstellung osteogener Differenzierung mittels von Kossa-Färbung anhand von Knochenmarkszellen	54
3.7	Exemplarische Darstellung adipogener Differenzierung mittels Oil-Red-Färbung anhand von Knochenmarkszellen	55
3.8	Fähigkeit zur osteogenen / adipogenen Differenzierung	55
3.9	Exemplarische Darstellung einzelner Anhaftungsversuche	56
3.10	Anhaftungsdiagramm Knochenmarkszellen	57
3.11	Anhaftungsdiagramm Plazentazellen	59
3.12	Gegenüberstellung der Anhaftungsversuche mit frischen Zellen aus Knochenmark und Plazenta	61
3.13	Prozentualer Vergleich der Anhaftungsversuche mit frischen Zellen aus Knochenmark und Plazenta	62
3.14	Zusammenfassende Gegenüberstellung von Knochenmarks- und Plazentazellen	64
3.15	Kryokonservierung	65
3.16	Peptiduntersuchungen basierend auf dem Hydropathie-Index proteinogener Aminosäuren	66

	<b>VI</b>
<b>Kapitel 4: Diskussion</b>	<b>72</b>
4.1 Differenzierung	72
4.2 Oberflächenmarker	73
4.3 Kryokonservierung	74
4.4 LDS-PAGE	76
4.5 Angleichung der Konjugatmassen	77
4.6 Gezielte Zellpositionierung	77
<b>Kapitel 5: Schlussfolgerung und Ausblick</b>	<b>84</b>
<b>Kapitel 6: Zusammenfassung</b>	<b>86</b>
<b>Danksagung</b>	<b>88</b>
<b>Kongressbeitrag</b>	<b>89</b>
<b>Publikation</b>	<b>90</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>91</b>

Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Seite</b>
1	Geräte	10
2	Materialien	11
3	Substanzen	13
4	Software	16
5	Untersuchte Gewebe	16
6	Untersuchte Peptide	17
7	Zusammensetzung der Nährmedien	18
8	Konjugate mit zugehöriger gemessener Konzentration	43
9	Zusammensetzung von Spezial-DMEM mit Volumenangaben für eine Petrischale	46
10	Mittlere Konzentrationsangaben der Konjugate	49
11	Während der Zellkultur ermittelte Charakteristika im Zeitraum 2. Passage bis Anhaftungsversuch	52
12	Vergleich verschiedener Zellkulturabschnitte auf $T_m$	53
13	Zusammenfassung der FACS-Analysen aller Proben	53
14	Übersicht aller Proben bezogen auf osteogene / adipogene Differenzierung	55
15	Zusammenfassende Gegenüberstellung von Knochenmarks- und Plazentazellen	64

**Abbildungsverzeichnis**

<b>Abbildung</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Seite</b>
1	Aufteilung der 6-well-Platte für die Differenzierungsuntersuchung	29
2	Färbungsschema für 6-well-Platten der Differenzierungsuntersuchungen	30
3	Exemplarische molekulare Darstellung eines modifizierten Peptides	33
4	Molekulare Darstellung des mit Crosslinker versehenen aktivierten bovinen Serumalbumins (aBSA)	34
5	Darstellung der Konjugation von modifiziertem Peptid mit aktiviertem bovinen Serumalbumin gemäß Michael-Addition	35
6	Funktionelle Darstellung einer Centriscpensäule	36
7	Schematische Darstellung der Vorbereitung der Cellstar-35 x 10mm-Petrischalen	44
8	Auswertung einer exemplarischen LDS-PAGE	50
9	Von Kossa-gefärbte Knochenmarkszellen der 2. Passage nach einmonatiger Behandlung mit osteogenem Differenzierungsmedium	54
10	Oil-Red-gefärbte Knochenmarkszellen der 2. Passage nach einmonatiger Behandlung mit adipogenem Differenzierungsmedium	55
11	Veranschaulichung der Anhaftungsbeurteilungen positiv, schwach positiv und negativ	56
12	Übersicht aller Anhaftungsversuche mit Knochenmarkszellen und Gegenüberstellung der Zellen selben Ursprungs in frischer und kryokonservierter Form	57
13	Anhaftungsdiagramm Plazentazellen	59
14	Gegenüberstellung der Anhaftungsversuche mit frischen Zellen aus Knochenmark und Plazenta	61
15	Prozentualer Vergleich der Anhaftungsversuche mit frischen Zellen aus Knochenmark und Plazenta	62
16	Peptid 2 gemäß Hydropathie-Index verschlüsselt und graphisch dargestellt	66
17	Peptid 4 gemäß Hydropathie-Index verschlüsselt und graphisch dargestellt	67

<b>Abbildung</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Seite</b>
18	Peptid 7 gemäß Hydropathie-Index verschlüsselt und graphisch dargestellt	67
19	Peptid 13 gemäß Hydropathie-Index verschlüsselt und graphisch dargestellt	68
20	Peptid 14 gemäß Hydropathie-Index verschlüsselt und graphisch dargestellt	68
21	Peptid 15 gemäß Hydropathie-Index verschlüsselt und graphisch dargestellt	69
22	Peptid 16 gemäß Hydropathie-Index verschlüsselt und graphisch dargestellt	69
23	Peptid 17 gemäß Hydropathie-Index verschlüsselt und graphisch dargestellt	70
24	Die Aminosäuresequenz RGDS gemäß Hydropathie-Index verschlüsselt und graphisch dargestellt	71

**Abkürzungsverzeichnis**

aBSA	Aktiviertes bovines Serumalbumin
ADM	Adipogenes Differenzierungsmedium
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetal calf serum
HBSS	Hank's Buffered Salt Solution
hMSC	humane mesenchymale Stromazelle
K	Konjugat
K-Medium	Knochenmarkmedium
LDS-PAGE	Lithiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
MP	Modifiziertes Peptid
ODM	Osteogenes Differenzierungsmedium
P-Medium	Plazentamedium
PBS	Phosphate Buffered Saline
PFEA	PBS - FCS - EDTA - Natrium-Azid-Stocklösung
SOP	Standard operating procedure

## Kapitel 1: Einleitung

### 1.1: Grundlagen

Die selektive Adhäsion von Zellen an die extrazellulären Matrix (EZM) trägt zur Zellorganisation zu Geweben und zur Festlegung von Gewebegrenzen bei [1]. Die EZM stellt ein dreidimensionales Strukturgerüst für Körpergewebe dar, ermöglicht Gewebeintegrität und beeinflusst das Zellverhalten durch Signalgebung, z.B. durch Interaktion mit zellulären Transmembranrezeptoren während der Entwicklung [1]. Das Material für die EZM wird von Zellen aus der Umgebung sezerniert und durch Enzyme wie Proteasen extrazellulär modifiziert, was wiederum das Zellverhalten beeinflusst [1]. Bestandteile der EZM sind beispielsweise Strukturproteine (Collagene, Elastine), Adhäsionsproteine (Laminine, Fibronectine), Proteoglykane und das Glykosaminoglykan Hyaluronsäure [1]. Die Wechselwirkung zwischen Zellen und EZM-Proteinen wird durch Hemidesmosomen und Fokalkontakte bewerkstelligt, basierend auf Integrinen als Transmembranrezeptoren [1, 2]. Integrinsubstrate der EZM sind unter anderem Collagene, Laminine und das RGD-(Arg-Gly-Asp)-Sequenz-enthaltende Fibronectin [2, 3].

30% der Körpermasse besteht aus Collagenen [2]. Es handelt sich dabei um trimere Glykoproteine mit Tripelhelix als struktureller Grundlage [1, 2]. Als typische EZM-Proteine, die von Fibroblasten und anderen mesenchymalen Zellen gebildet werden, bilden sie extrem schwer wasserlösliche Kollagenfasern oder netzartige Strukturen aus, um Geweben Zugfestigkeit zu verleihen [2].

Typ I-Collagen ist typisch für Knochen und Sehnen, Typ II für Knorpel und Typ IV für die Basallamina [2]. Collagen Typ IV ist Hauptkomponente und als Netzwerk strukturelles Rückgrat der vaskulären Basalmembran [3-5]. Es tritt in Form der 6 unterschiedlichen Genprodukte  $\alpha 1$  bis  $\alpha 6$  auf, wobei  $\alpha 1$ - und  $\alpha 2$ -Isoformen ubiquitär in menschlichen Basalmembranen vorkommen [4, 5]. Integrin-Collagen-Interaktionen beeinflussen die Differenzierung und Migration

von Zellen, zudem interagiert Collagen IV über Lamininassoziation indirekt mit Zellen und begünstigt Zelladhäsion und Wachstum [1, 5]. Mittels integrinvermittelter Kontakte üben Fibroblasten Kräfte auf sich bildende Kollagenfasern aus, was zu deren Formung beiträgt [2].

Laminine sind trimere Proteine mit den Untereinheiten A, B1 und B2, von denen es jeweils zahlreiche gewebespezifische Formen gibt [1]. Sie ermöglichen durch Interaktion mit Integrinen und anderen Molekülen wie Collagen IV die Zelladhäsion an die Basallamina [1].

Fibronectine ermöglichen als dimere Glykoproteine durch RGD-(Arg-Gly-Asp)-Bindedomänen die Zell-Matrix-Adhäsion und beeinflussen über Integrine Wachstum, Form, Bewegung, Differenzierung und Überleben von Zellen [1, 6]. Sie verfügen neben Bindungsstellen für Integrine weitere für Collagen und Heparin [1]. Lösliche Spleißformen der Fibronectine zirkulieren im Kreislauf und können im Rahmen der Wundheilung durch kovalente Vernetzung mit Fibrin beim primären Wundverschluss mitwirken [1]. Die Erstellung von Fibronectinmatrix erfolgt durch Einfangen von löslichem, protomerem Fibronectin und der koordinierten Aktivität von Integrinrezeptoren sowie dem Aktinzytoskelett [7]. Dabei werden Fibronectin-Protomere zellabhängig entfaltet, um ihre homophilen Bindungsstellen freizulegen und die Bildung von Fibronectin-Multimeren zu ermöglichen [7]. Das Zytoskelett vermittelt über Integrine die nötige Spannkraft, um Fibronectin-Multimere zu Fibrillen zu reorganisieren [7]. Die Fibronectinmatrix ist eine dynamische Struktur, die sowohl in der Entwicklung als auch im adulten Organismus einer konstanten Umgestaltung unterzogen wird [7]. Sie bildet ein extrazelluläres Gerüst, das im Rahmen der Gewebeorganisation angemessene Zellarchitektur, den Differenzierungsstatus und die Collagenmatrixanordnung unterstützt [7]. Das  $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin ist ein klassischer Fibronectinrezeptor, der die Zelladhäsion an Fibronectin vermittelt, an der Erstellung von Fibronectinmatrix mitwirkt und spezifische Signalwege reguliert [8]. Ein Gen-Knockout der

$\alpha 5$ -Integrinuntereinheit ist mit behinderter Angiogenese assoziiert und resultiert in einer Letalmutante [8].

Bereits 1987 wurden Integrine als heterodimere Zelloberflächenrezeptoren beschrieben, sie bestehen aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit [2, 9].

Durch Integrinbindung passender Substrate mit anschließender Integrin-Clusterbildung entstehen Fokalkontakte, die der Zelle Umgebungsinformationen liefern, die Zelladhäsion an die EZM ermöglichen, als intrazellulärer Verankerungspunkt für das Actinzytoskelett dienen, zur Regulation der Genexpression und Anhaftungsstärke beitragen und sich auf das Überleben, Migration und Wachstum der Zelle auswirken [1, 2, 7, 10]. Zunächst liegen die Integrine in der Zellmembran in inaktiver Form mit geringer Affinität zur EZM vor, sie können aber durch Talindimere in ihre hochaffine, an die EZM bindende Konformation gebracht werden [2]. Der Gruppierung der Integrin-Talin-Komplexe zu Fokalkontakten folgt die Rekrutierung von Vinculin, welches die Fokalkontakte an Actinfilamente bindet [2]. Die Filamente werden durch  $\alpha$ -Actinin zu kräftigen Actinzugfasern gebündelt, die Kontraktion der Actinfilamente gegen die EZM ermöglicht Zellbewegung [1, 2].

Integrine besitzen Bindungsstellen für divalente Kationen, welche Ligandenbindungen fördern oder hemmen können sowie die Spezifität der Ligandenbindung beeinflussen [9, 11]. Das Entfernen von Integrin-inhibierendem  $\text{Ca}^{2+}$ , die Präsenz von  $\text{Mg}^{2+}$  oder das Hinzugeben von  $\text{Mn}^{2+}$ , welches als nicht physiologischer Stimulus Integrine in eine Konformation hoher Affinität überführt, steigert deutlich die Ligandenbindungs-Affinität der meisten Integrine [11]. Werden divalente Kationen durch EDTA entfernt kommt es zu einer vollständigen Inhibierung von Integrin-Liganden-Bindungen [11]. Während früher Phasen von Hautverletzungen besteht in der extrazellulären Flüssigkeit der Wunde eine erhöhte  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration und eine erniedrigte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, was integrinvermittelte Entzündungsantworten mit Wanderung von Keratinozyten, Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen auf Kollagen fördert [11].

### 1.2: Regeneration und Entwicklung

Der menschliche Körper ist zur ständigen Reparatur und seiner Instandhaltung lebenslang auf adulte Stammzellen angewiesen, wobei unterschiedliche Gewebe in unterschiedlichem Maße regeneriert werden können [2]. Die Instandhaltung des Körpers nach größeren Gewebeschäden wird oft zwecks schneller Schadensbegrenzung durch eine rasche Vernarbung von Defekten mittels Fibroblastenproliferation bewerkstelligt, was den Verlust von Funktionsgewebe zugunsten funktionell minderwertiger, bindegewebiger Ersatzstrukturen bedeutet [2]. Eine Schlüsselrolle der funktionellen Regeneration nimmt das Entwicklungspotenzial von Zellen ein, welches das Ausmaß der Regenerationsmöglichkeiten beeinflusst [1, 2]. Totipotenz besteht bei unspezialisierten Zellen wie Zygote und ihrer unmittelbaren Nachkommen, die einschließlich der Embryonalhülle alle Zellen des Organismus bilden können [1]. Spezialisierte, pluripotente Nachfolgerzellen bilden Trophoblast oder innere Zellmasse und sind in ihrem Entwicklungspotenzial eingeschränkt: Die innere Zellmasse kann alle Zellen des Embryos und das Amnion hervorbringen, aber keine Trophoblaststrukturen wie Zottenhaut oder embryonaler Plazentaanteil [1]. Die aus der inneren Zellmasse entstandenen Keimblätter Ektoderm, Mesoderm und Endoderm bringen multipotente Zellen hervor [1]. Das Mesoderm wird abhängig von seiner topographischen Lage in der Keimscheibe als axiales, paraxiales, intermediäres sowie laterales Mesoderm klassifiziert [12]. Die auch als Ursegmente bekannten Somiten entstehen aus dem paraxialen Mesoderm und lagern sich paarig um das Neuralrohr an [12]. Lateraler und dorsaler Somitanteil entwickelt sich zum Myotom und Dermatome [12]. Aus dem Myotome entsteht die jeweilige segmentale Rumpfmuskulatur, aus dem Dermatome die zugehörige Dermis mit Korium und Subkutis [12]. Ventraler und medialer Somitanteil entwickeln sich zum Sklerotome, dieses wiederum zum als Mesenchym bezeichneten embryonalen Bindegewebe, hieraus wiederum u.a. die Wirbelsäule [12]. Somiten bilden sich während der Entwicklung von einer epithelialen, flächigen Struktur zu einer raumfüllenden,

dreidimensionalen Struktur um [13]. Zudem wird Interzellulärsubstanz zur Erschaffung interzellulärer Matrix gebildet [13]. Die weitere Differenzierung multipotenter Zellen führt zu unipotenten Vorläuferzellen, aus denen ein einziger, differenzierter Zelltyp hervorgeht [1]. Spezialisierte, ausgereifte und nicht mehr mitotische Zellen werden als terminal differenziert bezeichnet [1].

### **1.3: Stammzellnische**

In Geweben wie Knochenmark, Haut, Riechepithel, Darmepithel und Gehirn befinden sich Zellen, die sich den speziellen, organotypischen Differenzierungen nicht unterzogen haben und als somatische Stammzellen multipotent geblieben sind, um das Regenerationspotential des Organismus aufrecht zu erhalten [13]. Diese adulten Stammzellen befinden sich in sogenannten Nischen, die durch spezielle Organisation von EZM, Zellen und Wachstumsfaktoren die Stammzellen gegen unerwünschte externe Einflüsse abschirmen, sie in der Nische und unter strenger Proliferationskontrolle halten sollen [2, 14]. Bei symmetrischer Zellteilung proliferieren Stammzellen durch Entstehung von zwei gleichen Tochterzellen, bei asymmetrischer Zellteilung entsteht eine der Ursprungszelle gleichende Tochterzelle sowie eine differenziertere Version [1]. Bereits 1960 stellte man im Knochenmark zwei Arten von Stammzellen fest: Hämatopoetische Stammzellen zur Bildung verschiedener Blutzellen einerseits, Knochenmarkstromazellen als gemischte Zellpopulation andererseits, denen die Genese von Knochen, Knorpel, Fettgewebe und Faserbindegewebe zugeschrieben wurde [1].

### 1.4: Mesenchymale Stromazellen

Eine bestimmte Zellpopulation der Knochenmarkstromazellen, sogenannte mesenchymale Stromazellen (mesenchymal stromal cells = MSC), sind Gegenstand intensiver Forschung geworden [14]. Bei diesen Zellen handelt es sich um Progenitorzellen mesenchymalen Gewebes, welche die Gewebebildung und Organogenese in der embryonalen Entwicklung ermöglichen und im infantilen sowie adulten Organismus an der Gewebsregeneration teilnehmen [14, 15]. Durch Bereitstellung von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und extrazellulären Matrixkomponenten unterstützen MSC unter anderem Überleben, Regeneration, Expansion, Differenzierung und Migration von hämatopoetischen Stammzellen in vitro [16]. Außerdem können MSC Makrophagen, dendritische Zellen, natürliche Killerzellen, B-Zellen, CD<sup>4+</sup>- und CD<sup>8+</sup>-T-Zellen, also sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem beeinflussen [15]. Von natürlichen Killerzellen produziertes Interferon- $\gamma$  zum Beispiel induziert bei hMSC als einen der Hauptmechanismen der T-Zell-Immunsuppression die Expression von Indolamin 2,3-Dioxygenase, welche Tryptophan aus der Umgebung abbaut [15, 17-20]. Die Tryptophandegradation unterdrückt signifikant die T-Zell-Proliferation [20]. Allerdings induziert Interferon- $\gamma$  auch die MHC-I- und in geringerem Ausmaß die MHC-II-Expression von hMSC, was diese von immunprivilegierten zu immunogenen Zellen werden lässt [20].

Die PGE<sub>2</sub>-Sezernierung von MSC wirkt immunsuppressiv durch IL10-Synthesestimulierung von Makrophagen und Inhibierung der Monozytendifferenzierung zu dendritischen Zellen [15]. Niedrige PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen modulieren die Immunantwort vom Th1-Typ zum Th2/Th17-Typ [15]. Hohe PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen inhibieren die T-Zell-Proliferation durch Reduktion der IL2-Synthese und Verminderung der IL2-Rezeptorexpression [15].

Viele MSC-Quellen wurden beschrieben, darunter prominentere wie Knochenmark, fetales oder Neugeborengewebe (z.B. Plazenta, innere Eihaut, Wharton-Sulze) sowie Fettgewebe [14, 15, 21]. Außerdem Muskel, Leber, Milz, Niere, Lunge, Pankreas, Gehirn, Zahnpulpa, Thymus und Nabelschnurblut [15]. Das Vorkommen von adulten MSC in zahlreichen Organen und Geweben bietet also relativ leichte Zugänglichkeit zu einem Forschungsmaterial, das der Ergründung menschlicher Beeinflussbarkeit regenerativer und immunmodulatorischer Prozesse im Organismus dienen kann. Mit steigendem Interesse an diesen Zellen sind auch die Ansprüche gestiegen, was ihre Definition und Charakterisierung angeht. Gemäß einem Bericht der International Society for Cellular Therapy (ISCT) ist für plastikadhärente Zellen aus Knochenmark und anderen Geweben, die in der Vergangenheit "mesenchymale Stammzellen" genannt wurden, aufgrund eingeschränkter Stammzellfähigkeiten die Bezeichnung "mesenchymale Stromazelle" zu bevorzugen [14, 22]. Zur Charakterisierung humaner MSC wurden Minimalkriterien erstellt [22]: MSC zeichnen sich unter Standard-Kulturbedingungen durch Plastikadhärenz und unter Standard-Differenzierungsbedingungen durch die Möglichkeit der Differenzierung zu Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten aus [22]. Bestimmte Oberflächenstruktur-Profile sollen die Identifizierung von MSC erleichtern, bestehend aus einem positiven Nachweis von CD105, CD73 und CD90 bei negativem Ergebnis für CD45, CD34 und CD14 oder negativ für CD11b und CD79 $\alpha$  oder negativ für CD19 und HLA-DR-Oberflächenmoleküle [22].

CD105, auch als Endoglin bekannt, ist ein transmembranes, homodimeres Zelloberflächen-Glycoprotein, das von MSC, Endothelzellen, Muskelzellen, Bindegewebsfibroblasten und plazentaren Syncytiotrophoblasten exprimiert wird [22-26]. Es dient der Umwandlung von TGF- $\beta$ -Signalwegen, die in der Proliferation, Migration, Differenzierung und der extrazellulären Matrixbildung involviert sind [26]. Hypoxie und TGF- $\beta$  induzieren die Expression humanen Endoglins [27]. Während der Entwicklung ist CD105 an der Gefäßbildung

beteiligt und wird auf Gefäßendothelwänden in Geweben mit stattfindender Angiogenese wie Tumoren und regenerierenden oder entzündeten Geweben überexprimiert [23, 28].

Die Ecto-5'-Nucleotidase CD73 wirkt durch Produktion extrazellulären Adenosins antiinflammatorisch und immunsuppressiv [22, 29]. Sie verschiebt das Gleichgewicht von proinflammatorischem ATP und prothrombotischem ADP zu antiinflammatorischem Adenosin, welches die Endothelintegrität fördert und neuroprotektive Eigenschaften hat [30].

Die Expression des Zelloberflächenproteins CD90 (humanes Thy-1) wurde auf aktivierten mikrovaskulären Endothelzellen im Rahmen von Entzündungen oder Tumoren beschrieben, nicht jedoch bei Endothelzellen gesunden Gewebes [22, 31]. CD45 ist eine Protein-Tyrosin-Phosphatase, die auf Leukozyten exprimiert wird und essentiell für die rezeptorvermittelte Signalübertragung in T-Zellen, B-Zellen sowie Mikroglia ist [32, 33]. Die Signalübertragung wird hierbei durch Zytokinrezeptoren und Zelladhäsion moduliert [32]. CD 34 ist ein Glycoprotein, das auf frühen hämatopoetischen Progenitorzellen und Endothelzellen gefunden wird [22, 34, 35]. Makrophagen, Monozyten, Promonozyten und aktivierte Granulozyten exprimieren CD14 [22, 36, 37]. CD11b findet sich bei Monozyten und Makrophagen [22]. CD79 $\alpha$  und CD19 werden von B-Zellen exprimiert [22, 38]. HLA-DR-Moleküle werden von Interferon- $\gamma$ -stimulierten MSC exprimiert [22].

### 1.5: Zielsetzung

Humane mesenchymale Stromazellen weisen sowohl unter funktionellem als auch unter logistischem Aspekt ein hohes Potenzial in der Therapieentwicklung im Rahmen der Regenerationsmedizin und Immunologie auf [14]. Es konnte gezeigt werden, dass hMSC aus unterschiedlichen Geweben des Menschen gewonnen werden können [39], eine grundlegende Verfügbarkeit ist gegeben. Mögliche Therapieansätze verschiedener Erkrankungen werden zunehmend in Betracht gezogen, wie z.B. Osteogenesis imperfecta [40, 41], avaskuläre Osteonekrose [42], Meniskusläsionen [43, 44], autoimmune Innenohrerkrankung [15, 45], atopische Dermatitis [15, 45], Polymyositis [15, 45], rheumatoide Arthritis [15, 45], Graft versus host disease [46, 47] und multiple Sklerose [15, 45]. Ziel dieser Dissertation ist die Ermittlung einer Möglichkeit gezielter Positionierung von hMSC im Organismus zwecks möglichst kontrollierter Nutzbarmachung ihrer regenerativen und immunmodulatorischen Eigenschaften. Minimale Erkennungssequenzen aus makromolekularen Integrinliganden stehen dabei im Mittelpunkt der Untersuchungen. Im Rahmen der Vorarbeiten zu diesem Projekt und in Zusammenarbeit mit dem Naturwissenschaftlichen und Medizinischen Institut (NMI) sowie Cellendes GmbH in Reutlingen wurde bereits ein groß angelegtes Peptid-Screening durchgeführt und aus zahlreichen Peptiden 8 selektiert, welche mit den Andocksystemen von humanen MSC kompatibel zu sein schienen. Collagen, Fibronectin und Laminin sind die Ursprungsstrukturen dieser acht Peptide [48]. Das Bindungsverhalten humaner MSC bezüglich der 8 selektierten Peptide soll nun durch Anhaftungsversuche mit den gescreenten, auf Trägermolekülen gekoppelten Peptiden überprüft und mögliche Applikationen daraus abgeleitet werden. Zellmaterial wird aus Knochenmark und Plazenta bezogen und als hMSC identifiziert. Die im Labor gängige Kryokonservierungsmethode mit Stickstoff soll außerdem darauf geprüft werden, ob sie für die zukünftige Lagerung und den Transport dieser Zellen geeignet ist und welche Auswirkungen sie nach Auftauen und Resuspension der Zellen auf ihren Zustand und ihr Verhalten hat.

**Kapitel 2: Material und Methoden****2.1: Geräte****Tabelle 1: Geräte**

Gerät	Hersteller
Centrifuge 5804 R	Eppendorf AG
Eppendorf Centrifuge 5424	Eppendorf AG
Flow Cytometer BD LSR II	BD Biosciences
Gelelektrophoresekammer Xcell Sure Lock, Novex Mini-Cell	Invitrogen
Inkubator, auf 37°C und 5% CO <sub>2</sub> eingestellt	Binder
Kryotank LS 3000	Taylor Wharton Lab Systems
Low voltage power supply for electrophoresis: Biometra Standard Power Pack P25	Biometra GmbH
Mikroskop Axiovert 135	Zeiss
Mikroskop Leica DM IL LED	Leica Microsystems Wetzlar GmbH
Nikon CoolPix E4500	Zeiss
Neubauer Zählkammer, 0,100 mm Tiefe, 0,0025 mm <sup>2</sup> , Neubauer Improved, Bright-Line	Assistent
Pipetus Akku	Hirschmann Laborgeräte
Photometer BioTek EL 800	BioTek Instruments
PowerShot S45, AiAF	Canon Inc.
Orbitalschüttler: Motor: IKA Vibrax- VXR, electronic, mit Plattform Typ VX7	Janke & Kunkel GmbH & Co. KG
Sterile Sicherheitswerkbank	BDK Luft-und Reinraumtechnik GmbH
-70°C-Tiefkühlschrank	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH
-20°C-Tiefkühlschrank	Liebherr Premium
Ultraschallbad Transsonic T460	Elma GmbH & Co KG
Vortexer Heidolph REAX top	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG
Waage: Kern GJ 4100-2M	Kern & Sohn GmbH
Wasserbad W 12	Preiss Daimler

**2.2: Materialien****Tabelle 2: Materialien**

Material	Hersteller
6 well plate, polystyrene, with lid, physical surface treatment	Greiner bio-one
B/Braun Injekt, 10 ml, Luer Solo	B.Braun Melsungen AG
BD Falcon 5 ml Polystyrene Round Bottom Tube	BD Biosciences
BD Microlance 3, 20G 1 ½"-Nr.1, 0,9 x 40 mm	Becton Dickinson S. A.
Cell culture Flask, 75 cm <sup>2</sup> , tissue-culture treated polystyrene, canted neck, vented cap, BD Falcon	BD Biosciences
Cellstar 96 well cell culture plate	Greiner bio-one
Cellstar Petri dish, 35 x 10 mm, physical surface treatment	Greiner bio-one
Cellstar Tubes, 50 ml	Greiner bio-one
Centrispin <sup>10</sup> Columns + Wash tubes	Princeton Separations INC.
CryoTube Vials, 1,8 ml	Nunc A/S
Dako Pen s2002	Dako Denmark A/S
Edelstahltopf, autoklavierbar	Carl Roth GmbH + Co. KG
Feather disposable scalpel, stainless steel blade with plastic handle	Feather Safety Razor Co., LTD.
Mikropipetten 100-1000 µl / 20-200 µl / 10-100 µl / 0,5-10 µl	Eppendorf Research
MoliNea plus	Paul Hartmann AG
NuPAGE 4-12% Bis-Tris-Gel, 1.0 mm x 15 well	Invitrogen
Petri dishes 145/20 mm	Greiner bio-one
Pinzetten, steril, stainless, autoklavierbar	
Reaktionsgefäße 3810X 1,5 ml	Eppendorf AG
Röhre 15 ml, 120 x 17 mm, PP	Sarstedt Aktiengesellschaft & Co.
Safe-Lock Tubes 0,5 ml / 2,0 ml	Eppendorf AG
SafeSeal-Tips premium, 100 UL / 200 UL / 1000 UL	Biozyme Scientific GmbH

Fortsetzung Tabelle 2

Material	Hersteller
Serological Pipet, Falcon 25 ml in 1/4 ml, 10 ml in 1/10 ml, 5 ml in 1/10 ml, 2 ml in 1/100 ml	Becton Dickinson Labware
Tissue Culture Dishes, PS, 94 x 16 mm, sterile	Greiner bio-one

**2.3: Substanzen****Tabelle 3: Substanzen**

Substanz	Hersteller
0,025% NuPAGE Antioxidantreagenz	Invitrogen
2-Propanol = Isopropanol (CH <sub>3</sub> CH(OH)CH <sub>3</sub> )	Merck KGaA
3-D Life Maleimide-BSA, 510 µl, 100 mg/ml	Cellendes
3-Isobutyl-1-methylxanthin, Biochemica	AppliChem GmbH
Accutase	PAA Laboratories GmbH
Albumin from bovine serum, minimum 96 % electrophoresis	Sigma-Aldrich
Ampuwa	Fresenius Kabi Deutschland GmbH
β-Glycerophosphate disodium salt hydrate	Sigma-Aldrich
Bio Whittaker L-Glutamine, 200 mM Solution in 0,85% NaCl Solution	Lonza
Bovine serum albumin standard, part of BIORAD DC Protein Assay Kit II	Bio-Rad Laboratories
Brilliantblau R250, 10 g	Bio-Rad Laboratories
Collagenase (1500 U/ml) from Clostridium histolyticum, C9407-100MG	Sigma Aldrich
Descosept AF, 1 Liter	Dr. Schumacher GmbH
Dexamethasone, minimum 98 % HPCL, D1756-100MG	Sigma-Aldrich
Dimethyl Sulphoxide, Hybri-Max	Sigma-Aldrich
Dispase II (neutral protease, grade II), from Bacillus polymyxa (2,4 U/ml)	Roche
DMEM High Glucose (4,5 g/l), with L- Glutamine, with Sodium Pyruvate	PAA Laboratories GmbH
DMEM Low Glucose (1 g/l), without L-Glutamine, with 25 mM HEPES	PAA Laboratories GmbH
Dulbecco's PBS (1x), without Ca & Mg	PAA Laboratories GmbH
Essigsäure (CH <sub>3</sub> COOH)	Merck KGaA

Substanz	Hersteller
Ethanol, absolute for analysis, EMSURE®, ACS, ISO, Reag. Ph Eur	Merck KGaA
FCS (fetal calf serum): FBS Superior	Biochrom AG
Ficoll-Paque Premium 1,077 +/- 0,001 g/ml (+20°C)	GE Healthcare Bio-Sciences AB
FITC Mouse Anti Human CD14, Isotype IgG <sub>2a</sub> κ	BD Biosciences
Fresh Frozen Plasma (FFP) =Human Plasma recovered diagnostic grade	PAA
Gelmarker SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard 1x	Invitrogen
Hank's BSS (1x), with Ca & MG, without Phenol Red	PAA Laboratories GmbH
Heparin Natriumsalz	Carl Roth GmbH + Co.KG
Indomethacin, 10 g	Calbiochem-Novabiochem Corporation
Infusionslösung Gamunex 10%, 100 mg/ml, (humanes IgG)	Talecris Biotherapeutics GmbH
Insulin solution, human	Sigma-Aldrich
L-Ascorbic Acid, 100 g	Sigma-Aldrich
Methanol, AnalaR Normapur, BDH, Prolabo	VWR International S.A.S.
MIKE-Ionenmix mit 100 M CaCl <sub>2</sub> , 100 mM MgCl <sub>2</sub> , 2,5 mM NaCl <sub>2</sub>	Gemäß laborinternem SOP-Protokoll
Modifizierte Peptide 2, 4, 7, 13, 14, 15, 16, 17	Intavis Bioanalytical Instruments Aktiengesellschaft
MOUSE ANTI HUMAN CD105:FITC, Isotype IgG <sub>1</sub>	AbD serotec
Konjugationspuffer (100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , ph=7,5)	
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> ) reinst	Merck KGaA
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	E. Merck
NuPAGE LDS Sample Buffer 4x	Invitrogen
NuPAGE MOPS SDS Running Buffer 20x	Invitrogen
NuPAGE Sample Reducing Agent 10x	Invitrogen
Oil Red O	Sigma-Aldrich

Substanz	Hersteller
Partricin (Fungicide), 50 µg/ml	Biochrom AG
PE anti-human CD34, Isotype Mouse IgG <sub>1</sub> κ	BioLegend
PE anti-human CD45, Isotype Mouse IgG <sub>1</sub> κ	BioLegend
PE Conjugated Mouse Anti Human CD73, Isotype Mouse IgG <sub>1</sub> κ	BD Biosciences
PE-conjugated mouse monoclonal anti-CD90/Thy-1, Isotype mouse IgG <sub>2A</sub>	R&D Systems
PE conjugated mouse monoclonal anti-human MCAM/CD146, Isotype mouse IgG <sub>1</sub>	R&D Systems
Penicillin (10000 U/ml) Streptomycin (10000 µg/ml), Gibco	Invitrogen
Pool-Thrombozytenlysate, PTL/TÜ, hergestellt aus 25 Einzelspenden, injektionsserolog. getestet	ZKT, Otf.-Müller-Str. 4/1, 72076, Tübingen
Positivkontrolle Laminin 2020-1MG (Laminin from Engelbreth-Holm- Swarm murine sarcoma basement membrane), 1 mg/ml in Tris buffered NaCl, sterile filtered	Sigma-Aldrich
Positivkontrolle Fibronectin human, 1mg	Harbor Bio-Products
Reagent A, Bio-Rad D <sub>C</sub> Protein Assay	Bio-Rad Laboratories
Reagent S, Bio-Rad D <sub>C</sub> Protein Assay	Bio Rad Laboratories
Reagent B, Bio-Rad D <sub>C</sub> Protein Assay	Bio-Rad Laboratories
Ringerlösung Fresenius 500 ml	Fresenius Kabi Deutschland GmbH
Silbernitrat	Carl Roth GmbH + Co.KG
Sodium Thiosulfate Pentahydrate (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> x 5 H <sub>2</sub> O)	Sigma Chemical Co.
Titriplex III (C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>8</sub> * 2 H <sub>2</sub> O) =Na-EDTA	Merck KGaA
Trypan blue-Lösung 0,4%	Sigma-Aldrich
Trypsin-EDTA (1x)	PAA Laboratories GmbH

**2.4: Software****Tabelle 4: Software**

Software	Hersteller
Accelrys Draw 4.0	Accelrys Software Inc.
AxioVs 40 V4.6.3.0	Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH
FACS-Analyse-Software: BD FACS Diva Software	
Flow Jo	Tree Star, Inc.
Remote Capture Version 2.6.0.14, Canon Camera Support Library Version 5.0.0.13	Canon Inc.

**2.5: Untersuchte Gewebe**

Die von den jeweiligen Kliniken zur Verfügung gestellte Gewebeproben wurden direkt in das Zentrum für Medizinische Forschung geliefert.

**Tabelle 5: Untersuchte Gewebe**

Gewebe	Probenanzahl N von individuellen Spendern	Ursprung
Knochenmark	8	Universitätsklinik für Orthopädie Tübingen und Berufsgenossenschaftliche Unfallklinik Tübingen
Postnatale Plazenta: Ohne Nabelschnur, ohne Amnionepithel	5	Frauenklinik Universitätsklinikum Tübingen

Die Studie mit Knochenmark wurde von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät Tübingen unter dem Aktenzeichen 263/2007BO2 und die Studie mit Plazenta unter dem Aktenzeichen 248/2005A genehmigt.

**2.6: Untersuchte Peptide****Tabelle 6: Untersuchte Peptide**

Die Aminosäuresequenzen wurden den Lieferscheinen von Intavis Bioanalytical Instruments Aktiengesellschaft entnommen.

Peptid-codierung	Aminosäuresequenz des Peptides	Atomare Masse der Peptidsequenz	Ursprung [48]
2	GEFYF DLRLK GDK	ca. 1585 Da	Collagen IV $\alpha$ 1, Homo sapiens, 100% Übereinstimmung
4	LAIKN DNLVY VY	ca. 1421 Da	Laminin $\alpha$ 4 chain G domain, Homo sapiens, 100% Übereinstimmung
7	WQPPR ARITG Y	ca. 1344 Da	Fibronectin, Homo sapiens, 100% Übereinstimmung
13	AASIK AVAVS ADR	ca. 1257 Da	Laminin $\alpha$ 1, Homo sapiens, 92% Übereinstimmung
14	DVISL YNFKH IY	ca. 1509 Da	Laminin $\alpha$ 4 chain G domain, Homo sapiens, 100% Übereinstimmung
15	KREDV Y	ca. 808 Da	Synthetisch, Sequenz teilweise in Fibronectin vorhanden, Homo sapiens, 66,6% Übereinstimmung
16	EILDV (Bestandteil von Peptid 17)	ca. 600 Da	Fibronectin Typ III, Homo sapiens, 100% Übereinstimmung
17	DELPQ LVTLP HPNLH GPEIL DVPST	ca. 2726 Da	Fibronectin Typ III, Homo sapiens, 100% Übereinstimmung

**2.7: Zusammensetzung der Nährmedien****Tabelle 7: Zusammensetzung der Nährmedien [49]**

	Basis-Medium	Mangel-Medium	K-Medium	P-Medium	ODM	ADM
DMEM LG	450 ml	450 ml	450 ml	450 ml		
Heparin 1000 IE	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml		
Glutamin 2mM	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml		
Pen/Strep	5 ml	5 ml	5 ml	10 ml	5 ml	5 ml
FFP		500 µl	25 ml	25 ml		
TZL		500 µl	25 ml	25 ml		
Partricin				5 ml	6 ml	6 ml
DMEM HG					427 ml	426 ml
Fetales Kälberserum					50 ml	50 ml
Dexamethason					500 µl	500 µl
β-Glycerophosphat					5 ml	
L-Ascorbinsäure					1,75 ml	
Indomethacin						2 ml
Insulin						500 µl
3-Isobutyl-1-methylxanthin						5 ml

**ADM**=Adipogenes Differenzierungsmedium;  
**FFP**=Fresh frozen plasma;  
**K-Medium**=Medium für Knochenmarkzellen;  
**ODM**=Osteogenes Differenzierungsmedium;  
**Pen/Strep**=Penicillin/Streptomycin;  
**P-Medium**=Medium für Plazentazellen;  
**TZL**=Thrombozytenlysat

**2.8: Zellisolierung aus humanem Knochenmark** [49]

Das gelieferte, heparinversetzte (5000 U/ml) Knochenmark befindet sich in einem 50 ml-Cellstar-Tube und besteht aus kleinen Knochenfragmenten inmitten einer dunkelrot blutigen, nicht geronnenen und leicht viskösen Flüssigkeit sowie orange-gelblichem zähflüssigem Fett am Übergang Flüssigkeit/Luft.

Der Inhalt wird mit PBS im Verhältnis 1:1 verdünnt und mittels Pipetus gut durchmischt, wobei die Spitze der serologischen Pipette regelmäßig durch Knochenfragmente obstruiert wird. Dies wird genutzt, um größere Fragmente mit der Pinzette aus der Probe zu entfernen.

Nach 10 min Zentrifugieren bei Raumtemperatur und 150 g erkennt man am Boden des Tubes ein dunkelrotes Pellet, darüber roten, flüssigen Überstand und an der Oberfläche aufzentrifugiertes Fett. Ohne das Pellet abzusaugen wird die komplette Fettschicht und der Überstand entfernt.

Im Verhältnis 1:1 bis maximal 1:2 wird nun das Pellet mit PBS zu einem Gesamtvolumen von etwa 30 ml durchmischt.

10 ml Ficoll-Paque Premium werden in einem neuen 50 ml-Cellstar-Tube vorbereitet, um darauf vorsichtig die ca. 30 ml Probenflüssigkeit aufzutragen. Der Probeninhalt soll als obere Phase auf dem Ficoll schwimmen und darf die untere Ficollphase nicht durchsetzen.

Nach 30 min Zentrifugieren bei Raumtemperatur, 400 g und ohne Bremse erhält man ein dunkelrotes Pellet und darüber einen Überstand, der über eine optisch dichtere Interphase verfügt. Eben diese wird gezielt abgesaugt und wiederum in ein neues 50 ml-Cellstar-Tube überführt, mit frischem PBS aufgefüllt, vermischt und 10 min bei Raumtemperatur und 150 g zentrifugiert.

Bei gut sichtbarem Pellet werden zwei 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen mit je 10 ml K-Medium vorbereitet, bei kaum erkennbarem Pellet nur eine.

Vom Probenröhrchen wird der Überstand abgesaugt, das Pellet mit 6 ml K-Medium vermischt und auf die vorbereiteten Kulturflaschen verteilt.

24 Stunden später adhären intakte Zellen bereits gut an der Kulturflaschenoberfläche, es wird ein voller Mediumwechsel durchgeführt: Die komplette Flüssigkeit wird entfernt und 10 ml frisches K-Medium aufgefüllt.

**2.9: Zellisolierung aus humaner postnataler Plazenta** [49]

Die Plazenta (Sectio caesarea) wird in einem geschlossenen Edelstahlbehälter in das Labor geliefert. Dort werden zunächst von anderen Forschergruppen die Nabelschnur und das Amnionepithel für deren Studien entfernt. Die restliche Plazenta, bestehend aus fetalem und maternalem Anteil, wird für unsere Studie genutzt. Der Zeitraum zwischen Sectio caesarea und Beginn der Bearbeitung des Plazentagewebes für unsere Studie betrug 2 bis max. 3 Stunden.

Folgende Lösungen sollten vor der Gewebearbeitung bereitstehen:

- Lösung 1: 500 ml HBSS+10 ml 1%Pen/Strep
- Verdau-HBSS: 100 mg Collagenase in 10 ml HBSS vorgelöst in eine leere HBSS-Flasche füllen, 230 ml HBSS und schließlich 12 ml Dispase hinzugeben

Zunächst wird in einige 145/20 mm-Petrischalen HBSS gegeben, wobei die Anzahl benötigter Petrischalen abhängig von der Plazentagröße abgeschätzt wird. Die flach ausgelegte Plazenta wird in handhabbare Portionen geschnitten und auf die Petrischalen verteilt. Die Plazentastücke werden durch mehrmaliges Umschwenken im HBSS gewaschen, der Waschvorgang mit frischem HBSS wiederholt.

Nun wird der fetale vom maternalen Anteil getrennt. Dabei zeichnet sich der fetale Plazentaanteil makroskopisch durch eine starke Durchsetzung mit Plazentazotten aus, was die Unterscheidung erleichtert. Die Auftrennung wird mittels Skalpell durchgeführt, fetal und maternal dann gesondert weiterverarbeitet. Man beachte hierbei, dass in dieser Studie die Anzahl an Plazentaprobe N=5 beträgt, durch die Unterteilung in fetal und maternal aber n=10 Zellproben entstehen.

Größere Gefäße werden entfernt und die Gewebeproben ein weiteres Mal in frischem HBSS gewaschen. Jetzt werden die Stücke so fein wie möglich zerkleinert, bis sie mit einer an der Spitze abgebrochenen 10 ml-serologischen Pipette gut aufgenommen werden können. Das Plazenta-HBSS-Gemisch wird in 50 ml-Cellstar-Tubes gegeben und 5 min bei Raumtemperatur und 500 rpm zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand abgesaugt, erneut mit frischem HBSS auf 50 ml aufgefüllt und 5 min bei Raumtemperatur und 700 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und mit Lösung 1 versetzt, 5 min bei Raumtemperatur und 1000 rpm zentrifugiert und schließlich der Überstand entfernt.

Die Tubes sollten nun ca. 20 ml Gewebepaste enthalten, auf welche Verdau-HBSS auf 50 ml aufgefüllt wird.

Der Verdau verläuft 1 Stunde inkubiert im Wasserbad bei 37°C, wobei die Tubes alle 10 min geschwenkt werden. Dem Beenden des Verdau dienen 5 ml FCS pro Tube. Dann wird der Verdauinhalt auf ein feinmaschiges Küchensieb gegeben, um große Gewebestücke abzufangen. Die darunter gesammelte Zellsuspension wird in neue 50 ml-Cellstar-Tubes überführt und 10 bis 15 s bei 400 rpm zentrifugiert um Zellen, die an die inneren Tubewände geraten sind in die Flüssigkeit hinein zu zentrifugieren.

Weitere neue 50 ml-Cellstar-Tubes werden mit je 15 ml Ficoll versetzt und wie beim Protokoll für Knochenmarkszellisolierung mit maximal 30 ml Zellsuspension vorsichtig beladen. Nun folgt eine Phasenauffrennung durch 20 min Zentrifugation bei 20°C und 470 g ohne Bremse. Die erhaltene Interphase wird abgenommen, in neue 50 ml-Cellstar-Tubes gegeben, auf etwas weniger als 50 ml aufgefüllt und 7 min bei 160 g zentrifugiert.

Vier 75cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen werden jeweils für die maternale und fetale Komponente vorbereitet, wobei in jede Flasche 10 ml P-Medium gegeben wird. Von den Tubes werden die Überstände entfernt und die Pellets in P-Medium resuspendiert und schließlich in den Flaschen verteilt. Intakte Zellen adhären nach 24 Stunden gut an der Oberfläche der Zellkulturflaschen, ein voller Mediumwechsel wird mit 10 ml P-Medium pro Flasche durchgeführt.

**2.10: Zellkultur** [49]Zellernährung [49]

Die aus den Geweben gewonnenen und in den Zellkulturflaschen wachsenden Zellen werden alle 3 bis 4 Tage einem vollen Mediumwechsel unterzogen. Hierzu wird das Medium komplett von der Zellkulturflasche entfernt, ohne den Zellrasen mit der Pipettenspitze zu berühren, und 10ml frisches Nährmedium wird hineingegeben.

Passagierung von der Primärkultur (PK) zur 1. Passage (1.P) [49]

Bei 80% Zellkonfluenz in der Zellkulturflasche, was unter dem Mikroskop überprüft wird, folgt die Passagierung der Zellen.

Man entfernt hierzu vollständig das Medium aus der Zellkulturflasche. Mit 5 ml frischem PBS werden die verbliebenen Mediumreste durch leichtes Schwenken aufgenommen und das PBS anschließend wieder entfernt, diese Waschprozedur wird zwei mal durchgeführt.

Über die Zellen werden nun 3 ml Trypsin gegeben und die Flaschen 3 min lang im Inkubator gehalten. Anschließend wird durch relativ kräftiges Klopfen auf der Flasche die Zellablösung begünstigt, die Überprüfung erfolgt unter dem Mikroskop. Die Zellen sind abgelöst, wenn sie ihre typische Spindelzellform verloren haben und in sphärischer Form frei in der Flüssigkeit schwimmen.

Auf die Zellsuspension werden 3 ml des passenden Nährmediums gegeben, der Flascheninhalt folglich komplett in ein 50 ml-Cellstar-Tube überführt. Das Röhrchen wird 7 min bei 10°C und 1500 rpm zentrifugiert, der entstandene Überstand entfernt und das verbliebene Pellet mit 10ml Nährmedium resuspendiert.

Die Auszählung vitaler Zellen erfolgt mittels Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop unter Verwendung von Trypanblau. Dieser saure Farbstoff penetriert durch die Membran toter Zellen, deren Zellmembran erhöhte Permeabilität aufweist, was zu einer tiefblauen Färbung der Zellen führt [50]. Aufgrund seiner Größe ( $M=960,8$  g/mol) gelangt Trypanblau nicht durch die intakte Zellmembran lebender Zellen [50]. Vitale Zellen können also anhand fehlender Blaufärbung identifiziert werden.

In jede neue Zellkulturflasche kommen 10 ml Nährmedium und  $1,5 \times 10^5$  Zellen. In dieser Studie wurden nach Möglichkeit 10 Kulturflaschen 1.P hergestellt.

#### Passagierung von der 1. Passage (1.P) zur 2. Passage (2.P) [49]

Bei 80%iger Zellkonfluenz wird wie beim PK-1.P-Prozedere das Nährmedium komplett entfernt und 2 mal mit 5 ml PBS gewaschen.

Die Zellablösung erfolgt diesmal mit 3 ml Accutase pro Flasche für 5 bis 8 min im Inkubator.

Das Vorgehen bis zum Erhalt des Pellets gleicht dem von PK zu 1.P.

Von da aus wird das Pellet in 10 ml Nährmedium resuspendiert, die Anzahl vitaler Zellen ermittelt und diese folgendermaßen verteilt:

- 3 Zellkulturflaschen mit je  $1,5 \times 10^5$  Zellen für die FACS-Analyse
- Eine 6-well-Platte mit  $5 \times 10^4$  Zellen pro well zur Prüfung der adipogenen und osteogenen Differenzierungsfähigkeit der Zellen
- 3 Zellkulturflaschen mit je  $1,5 \times 10^5$  Zellen für den Anhaftungsversuch
- Die restlichen Zellen werden kryokonserviert

**2.11: Kryokonservierung** [49]

Pro Kryoröhrchen sollen mindestens 1 Million, maximal 3 Millionen Zellen in Form einer 1,5 ml-Zellsuspension erstellt werden. Entsprechend wird die Anzahl benötigter Kryoröhrchen gewählt, die zunächst beschriftet und geschlossen in Eis gelegt werden, um die Materialtemperatur zu senken.

Die Zellsuspension wird im 50 ml-Cellstar-Tube 7 min bei 10°C und 1500 rpm zentrifugiert. Während dieser 7 min wird Einfriermedium (50% Nährmedium, 40% FCS und 10% DMSO) frisch angesetzt und in Eis vorgekühlt. Das Gesamtvolumen an benötigtem Einfriermedium ist abhängig von der Zellzahl zu ermitteln. Das erhaltene Pellet wird nach Entfernen des Überstandes in eiskaltem Einfriermedium resuspendiert. Pro Kryoröhrchen werden 1,5 ml Zellsuspension hineingegeben und diese 1 Stunde bei -20°C und anschließend bei -70°C für maximal 24 Stunden gekühlt.

Schließlich werden die Kryoröhrchen im Stickstofftank gelagert.

**2.12: Auftauen kryokonservierter Zellen** [49]

Um für den Anhaftungsversuch mit Zellen der 2. Passage ausreichend kryokonservierte Zellen zur Verfügung zu haben wurde festgelegt, dass pro Zellkulturflasche nach Möglichkeit 2 Kryoröhrchen eingesetzt werden sollen. Dies soll sicherstellen, dass trotz eventuellem Zelltod durch die Kryokonservierung genügend vitale Zellen vorhanden sind, ohne diese in 3. Passage expandieren zu müssen.

3 Zellkulturflaschen sowie ein 50 ml-Cellstar-Tube werden mit je 10 ml des passenden Nährmediums vorbereitet.

Die benötigten Kryoröhrchen werden dem Stickstofftank entnommen, in eine Kryobox versetzt und unter die Sterilbank gebracht, wo bei eingeschaltetem Abzug der Deckel aller Röhrchen kurz auf- und wieder zugeschraubt wird. Da sich flüssiger Stickstoff bei zunehmender Temperatur schneller dilatiert als das Röhrchenmaterial wird mit dieser Maßnahme eine potentielle Berstungsgefahr und folglich die Kontamination der Zellprobe vermieden. Nach 1 min im -20°C-Tiefkühlschrank werden die Kryoröhrchen ca. 1 min lang im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und der Inhalt, sobald flüssig und entnehmbar, in das vorbereitete 50 ml-Cellstar-Tube gegeben.

7 min lang wird bei 7°C und 1500 rpm zentrifugiert, anschließend der Überstand entfernt, das verbleibende Pellet in 10 ml resuspendiert und die Zellsuspension auf die vorbereiteten Zellkulturflaschen verteilt.

Nach 24 Stunden im Inkubator sind funktionale Zellen von der sphärischen, freischwimmenden in die adhärierende Spindelzellform übergegangen. Nun wird vorsichtig ein kompletter Mediumwechsel durchgeführt.

**2.13: Zelluntersuchung mittels fluorescence activated cell sorting (FACS)**

[49]

Bei 80%iger Zellkonfluenz der pro Zelllinie vorgesehenen 3 FACS-Zellkulturflaschen werden die Zellen 1 Tag vor der Untersuchung auf Mangelmedium gesetzt (Nährmedium entfernen, mit 5 ml PBS waschen und mit 10 ml Mangelmedium versetzen).

Vorbereitung der Antikörper [49]

- 20 µl anti-CD73 (PE) + 30 µl PFEA
- 10 µl anti-CD90 (PE) + 40 µl PFEA
- 10 µl anti-CD105 (FITC) + 40 µl PFEA
- 10 µl anti-CD14 (FITC) + 40 µl PFEA
- 5 µl anti-CD34 (PE) + 45 µl PFEA
- 10 µl anti-CD45 (PE) + 40 µl PFEA

Vorbereitung der Zellen [49]

Das Mangelmedium wird aus den Zellkulturflaschen entfernt und diese mit je 5 ml PBS gewaschen. Dann wird das PBS entfernt und die Zellablösung durch 3 ml Accutase pro Flasche für 5 min im Inkubator bewerkstelligt.

Anschließend werden pro Flasche 3 ml Nährmedium hinzugegeben und die insgesamt 18 ml Zellsuspension in ein 50 ml-Cellstar-Tube überführt. 7 min wird bei 7°C und 1500 rpm zentrifugiert, der entstandene Überstand entfernt und das verbliebene Pellet in PFEA-Puffer resuspendiert.

Der PFEA-Puffer besteht aus 500ml PBS, 10 ml FCS, 372 mg EDTA und 1 ml 10%ige Natrium-Azid-Stammlösung.

Für jede Untersuchungsprobe werden 1,5 ml PFEA-Zellsuspension benötigt, die in 2,0 ml-Safe-Lock Tubes pipettiert werden. Die Tubes werden 4 min lang bei 300 g in der Eppendorf-Zentrifuge 5415C abzentrifugiert. Der Überstand wird entfernt und pro Tube 50 µl Gamunex (Gamunex 1:20 in PBS verdünnt) pipettiert.

Leichtes Vortexen resuspendiert die Zellen, es folgen 20 min Inkubation im Dunkeln bei 4°C.

Danach wird 1 ml PFEA hinzugegeben, gevortext, 4 min bei 300 g abzentrifugiert und der Überstand entfernt.

#### Direkte Färbung [49]

Je eine Untersuchungsprobe wird mit 50 µl von einem der vorbereiteten Antikörper versetzt, wobei auch eine Kontrolle, aus 50 µl PFEA bestehend, mitgeführt wird. Nach Inkubation der Probe mit Antikörper im Dunkeln für 20 min bei 4°C folgt das Waschen der Probe mit 1 ml PFEA, Vortexen, 4 min bei 300 g Abzentrifugieren und Entfernen des Überstandes.

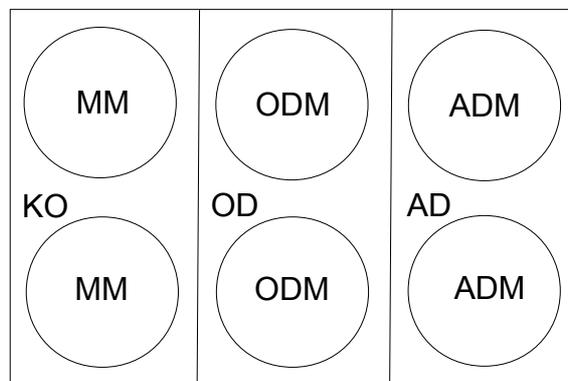
Das Zellpellet wird in 300 µl PFEA resuspendiert und in ein FACS-Röhrchen überführt, welches nun für die Zelluntersuchung am Flow Cytometer BD LSR II benutzt werden kann.

Die Bedienung des Zytometers und die Darstellung der Ergebnisse erfolgte durch Mitarbeiter unserer Arbeitsgruppe, die bereits über jahrelange Expertise verfügten.

**2.14: Adipogene / osteogene Differenzierung [49]**Vorbereitung [49]

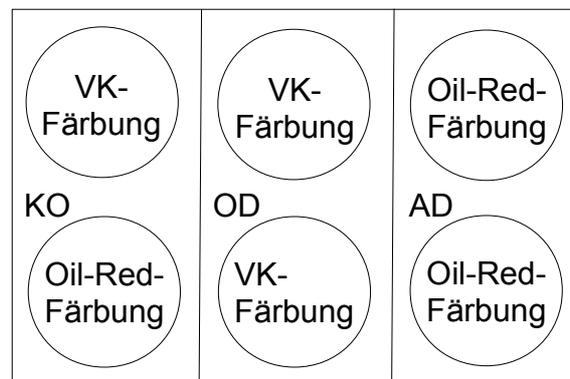
In eine 6-well-Platte werden bei der 2. Passagierung  $0,5 \times 10^5$  Zellen in 2 ml Nährmedium pro well ausgesät und bis zu 80%iger Zellkonfluenz kultiviert.

Ist diese erreicht, wird das Nährmedium komplett entfernt und die wells mit 2 ml PBS gewaschen. Nachdem die Zellen über Nacht in Mangelmedium gehalten wurden wird am folgenden Tag die Differenzierung gestartet.

Differenzierung [49]**Abb.1: Aufteilung der 6-well-Platte für die Differenzierungsuntersuchung**

KO = Spalte für die Kontrollen; OD = Spalte für osteogene Differenzierung; AD = Spalte für adipogene Differenzierung; MM = Mangelmedium; ODM = osteogenes Differenzierungsmedium; ADM = adipogenes Differenzierungsmedium

Alle 6 wells erhalten 4 Wochen lang ein bestimmtes Medium, das alle 3 bis 4 Tage durch Frisches ersetzt wird. Die 2 wells in der Kontrollspalte KO erhalten jeweils 2 ml Mangelmedium. Die wells der OD-Spalte werden mit osteogenem Differenzierungsmedium versetzt, die in der AD-Spalte mit adipogenem Differenzierungsmedium.

Färbungen [49]**Abb.2: Färbungsschema für 6-well-Platten der Differenzierungsuntersuchungen**

VK-Färbung = Von Kossa-Färbung; KO = Spalte für die Kontrollen; OD = Spalte für osteogene Differenzierung; AD = Spalte für adipogene Differenzierung

Nach 4 Wochen Differenzierung wird in den Spalten KO, OD und AD die Von Kossa-Färbung und die Oil-Red-Färbung gemäß obigem Schema durchgeführt.

Von Kossa-Färbung [49]

Das Medium wird aus den wells entfernt und die Zellen mit 1 ml -20°C-Methanol 5 min bei Raumtemperatur fixiert. Danach wird das Methanol entfernt und 2 mal mit 1 ml aqua dest. nachgewaschen. Es folgt die Gabe von 1 ml 5%ige Silbernitratlösung in aqua dest. (0,6g/12ml) pro well und 1 Stunde Inkubation im Dunkeln, anschließend wird die Flüssigkeit aus den wells wieder entfernt und 2 mal mit 1 ml aqua dest. nachgewaschen. 1 ml Natriumcarbonatlösung (5 mg Natriumcarbonat, 25 ml 36%iges Formalin, 75 ml aqua dest.) wird für 2 min je well belassen, dann wieder entfernt und die wells 2 mal mit 1 ml aqua dest. behandelt. Nun werden die wells für 2 min mit 1 ml Natriumthiosulfatlösung (5 g Natriumthiosulfat, 100 ml aqua dest.) versetzt, anschließend entfernt und die wells 2 mal mit 1 ml aqua dest. nachgewaschen. Schließlich sollen für das Fotografieren 1 ml aqua dest. pro well verbleiben. Durch von Kossa-Färbung nachweisbare Mineralablagerungen in der Umgebung der Zellen werden als osteogene Differenzierung gewertet [51]. Dabei färben sich  $\text{Ca}^{2+}$ -Ablagerungen schwarz an [50].

Oil-Red-Färbung [49]

Während der adipogenen Differenzierung werden intrazelluläre Lipidvakuolen angereichert, die sich mit Oil Red O anfärben lassen [52].

Oil-Red-Stammlösung (0,5 g Oil Red O + 100 ml Isopropanol) wird mit aqua dest. im Verhältnis 3:2 gemischt und nach 24 Stunden zu fertiger Färbelösung filtriert.

Das Medium wird aus den wells entfernt und diese mit 1 ml Oil-Red-Färbelösung für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die Flüssigkeit entfernt, 3 mal mit PBS gewaschen und schließlich 1 ml PBS für das Fotografieren belassen.

Bildgebung [49]

Die Aufnahmen wurden mit dem Fotoapparat PowerShot S45 erstellt, dieser war im Mikroskop Leica Mikroskop DM IL LED eingebracht. Am Mikroskop wurde das 10x-Objektiv und über das Programm Remote Capture zusätzlich ein 3x-Zoom eingestellt.

Der Abbildungsmaßstab wird mittels Neubauer Zählkammer festgelegt.

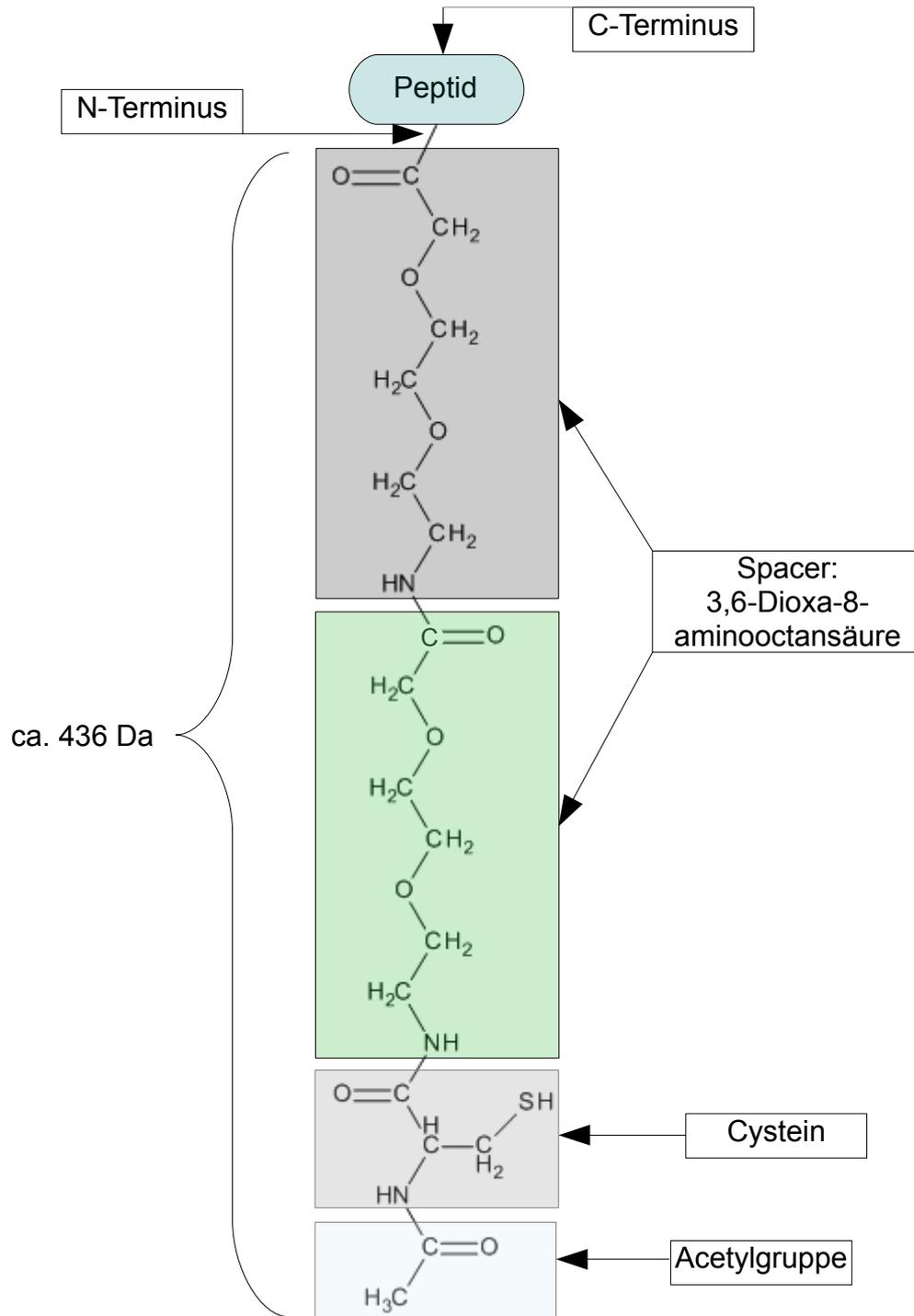
**2.15: Konjugation modifizierter Peptide (MP) mit aktiviertem bovinem Serumalbumin (aBSA) [49]**

Die bei Intavis Bioanalytical Instruments Aktiengesellschaft synthetisierten modifizierten Peptide wurden in Pulverform geliefert. Wasserlösliche MPs (Peptidcodierung 2; 7; 13; 15; 16; 17; siehe auch Tabelle 6) wurden so in aqua dest. aufgelöst, dass sich eine MP-Konzentration von 5 mg/ml ergab. Dagegen wurden die wasserunlöslichen MP 4 und 14 stufenweise erst in DMSO zu einer Konzentration von 25 mg/ml und dann in aqua dest. zur finalen Endkonzentration von 5 mg/ml gemischt.

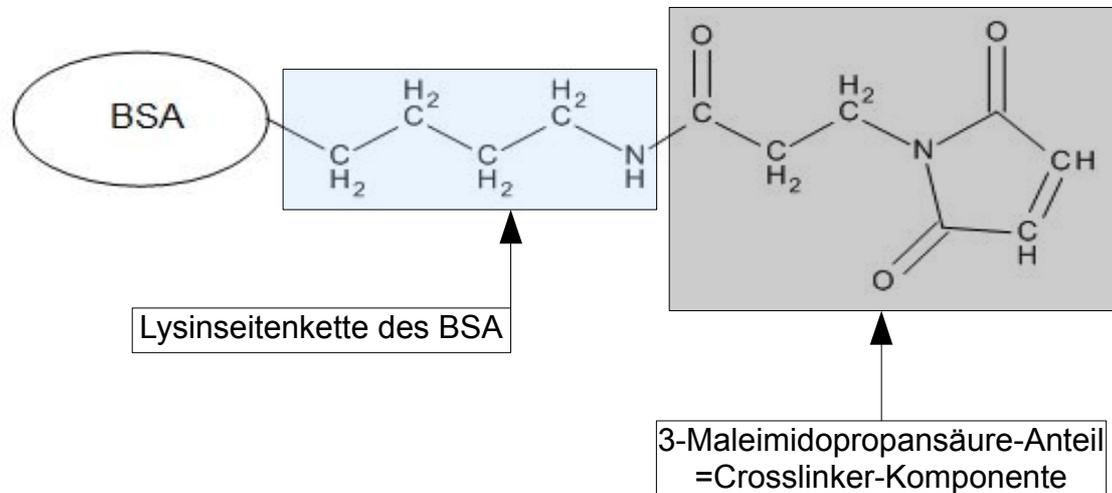
Neben den MPs wurde auch aBSA20 (20 mg aBSA pro ml Konjugationspuffer) benötigt.

Für die Erstellung eines Konjugates werden 10 µl aBSA20 mit 35 µl des jeweiligen MP der Konzentration 5 mg/ml versetzt. Außerdem wird eine Negativkontrolle mitgeführt, die aus 10 µl aBSA20 und 35 µl DMSO besteht.

Die Konjugate werden insgesamt 4 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und stündlich vorsichtig gevortext, wobei darauf zu achten ist, dass die geringe Flüssigkeitsmenge am Boden der Gefäße zusammenbleibt und nicht an deren Wänden dispergiert.



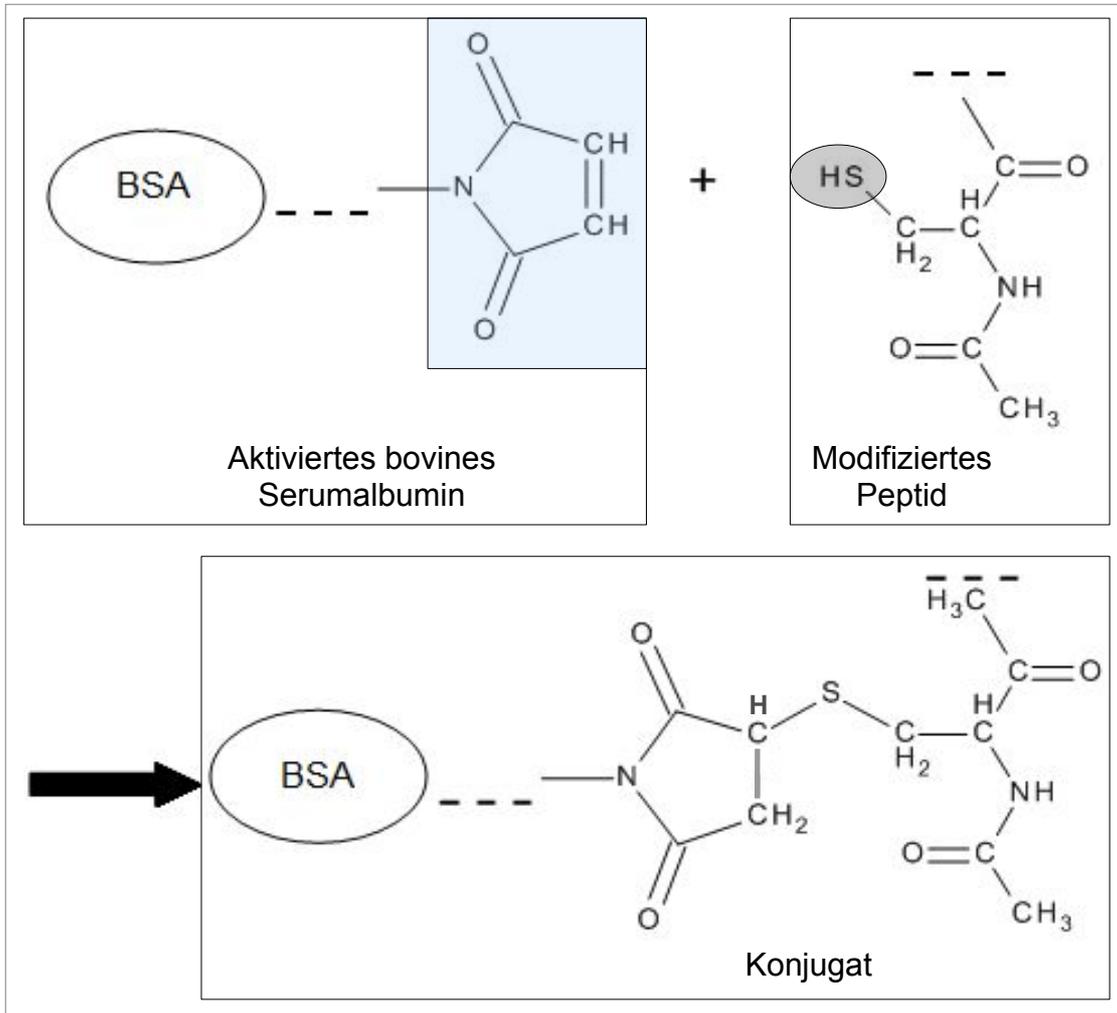
**Abb.3: Exemplarische molekulare Darstellung eines modifizierten Peptids**  
 Kenntnis der molekularen Struktur durch die Lieferscheine von Intavis Bioanalytical Instruments Aktiengesellschaft.  
 Graphische Darstellung erstellt durch Nutzung der Software Accelrys Draw 4.0 von Accelrys Software Inc..



**Abb.4: Molekulare Darstellung des mit Crosslinker versehenen aktivierten bovines Serumalbumins (aBSA)**

Kenntnis der molekularen Struktur durch [53, 54]. Graphische Darstellung erstellt durch Nutzung der Software Accelrys Draw 4.0 von Accelrys Software Inc..

Das BSA-Molekül wird durch 17 Disulfidbindungen stabilisiert, die durch 34 seiner Cysteine gebildet werden [54]. Das 35.igste, reaktive und letzte Cystein wird bei der Herstellung von aBSA geblockt [54].



**Abb.5: Darstellung der Konjugation von modifiziertem Peptid mit aktiviertem bovines Serumalbumin gemäß Michael-Addition [54]**

Graphische Darstellung erstellt durch Nutzung der Software Accelrys Draw 4.0 von Accelrys Software Inc..

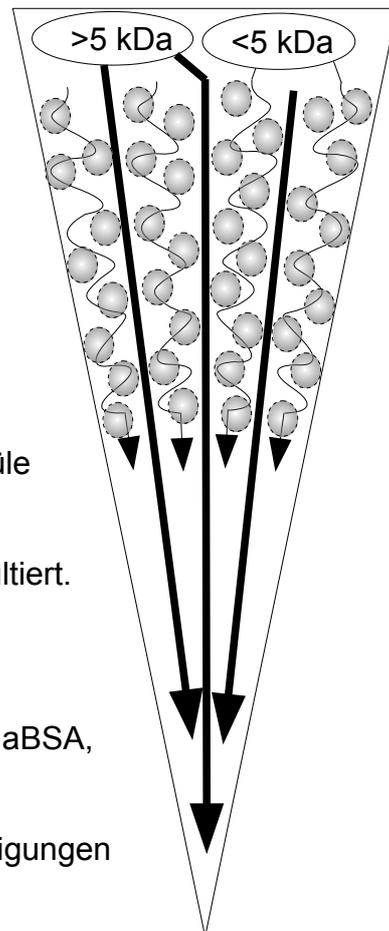
**2.16: Centriscin-Aufreinigung der Konjugate [49]**

Gemäß Gebrauchsanweisung für Centriscin-10 Columns von Princeton Separations INC. wurden diese spezifisch für die Aufreinigung von Proteinkonjugaten entwickelt.

Prinzip der Centriscin-Aufreinigung [54]

**Abb.6: Funktionelle Darstellung einer Centriscinsäule:**

Das Gel in der Centriscinsäule besteht aus porösen Gelkörnchen, durch welche Moleküle bis zu 5 kDa durchtreten können. Größere Moleküle verfangen sich nicht im Inneren der Gelkörnchen und haben folglich eine kürzere Gesamtstrecke vom oberen bis zum unteren Ende der Säule. Dagegen bewegen sich kleinere Moleküle zusätzlich durch die innere Gelkörnchenstruktur, was in einer deutlich längeren Gesamtstrecke resultiert. Es ist also möglich, durch abgestimmte Zentrifugationszeiten höhermolekulare Stoffe, in diesem Fall die Konjugate sowie unkonjugiertes aBSA, von niedermolekularen Stoffen wie unkonjugierte modifizierte Peptide, Salze und anderen Verunreinigungen aufzutrennen.



Anwendung [49]

Das Gelpulver in den Centriscpins wird nach unten geklopft und nach Abnahme des oberen Säulendeckels 650 µl PBS hineingegeben. Anschließend wird die Säule mit dem Deckel wieder verschlossen und 5 s lang kräftig gevortext. Nach 30 min Wartezeit nutzt man das Ultraschallbad, um jegliche Luftblasen aus dem PBS-Gel zu entfernen. Nach einer weiteren halben Stunde wird zunächst der obere und dann der untere Säulendeckel entfernt, die Säule selbst in das mitgelieferte Waschröhrchen plziert. Bei allen folgenden Zentrifugationen ist darauf zu achten, dass die Centriscpins stets so positioniert werden wie bei der ersten Zentrifugation. Zunächst wird in der Eppendorf-Zentrifuge 5424 2 min lang bei 3000 rpm abzentrifugiert. Die Säule wird nun aus dem Waschröhrchen herausgenommen und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß gesetzt, während das Waschröhrchen verworfen wird.

Nun werden 45 µl Konjugat auf die Mitte des Gelbettes gegeben, wobei die Pipettenspitze nichts berühren darf. Die zweite Zentrifugation erfolgt 2 min bei 3000 rpm.

Das gereinigte Konjugat befindet sich nun im 1,5 ml-Reaktionsgefäß und wird für die photometrische Konzentrationsmessung sowie für die Bestätigung einer stattgefundenen Konjugation mittels Lithiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (LDS-PAGE) verwendet. Ist der Konjugationsbefund positiv und die gemessene Konzentration des jeweiligen Konjugates > 2mg/ml, so wird die Konjugatprobe für Anhaftungsversuche eingesetzt.

**2.17: Photometrische Konzentrationsbestimmung der gereinigten****Konjugate** [49]

Für die photometrische Konzentrationsbestimmung wird das BIORAD DC Protein Assay Kit II mit mitgeliefertem BSA Standard verwendet.

Prinzip [55]

Das Assay basiert auf der Reaktion von Protein mit einer alkalischen Kupferartratlösung (Reagenz A) und Folinreagenz (Reagenz B).

Im ersten Schritt reagiert Protein mit Kupfer in alkalischer Lösung, im zweiten Schritt reduziert das kupferbehandelte Protein das Folinreagenz durch Verlust von 1 bis 3 Sauerstoffatomen, sodass verschiedene reduzierte Versionen entstehen, die eine charakteristische blaue Farbe aufweisen mit Absorptionsspektrum zwischen 405 und 750 nm.

Durchführung [49]

Zur Erstellung einer Standardkurve wird zunächst BSA Standard mit Ampuwa-Wasser auf 2,94 mg/ml verdünnt, was "Standard 1" entspricht. Dieses wird durch Konjugationspuffer folgendermaßen weiter verdünnt:

- Standard 1: 2,94 mg/ml
- Standard 2: 1,47 mg/ml
- Standard 3: 0,735 mg/ml
- Standard 4: 0,3675 mg/ml
- Standard 5: 0,18375 mg/ml

Für die Konzentrationsbestimmung müssen vom gereinigten Konjugat insgesamt 7,5 µl als Probe geopfert werden. Auch von der Negativkontrolle (diese wurde bei der Konjugation aus 10 µl aBSA20 und 35 µl DMSO hergestellt) werden 7,5 µl benutzt.

Jede 7,5 µl-Probe wird in einer 96-well-Rundbodenplatte mit 15 µl Konjugationspuffer vorverdünnt.

In einer 96-well-Flachbodenplatte werden für jede Probe drei wells zwecks Dreifachmessung benutzt.

Für den Leerwert z.B. werden in drei wells jeweils 5 µl Konjugationspuffer pipettiert. Auch von Standard 1 bis 5, von jeder Konjugatprobe und der Negativkontrolle werden in Dreifachmessung 5 µl pro well pipettiert.

Auf alle zu untersuchenden wells kommen nun 25 µl Reagenz A' (98% Reagenz A + 2% Reagenz S) sowie 200 µl Reagenz B. Sehr leichtes schwenken sorgt für Durchmischung. Nach 15 min erfolgt am Photometer BioTek El 800 die Messung bei 650 nm Wellenlänge.

**2.18: Überprüfung der Konjugationen mittels****Lithiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (LDS-PAGE) [49]**

Für die Gelelektrophorese wurde das NuPAGE<sup>R</sup>-Gelelektrophoresesystem von Invitrogen verwendet.

Vom gereinigten Konjugat wird mittels der photometrisch bestimmten Konzentrationen das Volumen berechnet, welches 3 µg enthält. Dieses Volumen wird entnommen und als Probe verwendet. Gleiches wird für die Proben BSA und aBSA vorgenommen.

Nun wird auf jede 3 µg-Probe 4,5 µl "LDS Sample Buffer 4x" gegeben, gefolgt von "1,8 µl Reducing Agent 10x". Jede Probe wird mit aqua dest. auf insgesamt 18 µl aufgefüllt und anschließend 10 min bei 70°C erhitzt.

In die innere Kammer der Gelelektrophoresekammer "Xcell Sure Lock", in welcher dann auch das "NuPAGE 4-12% Bis-Tris-Gel, 1.0 mm x 15 well" mit den Proben sein wird, kommt das Gemisch aus 200 ml "NuPAGE MOPS SDS Running Buffer 20x" und 50 µl 0,025% NuPAGE Antioxidantreagenz.

800 ml "NuPAGE MOPS SDS Running Buffer 20x" werden in die äußere Kammer gegeben.

5 µl Gelmarker SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard 1x werden in eine der Geltaschen des Bis-Tris-Gels, auf die anderen Geltaschen 12 µl Probe (entspricht 2 µg) von BSA, aBSA und der Konjugate pipettiert.

Die Gelelektrophorese wurde am „Low voltage power supply for electrophoresis: Biometra Standard Power Pack P25“ bei 100 V für ca. 1,5 Stunden durchgeführt.

Coomassie-Färbung [49]

Die fertige LDS-PAGE wird zunächst mit Färbelösung versetzt, die aus 0,2% Brilliant Blau R250, 50% Methanol, 10% Essigsäure und 39,8% aqua dest. besteht. Nach 30 min auf dem Orbitalschüttler wird die Färbelösung wieder entfernt und Entfärber 1-Lösung (50% Ethanol, 10% Essigsäure und 40% aqua dest.) mit einer Einwirkzeit von 10 min auf dem Orbitalschüttler eingesetzt. Anschließend wird Entfärber 1 wieder entfernt und die LDS-PAGE in Entfärber 2-Lösung (10% Ethanol, 5% Essigsäure und 85% aqua dest.) über Nacht auf dem Orbitalschüttler belassen.

### 2.19: Modifikation der Herstellung des MP4-Konjugates

Die photometrische Messung des konjugierten modifizierten Peptids 4 ergab Konzentrationen  $< 1$  mg/ml und lag somit weit unter den gemessenen Konzentrationen anderer Peptide. Bereits bei der Konjugation fiel auf, dass das MP4-Konjugat als Einziges sehr zähflüssig wurde, während Konjugate anderer Peptide deutlich flüssiger blieben. Die Wiederholung der Konjugation mit einer neuen MP4-Charge lieferte das gleiche Ergebnis.

Die Vermutung lag nahe, dass die zu starke Beladung der aBSA-Moleküle mit MP4 für die Viskosität verantwortlich sei, was die Centriscins verstopfe und die Gewinnung gereinigten Konjugates verhindere. Der Lösungsansatz bestand darin, durch Herabsetzen der Beladung von aBSA mit MP4 die Viskosität des Konjugates zu senken. Hierzu wurde das Verhältnis von MP4/aBSA bei verschiedenen aBSA-Konzentrationen mit nachfolgender Konjugation, Centriscin-Aufreinigung und photometrischer Konzentrationsmessung getestet, um eine akzeptable Konjugatkonzentration  $> 2$  mg/ml zu erhalten. War diese Bedingung erfüllt, wurde eine LDS-PAGE durchgeführt.

#### Überprüfung verschiedener aBSA-Konzentrationen

MP4-Konjugate wurden bei verschiedenen aBSA-Konzentrationen hergestellt und nach Centriscinreinigung photometrisch gemessen. Zum Beispiel ergab der Einsatz einer aBSA-Konzentration von 50 mg/ml eine MP4-Konjugatkonzentration von 3,96 mg/ml, der Einsatz von aBSA der Konzentration 30 mg/ml eine MP4-Konjugatkonzentration von 2,26 mg/ml. Weitere Konjugationen mit aBSA (30 mg/ml) ergaben stets ähnliche MP4-Konjugatkonzentrationen.

Die aBSA-Konzentration 30 mg/ml wurde für die Herstellung des MP4-Konjugates als geeignet eingestuft, da sie eine Konjugatkonzentration  $> 2$  mg/ml generiert und diese aBSA-Konzentration am wenigsten von der ursprünglichen 20 mg/ml-Konzentration differiert. Fortan wurde ausschließlich bei der MP4-Konjugation aBSA der Konzentration 30 mg/ml eingesetzt.

**2.20: Gleichsetzung der Konjugatmassen für die Anhaftungsversuche**

Sowohl die Konjugatanzahl als auch die Anzahl an Peptiden pro Konjugat in den gemessenen Konzentrationen sind unbekannt. Um so gut wie möglich Vergleichbarkeit zu erzielen einigte man sich darauf, von jeder Konjugatprobe die gleiche Konjugatmasse pro Anhaftungsversuch zu benutzen:

Die hergestellten Konjugate wurden bereits mittels Centriscin gereinigt und anschließend photometrisch gemessen. Exemplarisch soll hier eine der Messreihen dargestellt werden, um die weiteren Überlegungen zu erläutern.

**Tabelle 8: Konjugate mit zugehöriger gemessener Konzentration**

Konjugat von	Photometrisch gemessene Konzentration ( $\approx$ mg/ml)
P2	4,47
P4	2,26 (Minimum)
P7	3,65
P13	6,654 (Maximum)
P14	5,01
P15	4,58
P16	3,55
P17	4,21

Von der höchsten Konzentration (Konjugat 13) ausgehend legte man sich darauf fest, von dieser Konjugatprobe 0,5  $\mu$ l pro Anhaftungsversuch einzusetzen. Dies entspricht einem Konjugatgewicht von ca. 3,327  $\mu$ g.

Für die Volumenentnahme von allen Konjugatproben gilt nun:

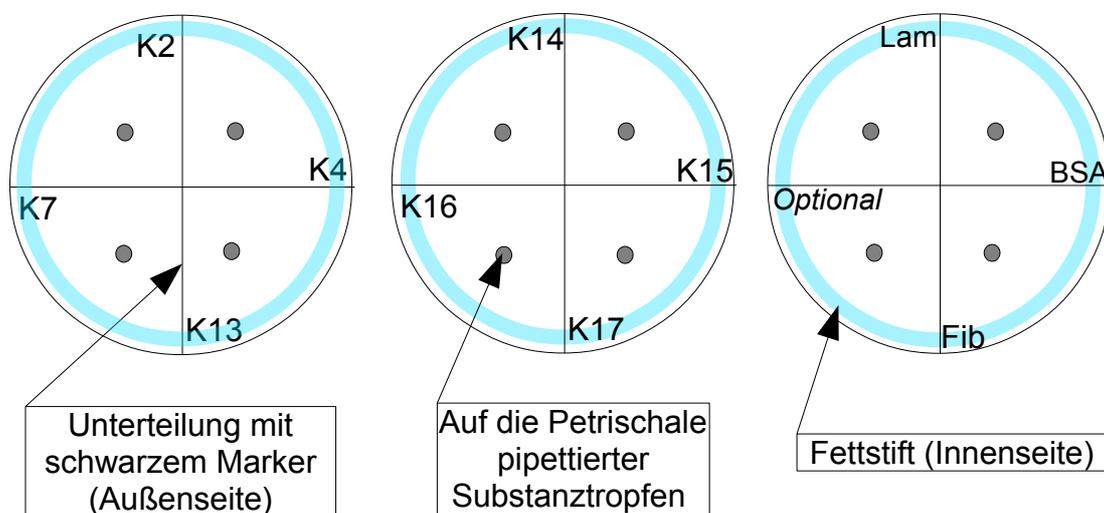
$$Volumen(ml) = \frac{0,003327 \text{ mg}}{\text{Photometrisch gemessene Konzentration}(mg/ml)}$$

**2.21: Anhaftungsversuche [49]**

Bei 80%iger Zellkonfluenz wird am Tag vor dem Anhaftungsversuch das Kulturmedium aus den 3 Zellkulturflaschen entfernt und mit je 5 ml PBS gewaschen. Nach Entfernen des PBS werden die Zellkulturflaschen mit jeweils 10 ml Mangelmedium bis zum nächsten Tag im Inkubator belassen.

Vorbereitung der Cellstar-35 x 10 mm-Petrischalen [49]

Auf der Außenseite der Petrischale wird auf dem Rand des Bodens ein Kreis mit schwarzem Filzstift gezeichnet. Zwei Linien teilen den Boden in 4 Quadranten ein. Jeder Quadrant wird entsprechend der untersuchten Substanz gekennzeichnet. Auf der Bodeninnenseite wird mit einem Fettstift (z.B. Dako Pen) am Rand ein Kreis eingezeichnet. Pro Quadrant wird die benötigte Substanzmenge vorsichtig pipettiert, ohne mit der Pipettenspitze die Petrischalenoberfläche zu berühren.



**Abb.7: Schematische Darstellung der Vorbereitung der Cellstar-35 x 10mm-Petrischalen**

K "Zahl"=Konjugat mit entsprechender Peptidcodierung; Lam=Positivkontrolle Laminin; Fib=Positivkontrolle Fibronectin; BSA=Negativkontrolle (1 µl 1%iges BSA/PBS-Gemisch); Optional=Quadrant für beliebige Substanzuntersuchung, wurde in dieser Studie freigelassen.

1 µl Laminin 2020-1MG und 1 µl Fibronectin müssen stets als Positivkontrolle angewendet werden, sowie "BSA" (=1 µl des 1%igen BSA/PBS-Gemisches) als Negativkontrolle. Der Quadrant „Optional“ wird freigelassen oder eventuell für andere Substanzen verwendet.

Die aufgetragenen Tropfen werden bis zur Austrocknung stehen gelassen.

Die Oberfläche der Polystyrolpetrischalen wurde bei ihrer Herstellung durch Carboxy- und Hydroxygruppen hydrophilisiert, was hydrophilen Molekülen wie BSA das Andocken ermöglicht [56].

Nun werden die Petrischalen mit 200 µl 1% BSA-PBS-Gemisch versetzt, welches alle Quadranten der Petrischale überdecken soll, ohne über den Fettstiftkreis hinauszutreten. Durch das 1%ige BSA werden unspezifische Bindungen auf der polarisierten Petrischalenoberfläche abgeblockt. Die so vorbereiteten Petrischalen werden bis zur weiteren Verwendung im Inkubator belassen, sodass die Materialien eine für Zellen günstige Temperatur annehmen.

#### Vorbereitung der Zellen [49]

Das Mangelmedium wird aus der Zellkulturflasche entfernt und diese mit 5 ml PBS gewaschen. Nach Entfernen des PBS werden die Zellen mit 3 ml Accutase versetzt und die Zellkulturflaschen 5 min lang im Inkubator gehalten. Anschließend vergewissert man sich mittels Mikroskop, dass die Zellen abgelöst sind. Dabei sieht man, dass die Zellen nicht mehr haften und in der Flüssigkeit schwimmen, wobei sie von einer spindelzellförmigen in eine sphärische Form übergegangen sind.

Nun werden 3 ml Kulturmedium in die Zellkulturflasche gegeben und nach leichtem Mischen die insgesamt 6 ml Flüssigkeit pro Flasche in ein 50 ml-Cellstar-Tube überführt.

Da für jeden Versuch drei Zellkulturflaschen benutzt werden befinden sich insgesamt 18 ml Zellsuspension in einem Tube.

10 ml DMEM LG werden diesem hinzugegeben, um dann 7 min bei 7°C und 1500 rpm mit Beschleunigung/Bremse 5/5 zentrifugiert zu werden.

Während der Zentrifugation wird Spezial-DMEM angesetzt, welches das Überleben der Zellen während des Anhaftungsversuches sicherstellen soll.

**Tabelle 9: Zusammensetzung von Spezial-DMEM mit Volumenangaben für eine Petrischale**

DMEM LG	1% BSA/PBS	1%iger Ionen-Mix
200 µl	20 µl	2 µl

Nach der Zentrifugation wird der Überstand aus dem Tube entfernt und das Zellpellet in ausreichender Menge Spezial-DMEM aufgelöst (Anzahl der Petrischalen x 222 µl).

#### Anhaftung der Zellen an die Konjugate [49]

Die komplette Flüssigkeit wird aus den Petrischalen entfernt und diese dann mit 200 µl PBS nachgewaschen. Nach Entfernen des PBS werden 200 µl Spezial-DMEM-Zellsuspension appliziert. Mit der Hand werden die Petrischalen vorsichtig in alle Richtungen geneigt, bis die Zellsuspension die komplette Fläche innerhalb des Fettstiftkreises benetzt hat. Schließlich werden die Petrischalen 15 bis maximal 20 min im Inkubator belassen.

Standardisierte Aufbereitung

Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu ermöglichen wurde die folgende Aufbereitung des Anhaftungsversuches standardisiert. Wichtig ist, die Zellen auf den Spots so wenig wie möglich der Außenluft auszusetzen, um eine Austrocknung zu vermeiden.

Eine 100-1000 µl-Mikropipette wird auf 300 µl eingestellt und damit der Inhalt der Petrischale komplett entfernt.

Waschgang:

300 µl PBS werden in die Petrischale gegeben. Innerhalb des Fettstiftkreises wird das PBS in der Nähe von diesem einmal im Kreis rauf und runter pipettiert. Die Pipettenspitze darf niemals direkt auf dem Fettstiftkreis oder in der Nähe der Substanzpunkte pipettieren. Anschließend wird entlang der zwei Linien pipettiert, die die Quadranten unterteilen. Das komplette PBS wird entfernt und mit frischen 300 µl PBS ein neuer Waschgang begonnen.

Der relativ starke Druck, dem die Zellen ausgesetzt werden garantiert positive Ergebnisse bei tatsächlich widerstandsfähiger Integrin-Konjugat-Interaktion, während die Wahrscheinlichkeit von falsch-positiven Zufallsbefunden bzw. nur schwachen Integrin-Konjugat-Interaktionen gesenkt wird.

Insgesamt werden 5 Waschgänge durchgeführt. Am Ende werden 300 µl neues PBS in der Petrischale belassen, um eine Zellaustrocknung zu vermeiden.

Bildgebung [49]

Die Aufnahmen wurden mit dem Fotoapparat Nikon CoolPix E 4500 mit folgenden Einstellungen aufgenommen:

Bildqualität=fine; Voreinstellung "Berg"; 3 fach-Zoom

Dabei war der Fotoapparat im Mikroskop Axiovert 135 eingebracht, wobei das 2,5-Objektiv zum Einsatz kam.

Kurz vor dem Fotografieren wurde die komplette Flüssigkeit aus der Petrischale entfernt um Lichtbrechungen zu vermeiden, die eine Aufnahme unmöglich gemacht hätten. Jeder Zell-Substanz-Punkt wurde einzeln fotografiert.

### **2.22: Peptiduntersuchung basierend auf der Hydropathie jeder einzelnen Aminosäure [57]**

Um weitere Eigenschaften der Peptide in Erfahrung zu bringen wird jede einzelne Aminosäure mittels Hydropathie-Index mit einem Zahlenwert verschlüsselt, welcher ein relatives Maß für die Lipo- bzw. Hydrophilität der entsprechenden Aminosäure darstellt. Anschließend werden die so verschlüsselten Peptide graphisch dargestellt.

Viele Integrine binden das Motiv RGD [58]. RGDS ist eine allgemeine Anhaftungssequenz, die in vielen EZM-Molekülen wie Fibronectin, Laminin und Osteopontin vorkommt [51]. In Abwesenheit stimulierender Faktoren aktiviert der RGDS-Ligand in hMSCs aus Knochenmark die integrinvermittelte, für osteogene Differenzierung vorgesehene Signalgebung [51].

Im Rahmen der Hydropathie-Analyse wird die Sequenz RGDS mit in die Untersuchung aufgenommen.

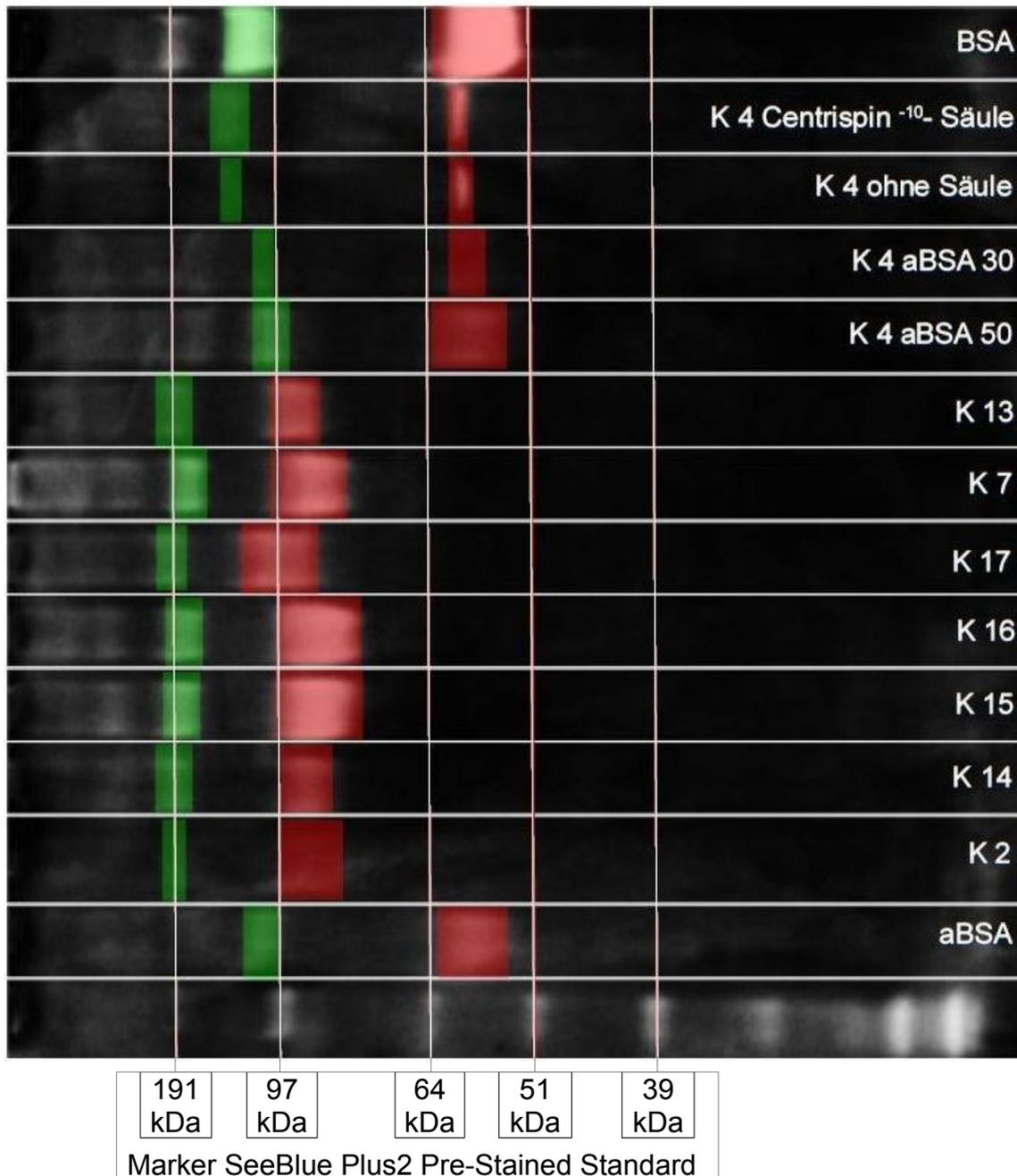
**Kapitel 3: Ergebnisse****3.1: Photometrische Messung der Konjugatkonzentrationen****Tabelle 10: Mittlere Konzentrationsangaben der Konjugate**

Die jeweiligen Standardfehler des Mittelwertes stehen in Klammern.

Konjugat	Anzahl der hergestellten Konjugatchargen	Konzentrationsmittelwert (ca. in mg/ml) der Konjugatchargen
2	2	4,26 (±0,21)
4	10	2,47 (±0,07)
7	2	4,14 (±0,5)
13	2	6,26 (±0,4)
14	2	4,69 (±0,32)
15	2	4,27 (±0,32)
16	2	3,54 (±0,01)
17	2	3,99 (±0,21)

Der Standardfehler des Mittelwertes SM wurde folgendermaßen berechnet [59]:

$$SM = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n \cdot (n-1)}} \quad x_i = \text{Einzelwerte}; \bar{x} = \text{Mittelwert}$$

**3.2: Auswertung einer exemplarischen LDS-PAGE****Abb.8: Auswertung einer exemplarischen LDS-PAGE**

aBSA = aktiviertes bovines Serumalbumin; K "Zahl" = Konjugat mit entsprechender Peptidcodierung; K 4 aBSA 50 = mit aBSA (50 mg/ml) konjugiertes modifiziertes Protein 4; K 4 aBSA 30 = mit aBSA (30 mg/ml) konjugiertes modifiziertes Protein 4; K 4 ohne Säule = Konjugat 4, das keiner Centrispinaufreinigung unterzogen wurde; K 4 Centrispin<sup>-10</sup>-Säule = Konjugat 4, mit standardmäßig eingesetztem Centrispin aufgereinigt; BSA = bovines Serumalbumin; Hellrote Markierungen = am weitesten gelaufenen Banden, gefolgt von hellgrün markierten Banden.

Die Konjugate 2, 7, 13, 14, 15, 16 und 17 weisen in ähnlichen Abständen von ihrer am weitesten gelaufenen, in der Nähe der 97 kDa-Markierung befindlichen, hellrot markierten Bande darauf folgende, hellgrüne Banden im Bereich der 191 kDa-Markierung auf. Analog dazu haben die Proben BSA, BSA, "K4 Centriscin<sup>-10</sup>-Säule", "K4 ohne Säule", "K4 aBSA 30" und "K4 aBSA 50" eine rote Bande im Bereich zwischen 51 und 64 kDa und eine grüne Bande in der Nähe der 97 kDa-Markierung.

**3.3: Merkmale der Zellproben von der 2. Passage bis zum Anhaftungsversuch**

**Tabelle 11: Während der Zellkultur ermittelte Charakteristika im Zeitraum 2.Passage bis Anhaftungsversuch**

$T_m$ =Mittlere Dauer bis zur 80%igen Zellkonfluenz;  $V_m$ =Mittelwert der stattgefundenen Zellzahlverdopplungen;  $VZ_m$ =Mittlere Verdopplungszeit; Standardfehler des Mittelwertes stehen in Klammern.

		Knochenmark (n=8)	Plazenta (n=10)
2. Passage bis Anhaftungs- versuch	$T_m$ in Tagen	9,88 (± 1,27)	8 (± 0,11)
	$V_m$	2,55 (± 0,29)	3,21 (± 0,22)
	$VZ_m$ in Tagen	4,79 (± 1,45)	2,57 (± 0,16)
	Mittlere Zellausbeute	$9,98 \times 10^5$ (± $1,87 \times 10^5$ )	$15,39 \times 10^5$ (± $2,38 \times 10^5$ )

Die Anzahl der Verdopplungen  $V$  wurde folgendermaßen berechnet [60]:

$$V = \frac{{}_{10}\log E - {}_{10}\log A}{{}_{10}\log 2}$$

$E$  ist die geerntete Zellzahl bei 80%iger Zellkonfluenz in den Zellkulturflaschen,  $A$  die in den Kulturflaschen zu Beginn der 2. Passage ausgesäte Zellzahl.

Aus den einzelnen  $V$ -Werten wurden die entsprechenden Mittelwerte  $V_m$  gebildet.

Zur Berechnung von  $VZ$  werden die einzelnen Zeiträume  $T$  der jeweiligen Proben durch die entsprechenden  $V$ -Werte dividiert. Aus den so erhaltenen  $VZ$  wird  $VZ_m$  für die entsprechende Zelllinie gebildet.

Der Tabelle 11 ist zu entnehmen, dass im Zeitraum der 2. Passage bis zum Anhaftungsversuch Zellen aus Plazentagewebe eine schnellere Proliferation und eine größere Zellausbeute bei der Ernte als Knochenmarkszellen aufweisen.

### 3.4: Proliferationsmessungen in vitro

**Tabelle 12: Vergleich verschiedener Zellkulturabschnitte auf  $T_m$**

$T_m$ =Mittlere Dauer bis zur 80%igen Zellkonfluenz

	Knochenmark (n=8)	Plazenta (n=10)
1.Passage-2.Passage: $T_m$ in Tagen	7,98 ( $\pm$ 0,55)	7 ( $\pm$ 0,11)
2.Passage- Anhaftungsversuch: $T_m$ in Tagen	9,88 ( $\pm$ 1,27)	8 ( $\pm$ 0,11)

In beiden Zellkulturabschnitten ist die Zellproliferation plazentarere Zellen schneller als die von Knochenmarkszellen.

### 3.5: FACS-Analyse

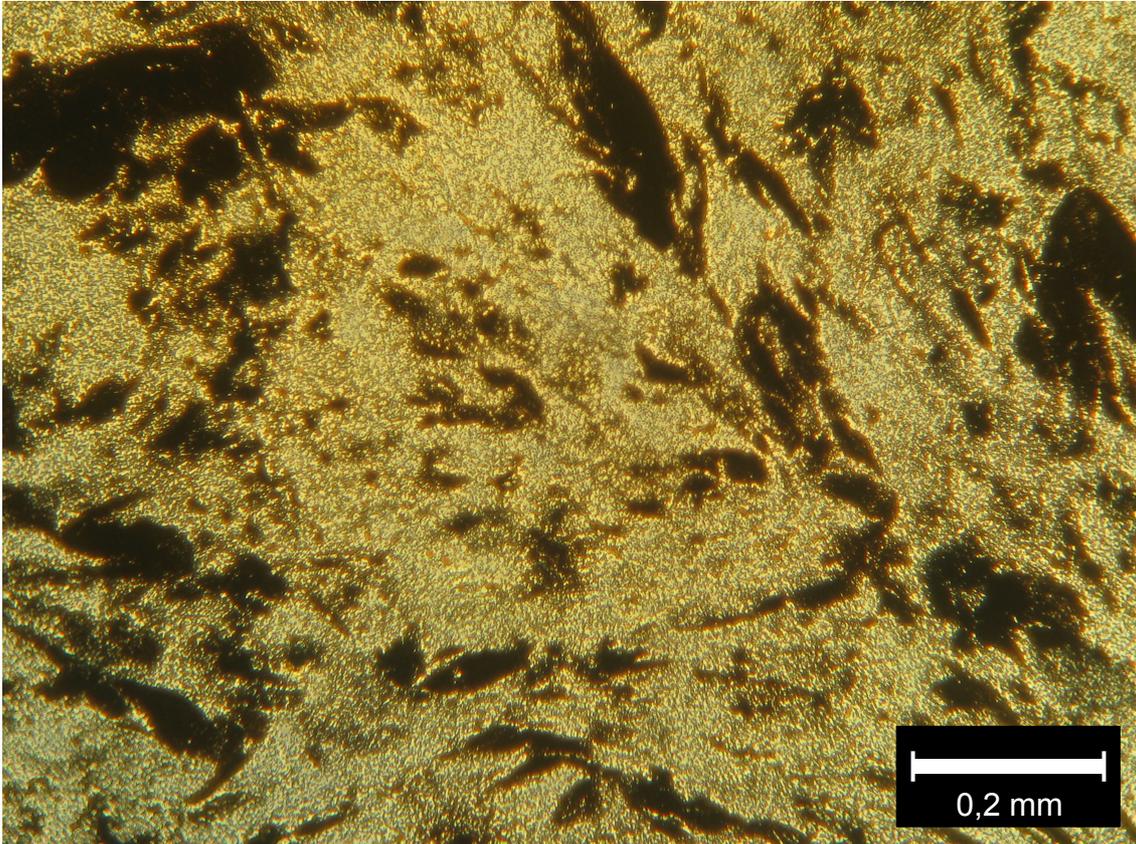
**Tabelle 13: Zusammenfassung der FACS-Analysen aller Proben**

CD=Cluster of differentiation

Probe	CD14	CD34	CD45	CD 73	CD90	CD105
<b>Plazenta</b>	negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	positiv
<b>Knochenmark</b>	negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	positiv

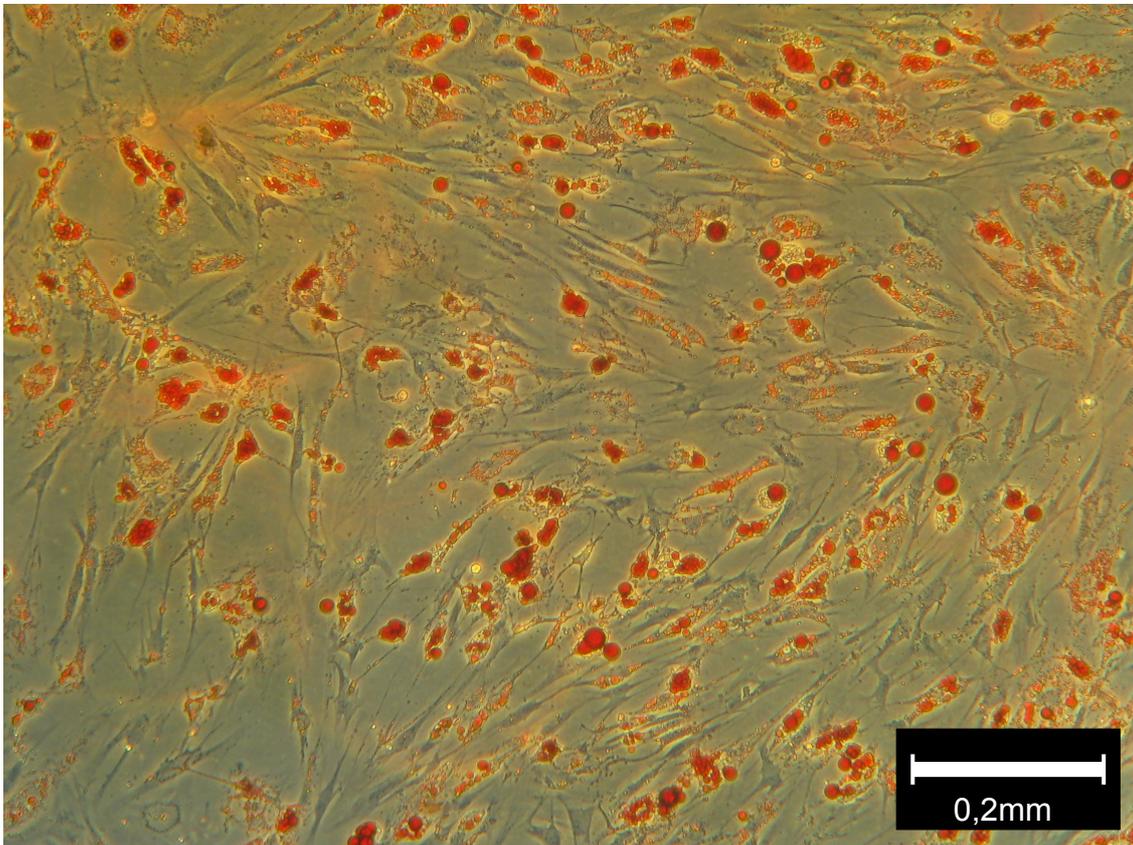
In Bezug auf die Expression der überprüften Oberflächenproteine besteht kein Unterschied zwischen Plazenta- und Knochenmarkszellen.

**3.6: Exemplarische Darstellung osteogener Differenzierung mittels  
von Kossa-Färbung anhand von Knochenmarkszellen**



**Abb.9: Von Kossa-gefärbte Knochenmarkszellen der 2. Passage nach einmonatiger Behandlung mit osteogenem Differenzierungsmedium**  
Charakteristische Schwarzfärbung perizellulärer Areale, welche auf osteogene Differenzierung hinweisen [50, 51]. Neben den schwarzgefärbten Arealen bestehen weiträumige nicht gefärbte Flächen.

**3.7: Exemplarische Darstellung adipogener Differenzierung mittels Oil-Red-Färbung anhand von Knochenmarkszellen**



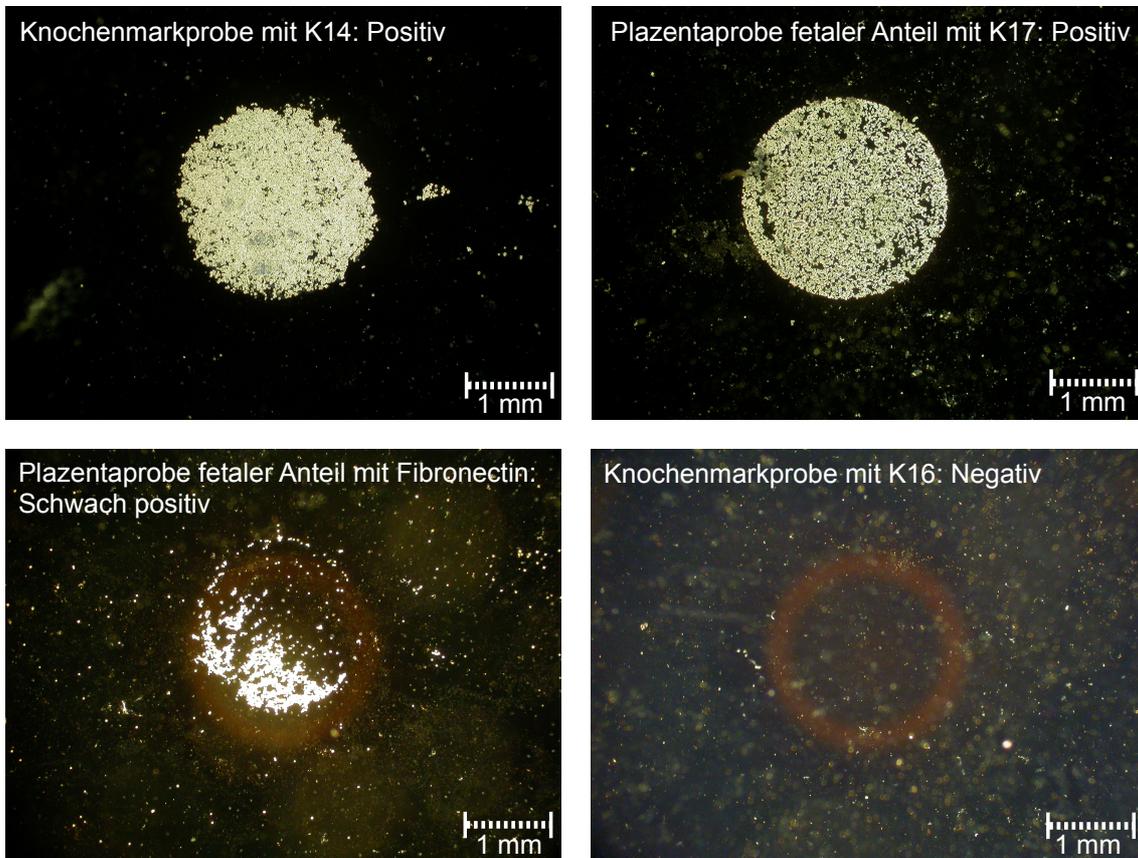
**Abb.10: Oil-Red-gefärbte Knochenmarkszellen der 2. Passage nach einmonatiger Behandlung mit adipogenem Differenzierungsmedium**  
Typische Bildung intrazellulärer, durch die Färbung rot leuchtender Fettvakuolen [52]. Nicht alle Zellen zeigen eine Anreicherung an Fettvakuolen.

**3.8: Fähigkeit zur osteogenen / adipogenen Differenzierung**

**Tabelle 14: Übersicht aller Proben bezogen auf osteogene / adipogene Differenzierung:** Die Prozentangaben stellen den Anteil an allen Proben dar.

Gewebe	Osteogene Differenzierung (ca.%)	Adipogene Differenzierung (ca.%)
Plazenta	0%	0%
Knochenmark	71%	86%

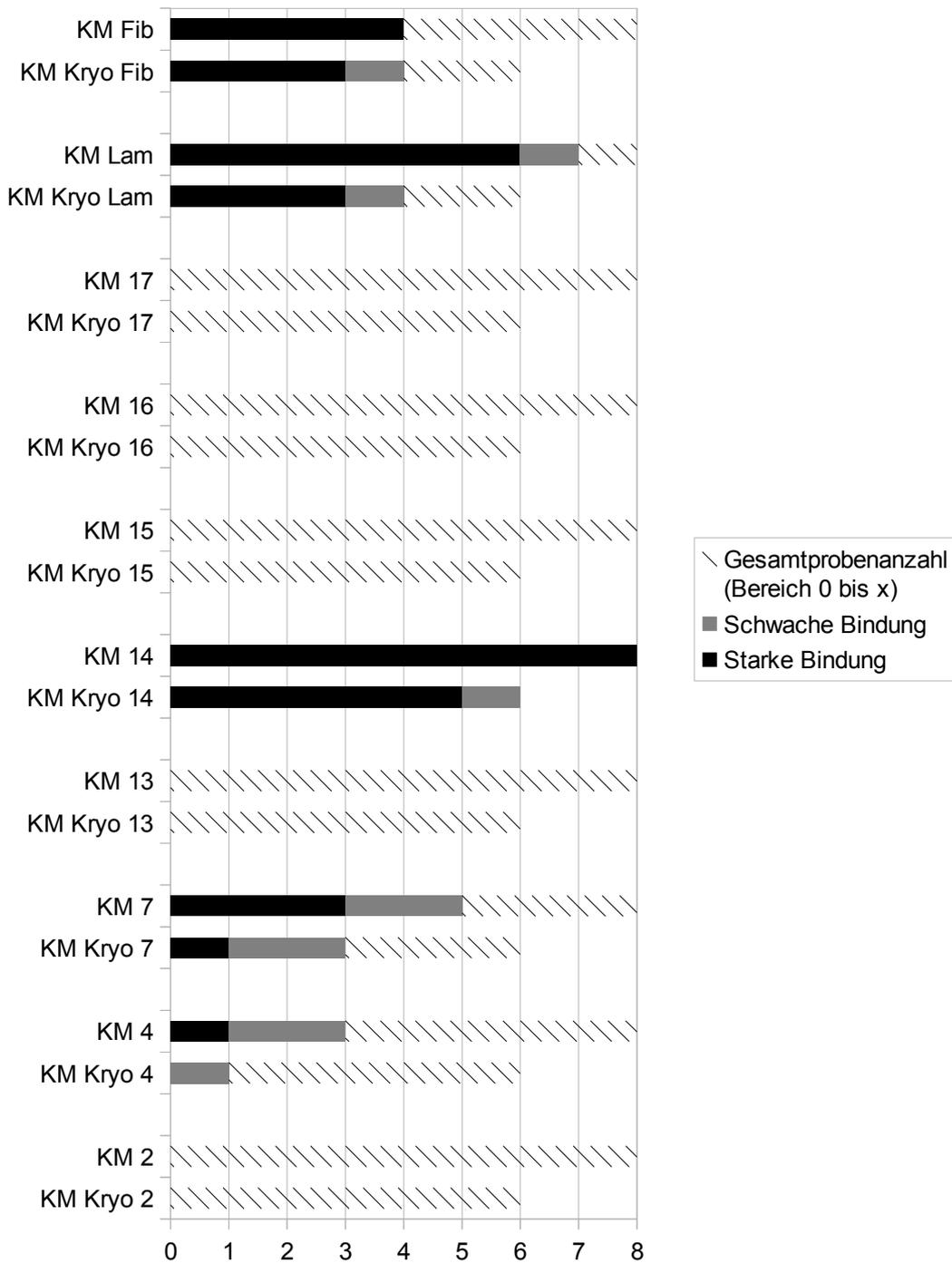
Die untersuchten Plazentazellen sind nicht zur osteogenen und adipogenen Differenzierung in der Lage, während Knochenmarkszellen größtenteils zur osteogenen und adipogenen Differenzierung fähig sind.

**3.9: Exemplarische Darstellung einzelner Anhaftungsversuche**

**Abb.11: Veranschaulichung der Anhaftungsbeurteilungen positiv, schwach positiv und negativ:** Links oben: Anhaftungsversuch von Knochenmarkszellen mit Konjugat 14; Rechts oben: Anhaftungsversuch fetaler Plazentazellen mit Konjugat 17; Links unten: Anhaftungsversuch fetaler Plazentazellen mit der Positivkontrolle Fibronectin; Rechts unten: Anhaftungsversuch von Knochenmarkszellen mit Konjugat 16.

Die kreisrunde Fläche ist der Applikationsort des jeweiligen Substanztropfens, auf welcher in den beiden oberen Bildern (Abb.11) die Zellen sphärisch als weiße Punkte erscheinen. Ihre effiziente Adhäsion an der darunterliegenden Substanz wurde durch 5 standardisierte Waschgänge nachgewiesen: Vor den Waschgängen war die gesamte innere Petrischalenoberfläche mit Zellen übersät, die bei fehlender effizienter Adhäsion durch den generierten Pipettierdruck mit 300  $\mu$ l PBS weggespült und entfernt wurden. Die Anhaftungsversuche mit der Negativkontrolle (1  $\mu$ l 1%iges BSA/PBS-Gemisch) waren stets negativ.

**3.10: Anhaftungsdiagramm Knochenmarkszellen**



**Abb.12: Übersicht aller Anhaftungsversuche mit Knochenmarkszellen und Gegenüberstellung der Zellen selben Ursprungs in frischer und kryokonservierter Form: KM=Knochenmarkszellen; Kryo=kryokonservierte Version der Zellen; "Zahl"=verwendetes Konjugat mit entsprechender Peptidcodierung; Lam=Positivkontrolle Laminin; Fib=Positivkontrolle Fibronectin**

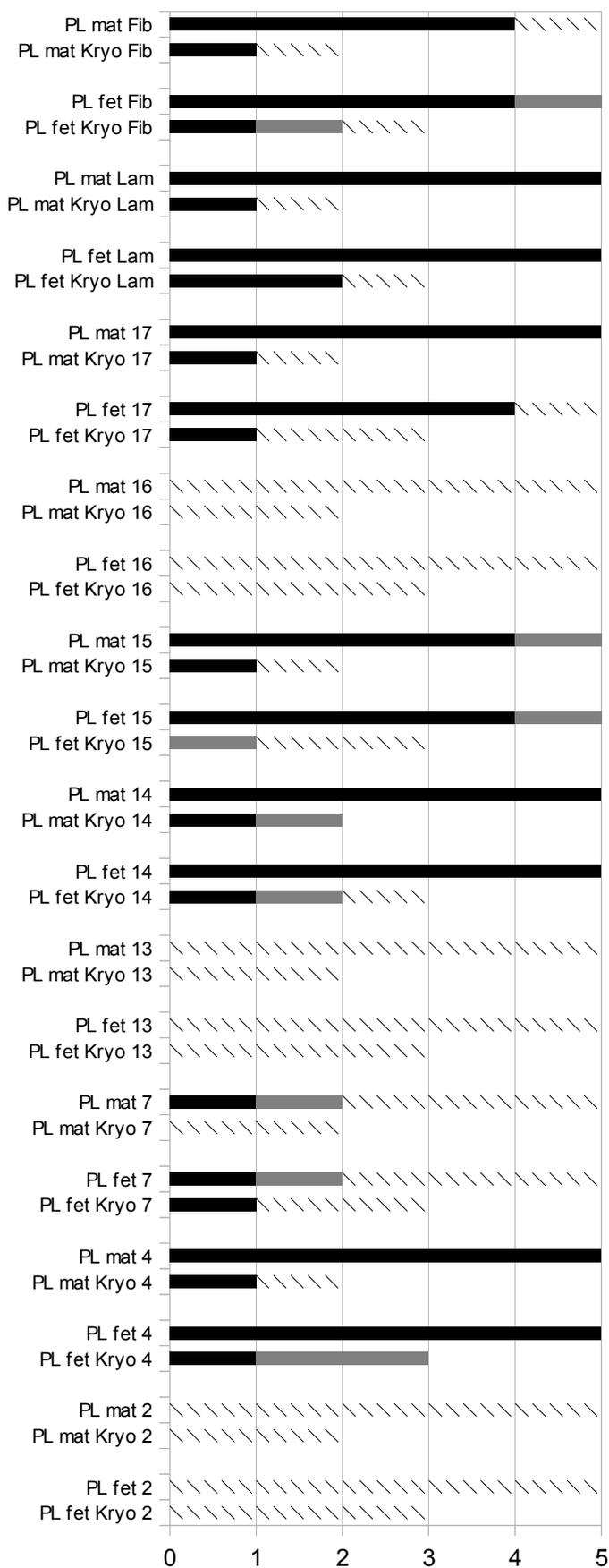
**Angaben aus Abb.12:** (Alle Ursprungsangaben der Konjugate gemäß [48] )

Frische Knochenmarkszellen der 2. Passage zeigen leichte Affinität zu Konjugat 4 (Ursprung Laminin  $\alpha 4$  chain G domain), mittelgradige zu Konjugat 7 (Ursprung Fibronectin) und der Positivkontrolle Fibronectin sowie starke Affinität zu Konjugat 14 (Ursprung Laminin  $\alpha 4$  chain G domain) und der Positivkontrolle Laminin.

Kryokonservierte Knochenmarkszellen weisen in abgeschwächter Form das gleiche Affinitätsmuster wie frische Zellen auf. Nur 6 der 8 untersuchten Proben haben die Kryokonservierung überstanden, diese weisen aber trotzdem bei den Anhaftungsversuchen Einbußen in der Bindungshäufigkeit auf.

Bei den Konjugaten 2 (Ursprung Collagen IV  $\alpha 1$ ), 13 (Ursprung Laminin  $\alpha 1$ ), 15 (Ursprung synthetisch, Sequenz teilweise in Fibronectin vorhanden), 16 (Ursprung Fibronectin Typ III) und 17 (Ursprung Fibronectin Typ III) besteht keine Anhaftung.

Zusätzlich ist zu erwähnen, dass Negativkontrollen nie Anhaftungen aufwiesen.



**Abb.13:**  
**Anhaftungsdiagramm**  
**Plazentazellen:**  
 PL=Plazentazellen;  
 fet=fetaler Plazentaanteil;  
 mat=maternaler Plazentaanteil;  
 Kryo=Kryokonservierte Version  
 der Zellen;  
 „Zahl“=Konjugat mit  
 entsprechender Peptid-  
 codierung;  
 Lam=Positivkontrolle Laminin;  
 Fib=Positivkontrolle  
 Fibronectin

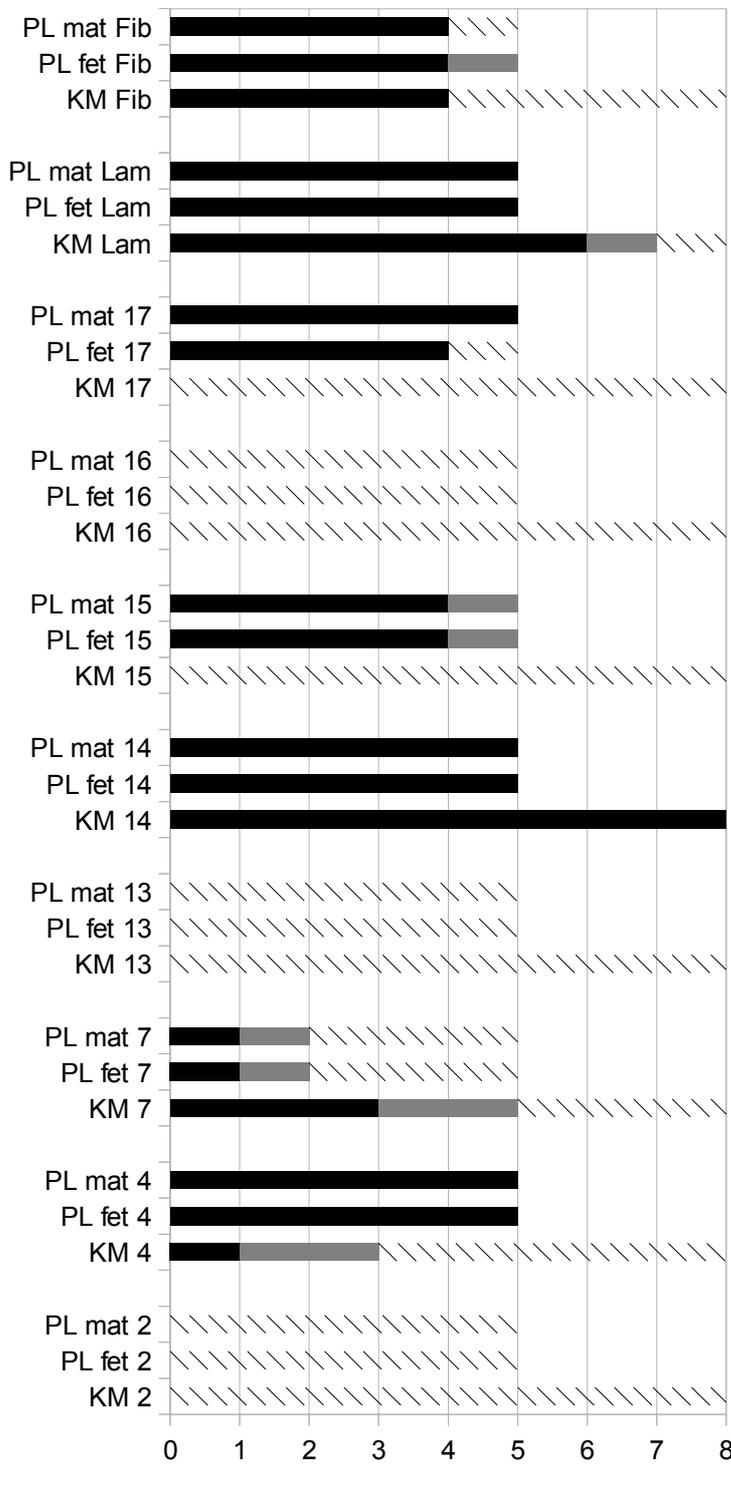
\ Gesamtprobenanzahl  
 (Bereich 0 bis x)  
 ■ Schwache Bindung  
 ■ Starke Bindung

**Angaben aus Abb.13:** (Alle Ursprungsangaben der Konjugate gemäß [48] )  
Frische Plazentazellen aus maternalem und fetalem Anteil unterscheiden sich kaum in ihrem Affinitätsmuster. Leichte Affinität besteht bei Konjugat 7 (Ursprung Fibronectin). Starke Affinität besteht bei Konjugat 4 (Ursprung Laminin  $\alpha 4$  chain G domain), Konjugat 14 (Ursprung Laminin  $\alpha 4$  chain G domain), Konjugat 15 (Ursprung synthetisch, Sequenz teilweise in Fibronectin vorhanden), Konjugat 17 (Ursprung Fibronectin Typ III) sowie den Positivkontrollen Laminin und Fibronectin.

Kryokonservierte Plazentazellen weisen in abgeschwächter Form ein ähnliches Affinitätsmuster wie frische Zellen auf. Nur 3 der 5 untersuchten fetalen und nur 2 der 5 untersuchten maternalen Proben haben die Kryokonservierung überstanden, diese weisen aber trotzdem bei den Anhaftungsversuchen Einbußen in ihrer Bindungshäufigkeit auf.

Bei den Konjugaten 2 (Ursprung Collagen IV  $\alpha 1$ ), 13 (Ursprung Laminin  $\alpha 1$ ) und 16 (Ursprung Fibronectin Typ III) besteht keine Anhaftung.

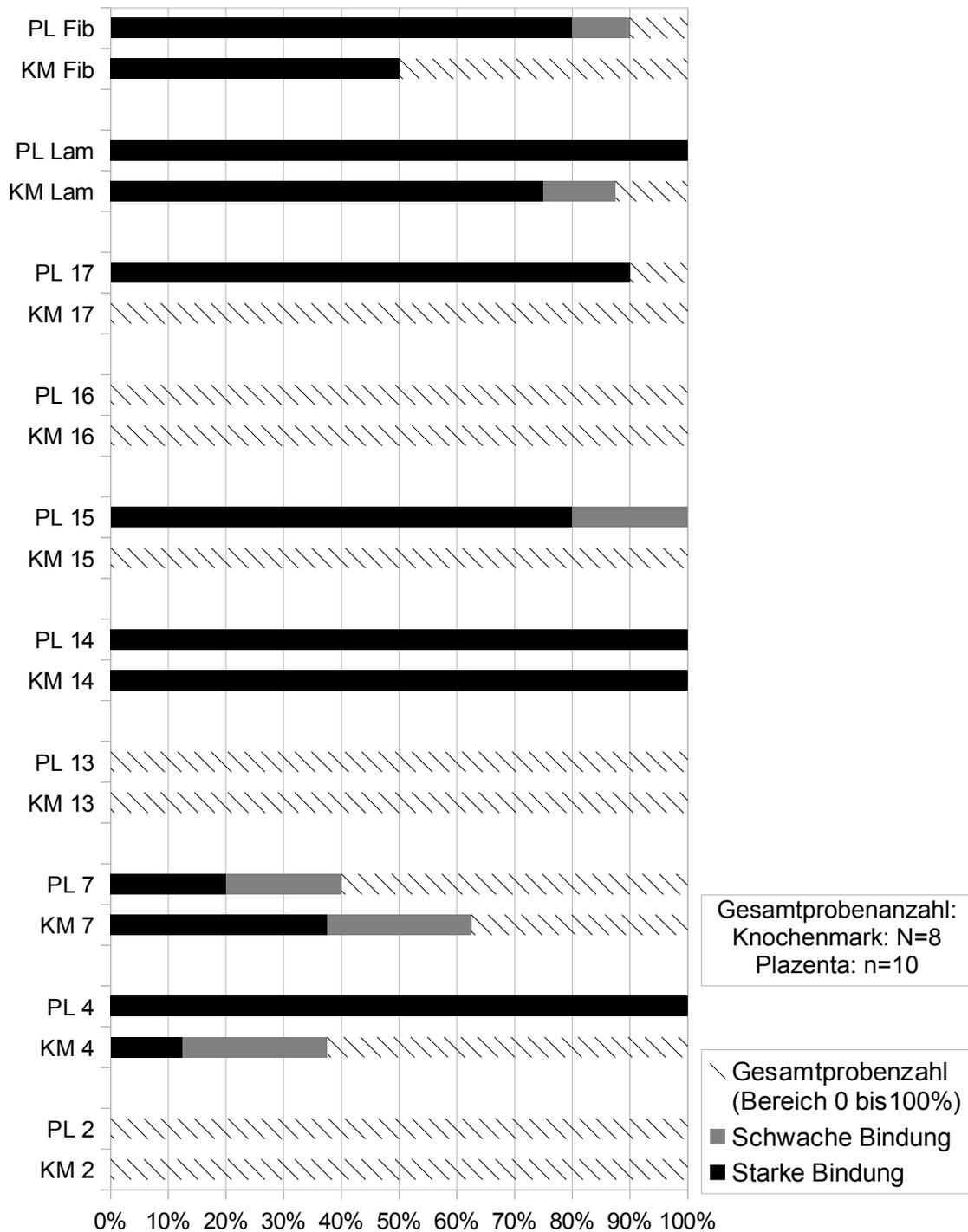
Zusätzlich ist zu erwähnen, dass Negativkontrollen nie Anhaftungen aufwiesen.



**Abb.14:**  
**Gegenüberstellung der**  
**Anhaftungsversuche mit**  
**frischen Zellen aus**  
**Knochenmark und**  
**Plazenta:**

KM=Knochenmarkszellen;  
 PL=Plazentazellen;  
 fet=fetaler Plazentaanteil;  
 mat=maternaler  
 Plazentaanteil;  
 „Zahl“=Konjugat mit  
 entsprechender  
 Peptidcodierung;  
 Lam=Positivkontrolle  
 Laminin;  
 Fib=Positivkontrolle  
 Fibronectin

\ Gesamtprobenanzahl  
 (Bereich 0 bis x)  
 ■ Schwache Bindung  
 ■ Starke Bindung



**Abb.15: Prozentualer Vergleich der Anhaftungsversuche mit frischen Zellen aus Knochenmark und Plazenta**

KM=Knochenmarkszellen; PL=Plazentazellen; "Zahl"=Konjugat mit entsprechender Peptidcodierung; Lam=Positivkontrolle Laminin; Fib=Positivkontrolle Fibronectin. Die Anhaftungsversuchsergebnisse von maternalem und fetalem Plazentaanteil wurden zusammengeführt, woraus die n-Zahl für Plazenta=10 entsteht.

**Angaben aus Abb.15:** (Alle Ursprungsangaben der Konjugate gemäß [48] )

Da sich frische Zellen aus fetalem und maternalem Plazentaanteil, wie in Abb.14 gezeigt, kaum in ihrem Konjugataffinitätsmuster unterscheiden, wurden übersichtshalber die beiden Anteile zusammengeführt, was eine n-Zahl=10 für Plazentaprobe generiert. Die prozentuale Darstellung der Übersicht der Anhaftungsversuche ermöglicht den Vergleich zwischen Knochenmarkszellen (N=8) und Plazentazellen (n=10).

Die Konjugate 2 (Ursprung Collagen IV  $\alpha 1$ ), 13 (Ursprung Laminin  $\alpha 1$ ) und 16 (Ursprung Fibronectin Typ III) ermöglichen kein positives Anhaftungsergebnis.

Plazentazellen sind deutlich affiner zu Konjugat 4 (Ursprung Laminin  $\alpha 4$  chain G domain) als Knochenmarkszellen.

Knochenmarkszellen haften häufiger an Konjugat 7 (Ursprung Fibronectin) als Plazentazellen.

Der Anhaftungsversuch mit Konjugat 14 (Ursprung Laminin  $\alpha 4$  chain G domain) ist sowohl bei Knochenmark als auch bei Plazenta 100% positiv.

Konjugat 15 (Ursprung synthetisch, Sequenz teilweise in Fibronectin vorhanden) und 17 (Ursprung Fibronectin Typ III) sind plazentaspezifisch positiv, Knochenmark haftet an diesen Konjugaten nicht.

Plazentazellen sind affiner zur Positivkontrolle Fibronectin als Knochenmarkszellen.

**Tabelle 15: Zusammenfassende Gegenüberstellung von Knochenmarks- und Plazentazellen**

KM=frische Knochenmarkszellen; PL=frische Plazentazellen; K "Zahl"=Konjugat mit entsprechender Peptidcodierung; Lam=Positivkontrolle Laminin; Fib=Positivkontrolle Fibronectin; OD=osteogene Differenzierung; AD=adipogene Differenzierung; CD=cluster of differentiation; "+"=alle Messungen positiv; "-"=alle Messungen negativ.

Beim Affinitätsabschnitt der Tabelle bestehen die Prozentangaben aus der Summe von starker+schwacher Bindung (siehe Abb.15).

<b>Affinität</b>	<b>KM-Affinität zu</b>	<b>PL-Affinität zu</b>
<b>K2</b>	<b>0%</b>	<b>0%</b>
<b>K4</b>	<b>37,5%</b>	<b>100%</b>
<b>K7</b>	<b>62,5%</b>	<b>40%</b>
<b>K13</b>	<b>0%</b>	<b>0%</b>
<b>K14</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>
<b>K15</b>	<b>0%</b>	<b>100%</b>
<b>K16</b>	<b>0%</b>	<b>0%</b>
<b>K17</b>	<b>0%</b>	<b>90%</b>
<b>Lam</b>	<b>87,5%</b>	<b>100%</b>
<b>Fib</b>	<b>50%</b>	<b>90%</b>
<b>Differenzierungs- fähigkeit</b>	<b>KM</b>	<b>PL</b>
<b>OD</b>	<b>71%</b>	<b>0%</b>
<b>AD</b>	<b>86%</b>	<b>0%</b>
<b>Zellmarker</b>	<b>KM</b>	<b>PL</b>
<b>CD 73</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>CD 90</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>CD 105</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>CD 14</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>CD 34</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>CD 45</b>	<b>-</b>	<b>-</b>

### **3.15: Kryokonservierung**

#### Kryokonservierte Knochenmarkszellen

2 von 8 Proben verloren gänzlich ihre Fähigkeit zur Zellhaftung und Proliferation, die Zellen schwammen auch nach mehreren Tagen noch in sphärischer Form im Medium der Kulturflasche.

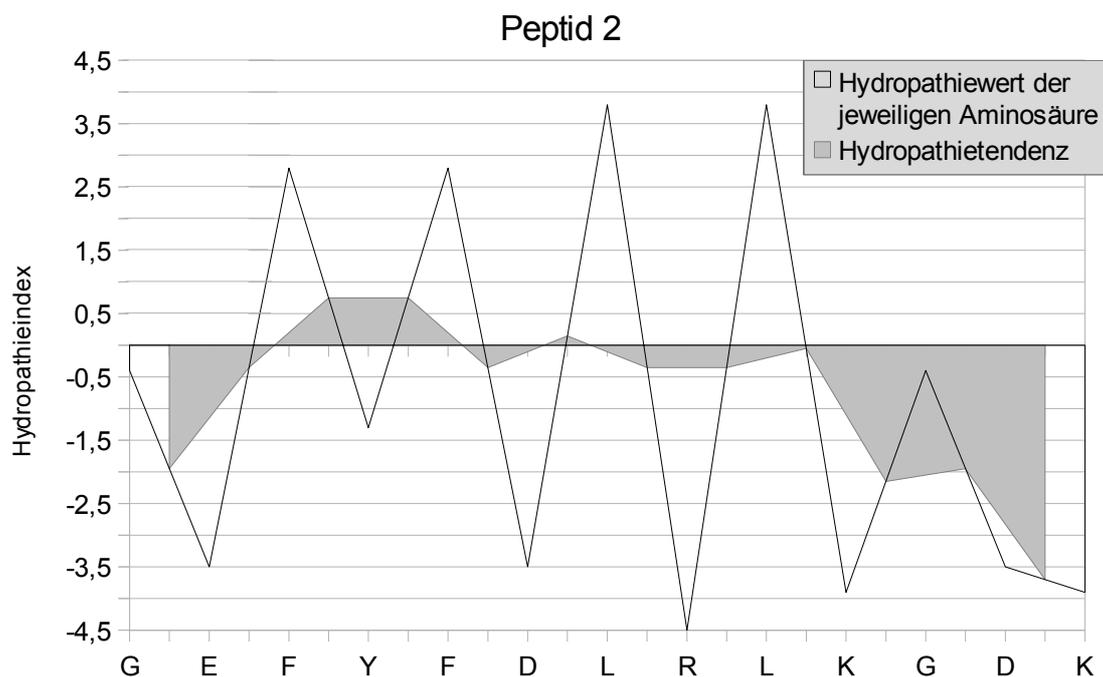
6 von 8 Proben enthielten trotz erheblichem Zellverlust genügend haftende und proliferierende Zellen, die aber beim Anhaftungsversuch Einbußen in ihrer Adhäsionsfunktionalität aufwiesen, was sich in herabgesetzter Anhaftungshäufigkeit an den Konjugaten manifestierte, welche von frischen Zellen gebunden werden. Das Affinitätsmuster änderte sich nicht.

#### Kryokonservierte Plazentazellen

Nur 3 der 5 fetalen und nur 2 der 5 maternalen Proben überstanden die Kryokonservierung. Die restlichen Proben hatten gänzlich ihre Anhaftungs- und Proliferationsfähigkeit eingebüßt, die Zellen schwammen auch nach mehreren Tagen noch in sphärischer Form im Medium der Kulturflasche.

Die noch funktionalen Plazentaprobe enthielten trotz erheblichem Zellverlust genügend haftende und proliferierende Zellen, welche beim Anhaftungsversuch in abgeschwächter Form mit Ausnahme von Konjugat 7 bei der maternalen Plazentakomponente (keine Bindung) das gleiche Peptidbindungsmuster wie nicht kryogenisierte Zellen aufwiesen. Zu Konjugat 7 ist zu erwähnen, dass auch bei den frischen Zellen der maternalen Komponente nur ein Anhaftungsversuch von fünf positiv ausfiel, einer schwach positiv.

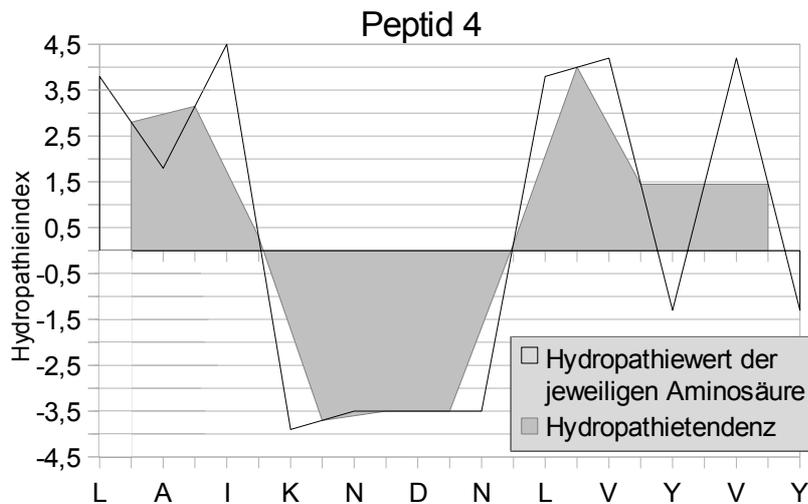
**3.16: Peptiduntersuchungen basierend auf dem Hydropathie-Index  
proteinogener Aminosäuren [57]**



**Abb.16: Peptid 2 gemäß Hydropathie-Index [57] verschlüsselt und graphisch dargestellt**

4,5=stärkste Lipophilität; -4,5=stärkste Hydrophilität:  
Hydropathietendenz=Kurve aller Mittelwerte, jeweils aus zwei gegenüberstehenden Aminosäuren gebildet.

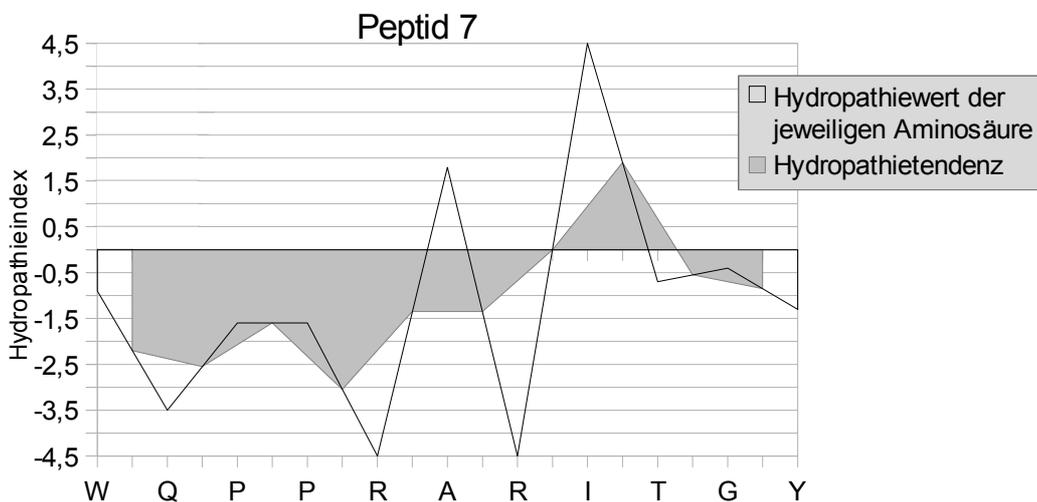
Peptid 2 besitzt die hydrophile Domäne KGDK, welcher ein Abschnitt relativ neutraler Hydropathietendenz vorausgeht.



**Abb.17: Peptid 4 gemäß Hydropathie-Index [57] verschlüsselt und graphisch dargestellt**

4,5=stärkste Lipophilität; -4,5=stärkste Hydrophilität:  
 Hydrophathietendenz=Kurve aller Mittelwerte, jeweils aus zwei gegenüberstehenden Aminosäuren gebildet.

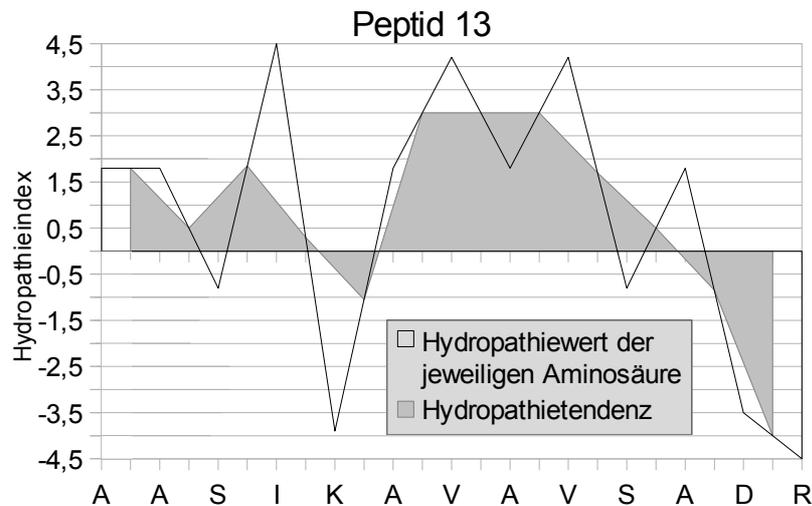
Peptid 4 beginnt mit der lipophilen Domäne LAI, gefolgt von der hydrophilen Domäne KNDN. Gemäß Hydrophathietendenzkurve zeigt sich der Peptidabschnitt LVYVY als Domäne lipophiler Hydrophathietendenz.



**Abb.18: Peptid 7 gemäß Hydropathie-Index [57] verschlüsselt und graphisch dargestellt:**

4,5=stärkste Lipophilität; -4,5=stärkste Hydrophilität:  
 Hydrophathietendenz=Kurve aller Mittelwerte, jeweils aus zwei gegenüberstehenden Aminosäuren gebildet.

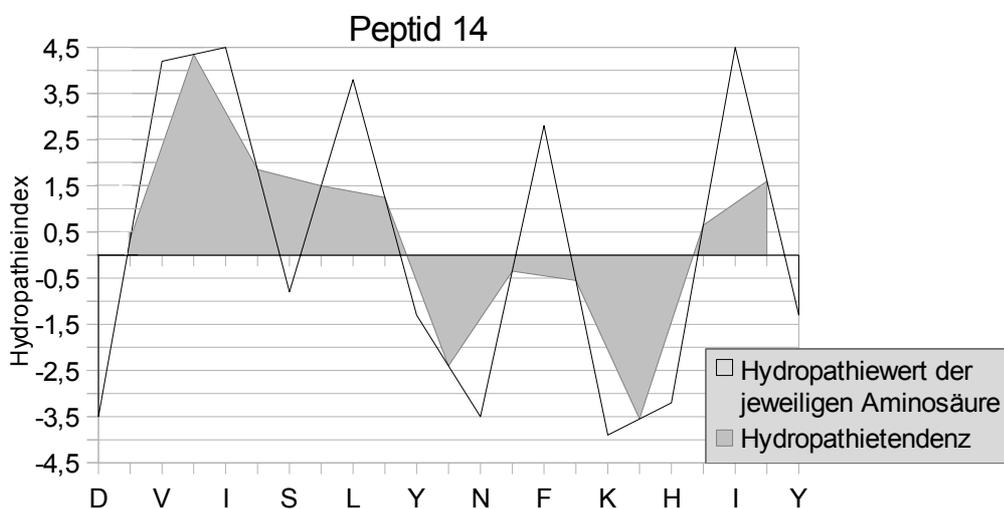
Peptid 7 besitzt die prominente hydrophile Domäne WQPPR, als Ausweitung WQPPRAR ist sie eine Domäne hydrophiler Hydrophathietendenz.



**Abb.19: Peptid 13 gemäß Hydropathie-Index [57] verschlüsselt und graphisch dargestellt**

4,5=stärkste Lipophilität; -4,5=stärkste Hydrophilität:  
 Hydrophatietendenz=Kurve aller Mittelwerte, jeweils aus zwei gegenüberstehenden Aminosäuren gebildet.

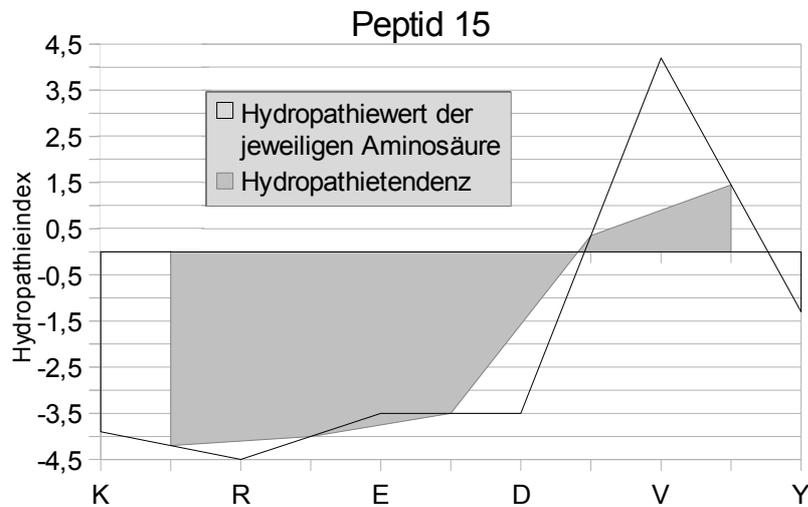
Peptid 13 ist gemäß Hydropathie-Index ein hauptsächlich lipophiles Molekül mit der prominenten lipophilen Domäne AVAV.



**Abb.20: Peptid 14 gemäß Hydropathie-Index [57] verschlüsselt und graphisch dargestellt**

4,5=stärkste Lipophilität; -4,5=stärkste Hydrophilität:  
 Hydrophatietendenz=Kurve aller Mittelwerte, jeweils aus zwei gegenüberstehenden Aminosäuren gebildet.

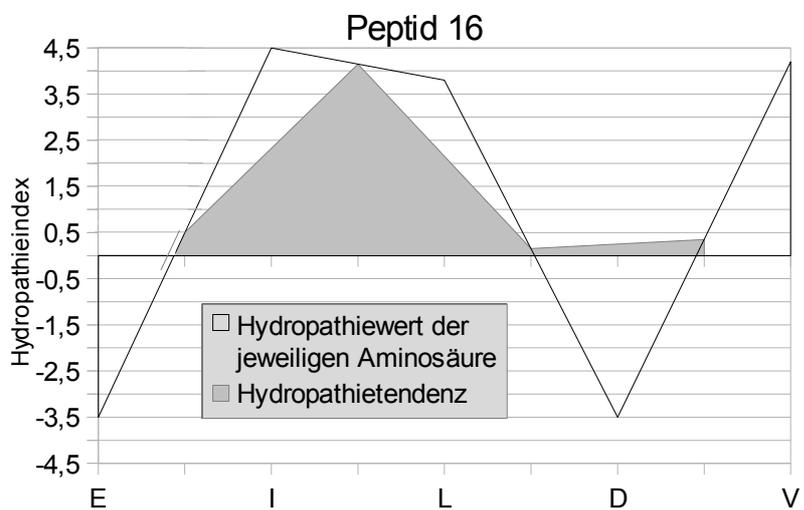
Peptid 14 weist die Reihenfolge lipophile-hydrophile-lipophile Hydrophatietendenzdomäne auf.



**Abb.21: Peptid 15 gemäß Hydrophathie-Index [57] verschlüsselt und graphisch dargestellt**

4,5=stärkste Lipophilität; -4,5=stärkste Hydrophilität:  
 Hydrophathietendenz=Kurve aller Mittelwerte, jeweils aus zwei gegenüberstehenden Aminosäuren gebildet.

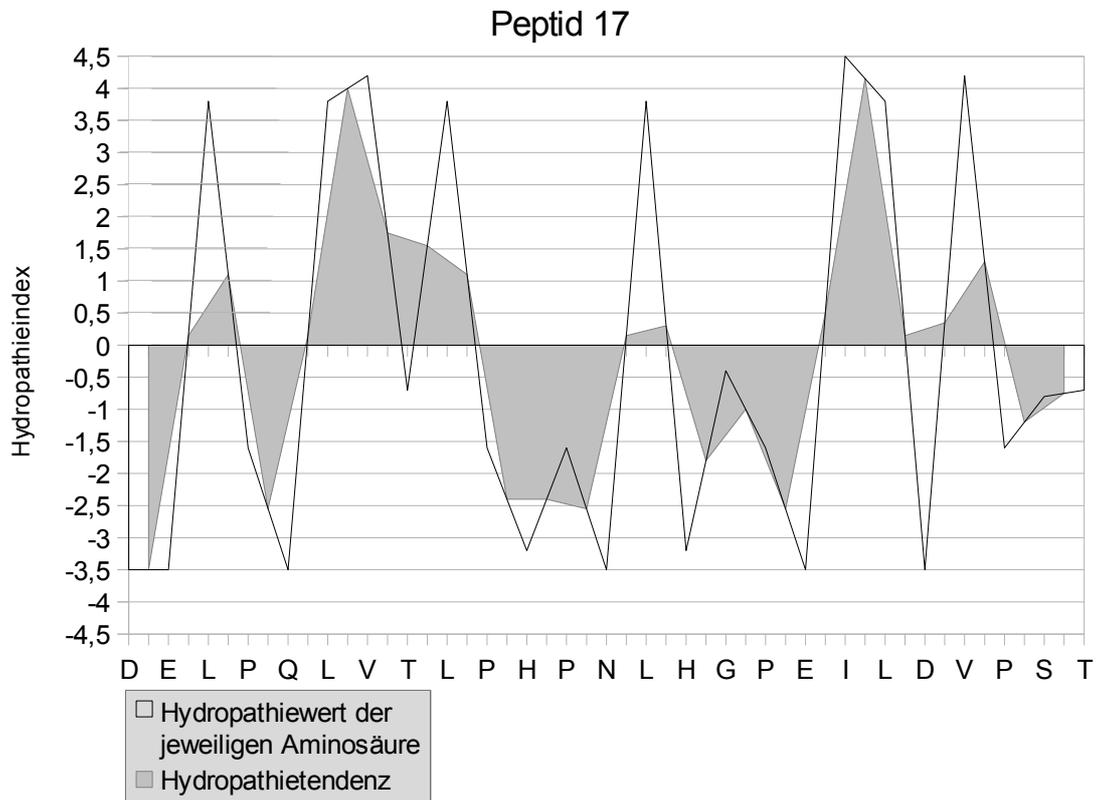
Bei Peptid 15 besteht die prominente hydrophile Domäne KRED.



**Abb.22: Peptid 16 gemäß Hydrophathie-Index [57] verschlüsselt und graphisch dargestellt**

4,5=stärkste Lipophilität; -4,5=stärkste Hydrophilität:  
 Hydrophathietendenz=Kurve aller Mittelwerte, jeweils aus zwei gegenüberstehenden Aminosäuren gebildet.

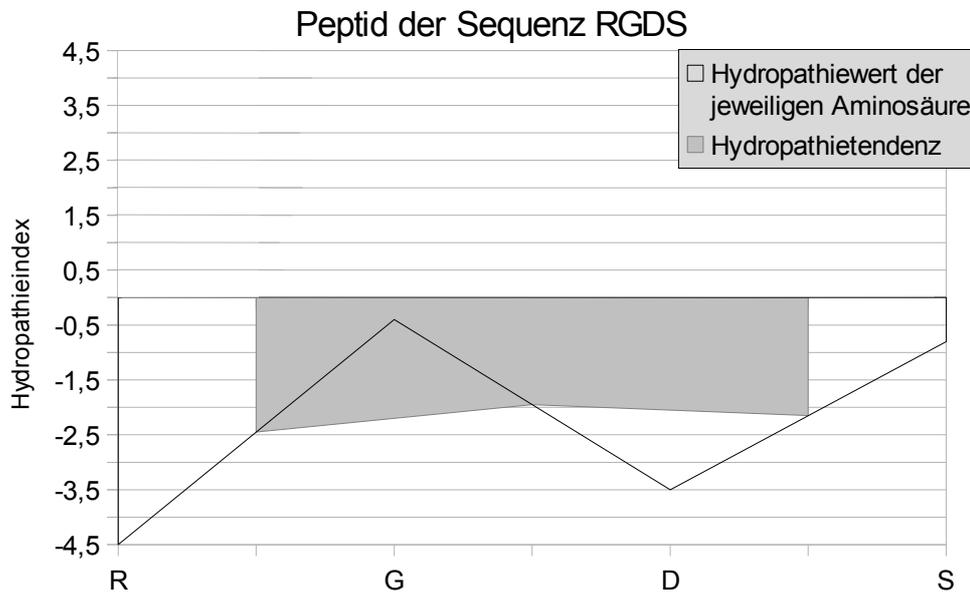
Gemäß Hydrophathietendenzkurve ist Peptid 16 ein hauptsächlich lipophiles Molekül.



**Abb.23: Peptid 17 gemäß Hydropathie-Index [57] verschlüsselt und graphisch dargestellt**

4,5=stärkste Lipophilität; -4,5=stärkste Hydrophilität:  
 Hydropathietendenz=Kurve aller Mittelwerte, jeweils aus zwei gegenüberstehenden Aminosäuren gebildet.

Als größere hydrophile Domänen zeigen sich bei Peptid 17 die Sequenzen PHPN und HGPE. Zudem besteht eine konsistente Domäne lipophiler Hydropathietendenz im Rahmen von LVTL.



**Abb.24: Die Aminosäuresequenz RGDS gemäß Hydrophathie-Index [57] verschlüsselt und graphisch dargestellt**

4,5=stärkste Lipophilität; -4,5=stärkste Hydrophilität:  
 Hydrophathietendenz=Kurve aller Mittelwerte, jeweils aus zwei gegenüberstehenden Aminosäuren gebildet.

RGDS ist durchgehend hydrophil.

Allgemeine Beobachtung:

Die Peptide 2, 4, 7, 14, 15 und 17 sowie RGDS haben mindestens eine Domäne hydrophiler Hydrophathietendenz, welche aus mindestens vier hydrophilen Aminosäuren besteht.

## Kapitel 4: Diskussion

Die Verifizierungsvorgänge von hMSC und der Peptidkonjugate als essentielle Komponenten der Anhaftungsversuche haben ebenso wie die Konsequenzen der Kryokonservierung aufschlussreiche Ergebnisse gezeigt, die nun genauer besprochen werden, bevor auf das primäre Ziel, der Ermittlung von Möglichkeiten gezielter hMSC-Positionierung im Organismus, eingegangen wird.

### 4.1: Differenzierung

Die MSC-Charakterisierung beinhaltet den Nachweis osteogener Differenzierungsfähigkeit durch von Kossa-Färbung sowie den Nachweis adipogener Differenzierungsfähigkeit durch Oil-Red-O-Färbung [22]. Von uns untersuchte Knochenmarkszellen waren größtenteils osteogen und adipogen differenzierbar. In den durchgeführten von Kossa-Färbungen zeigten sich aber selbst in positiven Knochenmark-Zellkulturen neben schwarzgefärbten Arealen weiträumige nicht gefärbte Flächen. Analog dazu zeigten bei Oil-Red-O-Färbung nicht alle Zellen eine Anreicherung an Fettvakuolen. Dies ist dadurch zu erklären, dass MSC in Kultur Kolonien mit eigenen Mikroumgebungen oder in-vitro-Nischen generieren, wobei die Entstehung von Kolonien mit Subpopulationen heterogenen Differenzierungspotentials möglich ist [61]. Seneszenz führt zu langsamerer Verbreitung, verminderter Teilungsfähigkeit und herabgesetztem Differenzierungspotential [61]. Auch bei MSC besteht dieses Phänomen, es schränkt unter anderem ihre Lebensspanne ein, reduziert ihre Zellfunktionalität und erhöht ihr Mutationsrisiko [39]. Zellteilungen führen zu Telomerverkürzungen, bis letztere instabil werden, was den Arrest des Zellzyklus durch Aktivierung des Tumorsuppressorproteins p53 und schließlich die Apoptose nach sich zieht [2]. Telomere sind Chromosomenenden, die aus nicht codierenden, repetitiven DNA-Sequenzen bestehen, ihre Integrität gewährleistet Chromosomenstabilität [2]. Die Replikation der Telomere durch

die spezifische DNA-Polymerase Telomerase ist mit Ausnahme von Keimbahnzellen in den meisten somatischen Zellen nicht vorhanden [2], doch wird von MSC zwecks Differenzierung ein Minimum an Telomerase-Expression benötigt [62]. Osteogenese wurde verstärkt in Telomerase-überexprimierenden MSC festgestellt [62]. Im Vergleich zu Knochenmark-MSK wurden bei HUCPVC (human umbilical cord perivascular cells) höhere Telomeraseaktivität, längere Telomere und höhere Differenzierungsfähigkeit in Richtung osteogener Zelllinie beobachtet [62]. Nach osteogener Differenzierung nahm die Telomeraseaktivität sowohl in HUCPVC als auch in Knochenmark-MSK signifikant ab, was als Hinweis für Zellreifung und terminale Differenzierung gedeutet wird [62].

Bei den hier untersuchten Plazentazellen fiel der Nachweis beider Differenzierungsrichtungen, i.e. Osteogenese und Adipogenese, stets negativ aus, wodurch Minimalkriterien für MSC-Charakterisierung nicht erfüllt sind [22]. Folglich scheint Plazentagewebe nach entfernter Nabelschnur und Amnionepithel basierend auf unseren Ergebnissen nicht als hMSC-Quelle geeignet zu sein. hMSC-Bezugsquellen ergeben sich gemäß Berichten positiver MSC-Isolierung eher bei Nabelschnurblut und Wharton-Sulze [15].

Die aus Plazentagewebe kultivierten Zellen wiesen eine stärkere Proliferation und Zellausbeute im Vergleich zu Knochenmarkszellen auf, diese Vorteile bestehen jedoch bei non-hMSC, die nicht im Fokus dieser Studie stehen.

#### **4.2: Oberflächenmarker**

Die MSC-Identifizierung beinhaltet auch den Nachweis eines bestimmten Oberflächenmarker-Profiles [22]. Ausnahmslos alle untersuchten Zellproben aus Knochenmark und Plazenta sind positiv für die Positivmarker [22] CD73, CD90 und CD105 sowie negativ für die Negativmarker [22] CD14, CD34 und CD45. Da die FACS-Analyse mit Zellen der 2. Passage erfolgte gilt ab diesem Kulturabschnitt, dass das beschriebene Risiko [63] einer Mitexpansion von

Zellkontaminanten wie Makrophagen, Endothelzellen und hämatopoetischen Stammzellen und daraus resultierende relevante Wechselwirkungen mit MSC unwahrscheinlich ist.

### **4.3: Kryokonservierung**

Sowohl für Knochenmarkszellen als auch plazentare Zellen ist die angewendete Methode der Kryokonservierung mit Funktionsverlust bis hin zu Zelltod verbunden. 40% der Proben aus maternalem Plazentaanteil, 60% der Proben aus dem fetalen Plazentaanteil und 75% der Proben aus Knochenmark konnten nach dem Auftauen noch an die Zellkulturflaschen adhären und proliferieren. Nichtadhärierenden Zellen konnten nicht mehr kultiviert werden und hatten die Anhaftung als hMSC-Charakterisierungskriterium eingebüßt [22].

Bei den Anhaftungsversuchen mit den noch kultivierbaren Kryozellen zeigte sich zwar weitgehend dasselbe Anhaftungsmuster wie bei nicht kryokonservierten Zellen, es kam jedoch deutlich seltener zu Anhaftungen. Diese waren häufiger als schwach positiv einzustufen.

Zur Klärung oben genannter Probleme lohnt es sich die einzelnen Vorgänge im Rahmen der Kryokonservierung genauer zu besprechen. Das in Zellen penetrierende Gefrierschutzmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) ist zwar bei Raumtemperatur zelltoxisch, eine Lebendkonservierung der Zellen ohne Gefrierschutzmittel aber anscheinend nicht möglich [50]. Bereits bei +20 bis -2°C wird der Zellstoffwechsel stark gedrosselt [50]. Zwischen -2°C und -15°C setzt in der Zellsuspension extrazelluläre Eisbildung ein, welche durch osmotische Effekte die Zelle dehydriert und schrumpfen lässt [50]. Ein Wasserverlust der Zelle >30% führt zu irreversiblen Zellschäden, denen durch zelloptimierte Medien, Kühlraten und Einfrierprotokollen entgegengewirkt werden muss [50]. Intrazelluläre Eisbildung setzt zwischen -15°C und -25°C ein und verursacht durch intrazellulären Volumenzuwachs für die Zelle erhöhten mechanischen Stress [50]. An den Eisrändern können sich durch erhöhte

Ionenkonzentrationen relevante, zellschädigende Elektrolytgradienten ausbilden [50]. Im Bereich zwischen  $-25^{\circ}\text{C}$  und  $-130^{\circ}\text{C}$  kommt es zum Rekristallisationsprozess, wobei sich große Eisdomänen auf Kosten kleinerer Eiskristalle bilden, was von Zellen nur schlecht toleriert wird [50]. Der Rekristallisationspunkt, also die Temperatur, ab der Schäden durch Rekristallisation als unwahrscheinlich eingestuft werden, beträgt in Anwesenheit von DMSO ca.  $-115^{\circ}\text{C}$  [50]. Bei sinkender Temperatur läuft die Rekristallisation immer langsamer ab [50]. Die beschriebenen Prozesse und der Zellstoffwechsel kommen unterhalb von  $-130^{\circ}\text{C}$  größtenteils zum Erliegen, Temperaturen unter  $-150^{\circ}\text{C}$  erlauben die Langzeitlagerung von Zellen [50]. Bei durch flüssigen Stickstoff erzeugten  $-196^{\circ}\text{C}$  kommt der Zellstoffwechsel vollständig zum Erliegen [50]. Rasche Kühlung verringert die zelluläre Dehydrierung auf Kosten vermehrter Bildung zellschädigender intrazellulärer Eiskristalle [50]. Dagegen haben Zellen bei zu langsamer Kühlung mit starken osmotischen Schwankungen zu kämpfen [50]. Eine Kühlrate von  $-1^{\circ}\text{C}$  pro Minute bietet für Zellen die größte Überlebenswahrscheinlichkeit [50]. Bei zu langsamem Auftauen besteht genau wie beim Tiefkühlen die Gefahr der Zellschädigung durch Rekristallisation [50].

Als Ursache der Probleme bei der Kryokonservierung kann abschließend die im SOP-Protokoll beschriebene stufenweise Probenlagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  für eine Stunde und anschließende Lagerung bei  $-70^{\circ}\text{C}$  für maximal 24 Stunden identifiziert werden. Die meisten Zellen sind durch erhöhten intrazellulären Stress sowie Schädigung durch Rekristallisationsprozesse zugrunde gegangen [50]. Außerdem ist eine gleichmäßige Kühlungsrate von  $-1^{\circ}\text{C}$  pro Minute nicht gegeben.

Zur Behebung dieser Probleme können sich stickstoffunabhängige Gefriertruhen eignen, die  $-152^{\circ}\text{C}$  erreichen, eine gleichmäßige Kühlungsrate und die Langzeitlagerung von Zellen ermöglichen [50].

#### 4.4: LDS-PAGE

Ein Konjugat ist größer als aBSA und wandert folglich während der LDS-PAGE langsamer. Die erfolgte Konjugation wird dadurch in der LDS-PAGE bei den Konjugaten 2, 7, 13, 14, 15, 16 und 17 angezeigt.

Alle in der LDS-PAGE getesteten Ausführungen von Konjugat 4 bilden stets eine Ausnahme. Mittels LDS-PAGE ist eine Konjugation von MP4 mit aBSA30 bzw. aBSA50 nicht nachweisbar, die respektiven Banden liegen auf Höhe von aBSA und BSA. Da trotzdem 100% der Anhaftungsversuche mit plazentaren Zellen und 37,5% der Anhaftungsversuche mit Zellen aus Knochenmark positiv ausfielen lässt dies die Vermutung zu, dass sich auf dem Trägermolekül aBSA nur eine geringe Anzahl an MP4-Molekülen befinden.

Alle Konjugate, die eine erfolgreiche Konjugation erkennen lassen weisen in ähnlichen Abständen von ihrer am weitesten gelaufenen, in der Nähe der 97 kDa-Markierung befindlichen, hellrot markierten Bande darauf folgende, hellgrüne Banden im Bereich der 191 kDa-Markierung auf. Dies weist auf ein 2-Komponenten-Gemisch hin, wobei grob gerundet Komponente 1 (grüne Bande) in der LDS-PAGE die doppelte Masse von Komponente 2 (hellrote Bande) anzeigt. Analog dazu haben alle Substanzen, die keine Konjugation ersichtlich werden lassen (aBSA, K 4 BSA 30/50, K4 ohne Säule, K 4 Centrispin<sup>-10</sup>, BSA) eine rote Bande im Bereich zwischen 51 und 64 kDa und eine grüne Bande in der Nähe der 97 kDa-Markierung. Da humanes Serumalbumin konzentrationsabhängig Dimere und Oligomere bilden kann [64] liegt die Erklärung nahe, dass alle untersuchten Proben sowohl BSA-Monomere als auch BSA-Dimere beinhalten. Da auch die LDS-PAGE von BSA diese beiden Komponenten anzeigt weist dies darauf hin, dass Monomere und Dimere bereits vor den Konjugationen mit den modifizierten Peptiden und sogar vor der BSA-Funktionalisierung zu aBSA vorhanden waren.

#### **4.5: Angleichung der Konjugatmassen**

Da unter den in dieser Studie gegebenen Bedingungen die Angleichung der Konjugatmassen für die Anhaftungsversuche die größtmögliche Vergleichbarkeit bietet wurde dieses Verfahren mit 3,327 µg Probenmenge etabliert und umgesetzt. Da später im Diskussionsabschnitt "Gezielte Zellplatzierung" wesentlich bessere Möglichkeiten zur Nutzbarmachung der untersuchten Peptide besprochen werden als mit BSA-Trägermolekülen erfüllt diese Methode zur orientierenden Grundlagenforschung ihren Zweck.

#### **4.6: Gezielte Zellpositionierung**

Die aus Knochenmark gewonnenen Zellen wurden durch ihr Differenzierungs- und Zelloberflächenmarker-Profil als humane mesenchymale Stromazellen verifiziert, während aus Plazenta gewonnene Zellen durch fehlende Differenzierungsfähigkeit nicht als hMSC klassifiziert werden können. Peptid 15 und 17 binden plazentaspezifisch und ermöglichen so als Negativmarker für Knochenmark-hMSC und Positivmarker für plazentare Zellen die Unterscheidung dieser. Beispielhaft wäre aus einem Gemisch aus Knochenmark- und Plazentazellen die Trennung zwischen potentiellen hMSC und non-hMSC möglich, indem zunächst das Zellgemisch auf eine mit Peptid 15 oder Peptid 17 ausgestattete Oberfläche gegeben wird. Es ist dann zu erwarten, dass non-hMSC durch Adhäsion auf der Oberfläche festgehalten werden, während nicht adhärente hMSC abgewaschen und zur weiteren Verwendung gesammelt werden können. Die Effizienz dieser Trennungsmethode liegt gemäß aktueller Datenlage bei Peptid 15 höher, da es 100% Plazentazellen-Affinität erbringt, während Peptid 17 nur 90% erreicht. Die Verifizierung der potentiellen hMSC kann dann durch die bekannten Differenzierungs- und Zellmarkerkontrollen erfolgen. In Zukunft wäre auch zu bedenken, ob die Ausstattung mit Trennoberflächen gleichzeitig mit Peptid 15

und Peptid 17 die Retentionseffizienz von non-hMSC über das Maß einer reinen Peptid 15-Oberfläche erhöhen kann, wodurch ein höherer Reinheitsgrad der geernteten hMSC-Suspension resultieren würde.

Diese sehr einfache Trennmethode zur Gewinnung potentieller hMSC eröffnet interessante, praktische und rasch durchführbare Möglichkeiten, um zum einen die Verlässlichkeit dieser Methode bei anderen Geweben zu prüfen und bei positivem Ergebnis weitere Gewebe zur hMSC-Gewinnung zu erschließen.

In Bezug auf ein hMSC-spezifisches Peptid hat sich Peptid 7 mit 62,5% Knochenmarkszellaffinität im Vergleich zu 40% Affinität bei Zellen aus Plazentagewebe als Favorit hervorgetan. Die Trennungseffizienz zwischen hMSC und non-hMSC fällt hier deutlich geringer aus als bei Peptid 15 und Peptid 17.

Besteht einfach nur der Wunsch so viele hMSC wie möglich an Strukturen zu binden, ist von den 8 untersuchten Peptiden Peptid 14 mit 100% Adhäsionsrate erste Wahl. Allerdings ist die Adhäsionsrate bei plazentaren Zellen ebenso hoch, das Peptid sehr unspezifisch. Die Applikation purer hMSC wäre dann zwingend erforderlich, sollte eine Mischbesiedlung von Strukturen zusätzlich mit non-hMSC unerwünscht sein.

Für den Fall, dass eine hMSC-Strukturbesiedlung bei gleichzeitiger Präsenz anderer Zellen erwünscht bzw. erforderlich ist, ohne das letztere das entstehende hMSC-Gerüst kompromittieren, sollte an der Peptidsequenz von Peptid 7 weitergeforscht werden zwecks Erhöhung der hMSC-Spezifität. Möglichkeiten bestehen z.B. in der Variierung einzelner oder mehrerer Aminosäuren in der Sequenz, Ausbau der Sequenz oder Einbringen funktioneller Gruppen.

Positive Anhaftungsversuche fanden bei den Konjugaten 4, 7, 14, 15 und 17 statt, deren zu untersuchende Peptide stets Domänen hydrophiler Hydropathietendenz besitzen. Obwohl auch Peptid 2 über eine solche Domäne verfügt waren alle Anhaftungsversuche mit dem zugehörigen Konjugat 2 immer negativ. Peptide mit lipophiler Hydropathietendenz, also Peptid 13 und 16,

ermöglichten keine Anhaftung. Aus den 8 untersuchten Peptiden und dem zusätzlichen Peptid RGDS kann abgeleitet werden, dass hydrophatische Eigenschaften des jeweiligen Peptides das Ergebnis eines Anhaftungsversuches relevant mitbeeinflussen. Innerhalb einer Peptidsequenz ist eine Domäne hydrophiler Hydrophatietendenz als Voraussetzung für die Erstellung einer potentiell anhaftungsermöglichenden Peptidsequenz wahrscheinlich.

Anzustrebendes Ziel ist es zu steuern, wo sich hMSC niederlassen, um ihre vielfältigen Funktionen wahrzunehmen. In der Literatur wurde von rudimentären bis hin zu sehr ausgefeilten Methoden berichtet, von systemischer Applikation bis hin zu gezielter Anwendung [65-71]. Zum Beispiel wurde eine intramyokardiale MSC-Injektion zur lokalisierten Bereitstellung in infarziertem Myokard getätigt, was aber das Risiko der Bildung von Herzarrhythmien beinhaltete und die klinische Anwendbarkeit dieser Methode durch dessen Invasivität als eingeschränkt angegeben wurde [65].

Zellinfusion als weiterer Ansatz wurde intravenös (i.v.) [61, 66-68, 72-74] oder intraarteriell (i.a.) [69, 75] getätigt. I.v.-applizierte MSC werden größtenteils in der Lunge sequestriert [66, 67, 72], wo sie in afferenten Blutgefäßen als Emboli erscheinen [61, 73]. Es besteht also das Risiko der Lungenembolie als ernste systemische Nebenwirkung [74]. Die anschließende Detektion von MSC, die allmählich zur Leber, Milz, Niere und Knochenmark weiterzuziehen scheinen, steht im Verdacht nur MSC-Debris nachgewiesen zu haben, also keine lebenden MSC mehr [66, 67]. Die Untersuchung der Therapie chronischer Nierenerkrankung durch i.v.-Infusion kryokonservierter MSC führte bei Katzen neben keiner signifikanten klinischen Besserung zu Nebenwirkungen wie erhöhte Atemanstrengung, erhöhte Atmungsrate sowie Erbrechen [68]. Der i.v.-Injektion von Knochenmark-MSC in Schwanzvenen von Ratten mit dilatativer Kardiomyopathie folgte zum Teil eine Wanderung der injizierten Zellen zum Herzen und Differenzierung in einen kardiomyogenen Phänotyp [72]. Dieser sezernierte viel VEGF, unterdrückte die Ablagerung von Kollagen und soll nach

zweimaliger MSC-Infusion die Herzfunktion signifikant verbessert haben [72]. Positive Effekte nach i.v.-MSC-Infusionen wurden durch Verbesserung der Organreparatur bei Knochen, ischämischem Gehirn, Herz und Pankreas verzeichnet [61, 72].

Intraarterielle Stammzellverabreichung in ischämischem Gehirn trägt das Risiko der Gefäßokklusion [75], intraarteriell applizierte MSC zeigten Mikroembolien als mögliche Nebenwirkung mit Behinderung des zerebralen Blutflusses [69].

Abgesehen von den beschriebenen positiven und negativen Aspekten von MSC-Infusionen in Gefäße wird es den MSC überlassen, welche Strukturen sie für ihren Verbleib ausmachen. Werden in Zukunft gezielte Therapien einer systemischen Wirkung vorgezogen bedarf gezieltes Targeting einer Weiterentwicklung der Gefäßinjektions-Methode.

Hierzu wurde beispielhaft ein bispezifisches Antikörper-Heterodimer entwickelt, das einerseits das auf MSC vorkommende CD90 (Thy-1) bindet und auf der anderen Seite MLC1 (myosin light chain 1) bindet, welches im Interstitium von geschädigten Herzen vorkommt und ein Antigenmarker für beschädigtes Myokard ist [70]. Durch diese Methode können Zellen gezwungen werden sich an bestimmten Orten einzufinden, zu klärende Aspekte sind aber die Kreuzreaktivität der Antikörper-Heterodimer-MSC mit anderen Strukturen im Körper sowie die Überlebensfähigkeit dieser Zellen, da sie primär durch Antikörperbindung an bestimmte Orte gebunden werden und nur eventuell erst sekundär mit Integrinen andocken, die zum Überleben der Zellen beitragen [7, 10].

Zwei sehr interessante Ansätze, die vor allem im Bereich der Implantationsmedizin neue Wege bahnen könnten, sollen hier näher beschrieben werden.

Der erste Ansatz nutzt das als RAD16-I bezeichnete Peptid mit der Struktur AcN-RADA RADA RADA RADA-CONH<sub>2</sub> [76]. In physiologischen Lösungen kommt es bei Anwesenheit von Kationen zur Selbstassemblierung dieser Peptide zu einem dreidimensional verflochtenen Nanofasengerüst, das über 99% Wasser enthält [76]. Zu beachten ist hier das RAD-Motiv (Arginin-Alanin-Aspartat), das aus hydrophatischer Sicht dem RGD-Motiv (Arginin-Glycin-Aspartat) ähnelt [57]. Letzteres wird von vielen Integrinen gebunden [58]. Das so entstandene, Puramatrix genannte 3D-Gerüst wurde mit MSC versetzt, die effizient in die Matrix migrierten, längs der Matrixfasern wuchsen und innerhalb einer Woche ein stabiles, fibröses Gerüst bildeten [71]. Hierbei sezernierten die MSC stark EZM-Moleküle, was dem Kultursystem eine physiologisch relevante Dimension hinzufügte [71]. Nach 7 Tagen wurden hämatopoetische Stammzellen (HSC) in die MSC-Kulturen ausgesät [71]. Die HSC wuchsen innerhalb einer weiteren Woche stark in den Interzellularräumen des 3D-Gerüsts ein und bildeten große, kompakte Cluster [71].

Die RADA16-I-Peptide (Ac(RADA)<sub>4</sub>CONH<sub>2</sub>) können durch direkte Kopplung kurzer biologisch aktiver Motive erweitert werden, um bestimmte Wirkungen auf Zellen auszuüben [77].

Das osteogene Wachstumspeptid-Motiv ALKR QGRT LYGF GG, für die in vitro-Förderung der Differenzierung und Proliferation von Präosteoblasten zu Knochenzellen bekannt, wurde folgendermaßen in RADA16-I integriert: Ac(RADA)<sub>4</sub> GG ALKR QGRT LYGF CONH<sub>2</sub> [77]. Andere Erweiterungen beinhalteten das Osteopontin Zelladhäsionsmotiv DG RGD SVAYG (Ac(RADA)<sub>4</sub> GG DG RGD SVAYG CONH<sub>2</sub>) oder das Motiv PRGD SGY RGDS (Ac(RADA)<sub>4</sub> GP RGD SGY RGDS CONH<sub>2</sub>) [77]. Die daraus entstehenden Gerüste waren für Knochenzellen besser geeignet als reine RADA16-Gerüste, indem sie die Zellproliferation stärker förderten [77].

Ein anderer Weg dreidimensionale Gerüste für Zellkulturen zu erstellen wird durch 3-D Life Hydrogel-Systeme eingeschlagen [78]. Es handelt sich um Zwei-Komponenten-Systeme, bestehend aus Maleimid-funktionalisierten Polymeren und Thiol-funktionalisierten Crosslinkern, die durch Quervernetzung ein Gel bilden, wobei das Zusammenfügen der Komponenten auch in Anwesenheit von Zellen geschehen kann [78]. Die Funktionalisierung von Polymeren wie Polyvinylalkohol (PVA) oder Dextran mit Maleimidgruppen ermöglicht Crosslinking sowie den Einsatz bioaktiver Faktoren [78]. PVA-Polymer-Hydrogele sind degradationsstabil, während Dextranhydrogele durch das Enzym Dextranase z.B. zwecks Zellisolierung aufgelöst werden können [78]. Durch den degradationsstabilen Linker PEG-Link, der aus linearem Polyethylenglycol mit einer Thiol-(SH)-Gruppe an jedem Ende besteht, können die Polymere quervernetzt werden [78]. Dies liegt daran, dass Thiolgruppen mit Maleimidgruppen unter physiologischen Bedingungen stabile Thioether-Verbindungen bilden, woraus große Polymer-Crosslinker-Netzwerke entstehen [78]. Alternativ kommt das PEG-Link-Derivat CD-Link zum Einsatz, das zusätzlich ein Matrix-Metalloprotease-spaltbares Peptid enthält [78]. Zellen mit den nötigen Enzymen können dann den Crosslinker spalten, was dann im Gel bei Präsenz von Adhäsionsfaktoren zur Migration und Verbreitung der Zellen führen kann [78].

Vor der Quervernetzung zum Gel können Peptide als bioaktive Faktoren kovalent an Maleimidgruppen der Maleimid-Polymere angehängt werden [78]. Die hierzu benötigte Thiolgruppe kann während der Peptidsynthese durch Ergänzen eines Cysteinrestes erfolgen [78]. Um die Oxidationsrate der Thiolgruppe herabzusetzen kann am Amino-Terminus des Peptides eine Acetylgruppe benutzt werden, um die positive Ladung des freien Amino-Terminus aufzuheben [78]. Positiv geladene Aminosäuren in der unmittelbaren Nähe von Thiolgruppen sollten vermieden werden, dies kann durch Einsatz von Spacern erfolgen [78].

Diese Empfehlungen zur Peptidmodifizierung finden sich in den in dieser Dissertation untersuchten 8 modifizierten Peptiden in Form der Strukturierung

"Peptid-zwei Spacer-Cystein-Acetylgruppe" wieder, weswegen sie direkt kompatibel mit den 3-D Life Hydrogel-Systemen sind.

Der auch gleichzeitig mögliche Einsatz der unauflösbaren und auflösbaren Komponenten der Gele eröffnet das Potential, Gewebsmodelle oder organotypische Zellkulturen zu erstellen [78].

**Kapitel 5: Schlussfolgerung und Ausblick**

Die gängige Kryokonservierungsmethode mit Stickstoff beeinträchtigt in relevantem Maße die untersuchten Zellen, es sollten zellschonendere Vorgehensweisen mit gleichmäßiger Kühlungsrate bevorzugt werden. Der Einsatz von hMSC sollte die vorige Verifizierung dieser Zellen beinhalten. In diesem Zusammenhang wurde Knochenmark als hMSC-Quelle bestätigt, die Bildung von non-hMSC-Subpopulationen selbst in hMSC-positiven Kulturen fordert aber engmaschige Kontrollen zwecks Sicherstellung von Qualitätsansprüchen. Zellen aus Plazentagewebe nach Entfernung von Nabelschnur und Amnionepithel werden als non-hMSC eingestuft. Im Kontext der hier untersuchten Zellen aus Knochenmark und Plazenta eignen sich Peptid 15 und Peptid 17 zur hMSC-Trennung von non-hMSC. Dieses Trennverfahren birgt das Potential schnell, einfach, relativ kostengünstig und qualitativ gut hMSC aus Geweben zu gewinnen.

Peptid 14 bindet unspezifisch, aber in diesen Untersuchungen stets sowohl hMSC als auch non-hMSC mit 100% Anhaftungsrate. Es erfüllt somit die Aufgabe eines allgemein haftungsermöglichenden Peptides für die untersuchten Zellen.

Peptid 7 birgt von allen 8 untersuchten Peptiden das größte Potential, durch molekulares Design Ausgangspunkt für eine hMSC-spezifische Anhaftungsstruktur zu werden. Für diese Aufgabe ist die Vermutung relevant, dass innerhalb einer Peptidsequenz eine Domäne hydrophiler Hydropathietendenz als Voraussetzung für die Erstellung einer potentiell anhaftungsermöglichenden Peptidsequenz wahrscheinlich ist.

Die untersuchten Peptide sind in der Anwendung kompatibel mit 3D-Gerüstsystemen wie Puramatrix oder 3D Life Hydrogel. Dies ist eine gute Voraussetzung für die Erforschung und Entwicklung biomimetischer, dreidimensionaler Konstrukte bis hin zu Organen. Hierbei dient das Gelgerüst an sich der Formgebung, Peptid 14 der allgemeinen Zellanhaftung, potentielle

Peptid 7-Derivate der spezifischen hMSC-Anhaftung, sodass 3D-Kulturen gleichzeitig und gleich zu Beginn der Kultur mit hMSC für grundlegende Gerüstfunktionalität und non-hMSC im Sinne von Parenchymbildung möglich werden, sowie der Einsatz von Peptid 15 und 17 zur Eingrenzung von hMSC-Gebilden.

Zusammenfassend bietet also das Peptidset 7, 14, 15 und 17 die Möglichkeit, zur Weiterentwicklung der Implantationsmedizin wesentlich beizutragen.

## Kapitel 6: Zusammenfassung

### Fragestellung

Ziel dieser Dissertation ist die Untersuchung der Beeinflussbarkeit der Positionierung von hMSC auf Strukturen durch ihr Bindungsverhalten an minimalen Erkennungssequenzen aus makromolekularen Integrinliganden. Hierbei handelt es sich um 8 in Vorstudien präselektierte Peptide mit Ursprung aus Collagen, Fibronectin oder Laminin. Aus den Ergebnissen sollen mögliche Applikationen zur gezielt kontrollierten Nutzbarmachung von hMSC abgeleitet werden. Außerdem wird die Kryokonservierung auf mögliche Auswirkungen auf das Zellverhalten untersucht, um die Möglichkeiten von Zellagerung und Transport abzuschätzen.

### Methodik

Die Peptide werden modifiziert mit aktiviertem BSA als Trägermolekül konjugiert, aufgereinigt und durch LDS-PAGE validiert.

Zellen werden aus Knochenmarkproben und Plazenta kultiviert und durch adhärentes Wachstum, Differenzierungsfähigkeit und Oberflächenmarkerprofil als hMSC validiert. Anhaftungsversuche mit den Peptidkonjugaten werden mit Zellen der 2. Passage durchgeführt. Zusätzlich werden Zellen der Knochenmark- und Plazentaproben kryokonserviert und nach Rekultivierung soweit möglich ebenfalls Anhaftungsversuchen unterzogen.

### Ergebnisse

Die erfolgreiche Konjugation konnte bei allen 8 Peptiden bestätigt werden. Sowohl Knochenmarks- als auch Plazentazellen zeigen während der Zellkultur Anhaftungsfähigkeit auf sowie ein hMSC-kompatibles Oberflächenmarkerprofil. Plazentazellen sind jedoch weder osteogen noch adipogen differenzierungsfähig. Bei den Anhaftungsversuchen unterscheidet sich das Anhaftungsprofil von Knochenmarkszellen deutlich von dem von Plazentazellen. Kryokonservierung führt zum Teil zu Zelltod, zum Teil zu Verlust

der Anhaftungs- und Proliferationsfähigkeit. Einige kryokonservierte Zellen überleben und behalten diese zwei Fähigkeiten, ihr Anhaftungsprofil stimmt in deutlich abgeschwächter Form mit demjenigen nicht kryokonservierter Zellen desselben Ursprungsgewebes größtenteils überein.

### Diskussionsergebnisse

Die gängige Kryokonservierungsmethode mit flüssigem Stickstoff beeinträchtigt in relevantem Maße die untersuchten Zellen, es sollten zellschonendere Vorgehensweisen mit gleichmäßiger Kühlungsrate bevorzugt werden. Knochenmarkszellen wurden als hMSC verifiziert, Zellen aus Plazentagewebe nach Entfernung von Nabelschnur und Amnionepithel sind non-hMSC. Im Kontext der hier untersuchten Gewebe bieten die Peptide 15 und 17 das Potential, diese zwei Zellarten schnell, einfach, relativ kostengünstig und qualitativ gut zu unterscheiden; Peptid 14 erfüllt die Aufgabe eines allgemein haftungsermöglichenden Peptides; Peptid 7 birgt von den 8 untersuchten Peptiden das größte Potential Ausgangspunkt für eine hMSC-spezifische Anhaftungsstruktur zu werden. Die untersuchten Peptide sind in der Anwendung kompatibel mit 3D-Gerüstsystemen. Dies ist eine gute Voraussetzung für die Erforschung und Entwicklung biomimetischer, dreidimensionaler Konstrukte bis hin zu Organen.

### Schlussfolgerung

Das Peptidset 7, 14, 15 und 17 bietet die Möglichkeit, zur Weiterentwicklung der Implantationsmedizin wesentlich beizutragen.

### Danksagung

Im Rahmen meiner Doktorarbeitszeit durfte ich Prof. Dr. rer. nat. Wilhelm K. Aicher als fachlich äußerst versierten und engagierten Wissenschaftler kennenlernen. Das familiäre Arbeitsklima, dass durch ihn als Leiter der Arbeitsgemeinschaft ermöglicht wurde, trug wesentlich zur zügigen und effizienten Bewältigung der Studie bei. Hiermit bedanke ich mich für die vorbildliche Betreuung.

Danken möchte ich auch Dr. Brigitte Angres und Dr. Helmut Wurst für die äußerst wichtigen und informativen Besprechungen, die ich mit ihnen führen durfte.

Tanja Abruzzese, Elisabeth Kienzle, Christine Ulrich, Stephanie Zug, Dr. Miriam Rothdiener und Dr. Tino Felka danke ich für die gleichzeitig professionelle, hilfsbereite und sympathische Zusammenarbeit.

Mein Dank geht an die Ärzte und Mitarbeiter der Orhopädischen Universitätsklinik, der BG Unfallklinik und der Frauenklinik Tübingen für die Bereitstellung der Gewebeproben.

**Kongressbeitrag**

Lorenzo Roncoroni, Jan Maerz, Tanja Abruzzese, Stephanie Zug, Melanie I.  
Hart, Bernd Rolaufts, Gerd Klein, Wilhelm K. Aicher

**Adhesion to extracellular matrix-derived peptides can differentiate  
between human bone marrow derived mesenchymal stem cells and MSC-  
like pericytes**

International Conference on Tissue Science and Engineering, Omics Group,  
October 1-3, 2012 DoubleTree by Hilton Chicago-North Shore, USA

### **Publikation**

Roncoroni LP, Maerz JK, Angres B, Steuer H, Benz K, Abruzzese T, Hart ML,  
Rolauffs B, Klein G, Stoll D, Aicher WK (2013)

(Lorenzo P. Roncoroni und Jan K. März haben in gleichem Maße zu dieser  
Studie beigetragen und teilen somit die Erstautorenschaft.)

### **Adhesion to Extracellular Matrix Proteins can Differentiate between Human Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells and Fibroblasts**

Journal of Tissue Science & Engineering 2013

#### Zitierung:

Roncoroni LP, Maerz JK, Angres B, Steuer H, Benz K, et al. (2013)  
Adhesion to Extracellular Matrix Proteins can Differentiate between Human  
Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells and Fibroblasts.  
J Tissue Sci Eng S11: 008. doi:10.4172/2157-7552.S11-008

### Literaturverzeichnis

1. Strachan, T. and A.P. Read (2005) *Molekulare Humangenetik, 3. Auflage*. Seite 80-98. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
2. Schartl, M., M. Gessler, and A. von Eckardstein (2009) *Biochemie und Molekularbiologie des Menschen*. Seite 580-593, 678, 935,945. Elsevier GmbH, Urban & Fischer, München.
3. Nyberg, P., et al. (2008) *Characterization of the anti-angiogenic properties of arresten, an alpha1beta1 integrin-dependent collagen-derived tumor suppressor*. Exp Cell Res. **314**(18): p. 3292-305.
4. Sudhakar, A., et al. (2005) *Human alpha1 type IV collagen NC1 domain exhibits distinct antiangiogenic activity mediated by alpha1beta1 integrin*. J Clin Invest. **115**(10): p. 2801-10.
5. Colorado, P.C., et al. (2000) *Anti-angiogenic cues from vascular basement membrane collagen*. Cancer Res. **60**(9): p. 2520-6.
6. Yi, M. and E. Ruoslahti (2001) *A fibronectin fragment inhibits tumor growth, angiogenesis, and metastasis*. Proc Natl Acad Sci U S A. **98**(2): p. 620-4.
7. You, R., et al. (2009) *Regulation of p38 MAP kinase by anastellin is independent of anastellin's effect on matrix fibronectin*. Matrix Biol. **28**(2): p. 101-9.
8. Ambesi, A., et al. (2005) *Anastellin, a fragment of the first type III repeat of fibronectin, inhibits extracellular signal-regulated kinase and causes G(1) arrest in human microvessel endothelial cells*. Cancer Res. **65**(1): p. 148-56.
9. Plow, E.F., et al. (2000) *Ligand binding to integrins*. J Biol Chem. **275**(29): p. 21785-8.
10. Berrier, A.L. and K.M. Yamada (2007) *Cell-matrix adhesion*. J Cell Physiol. **213**(3): p. 565-73.
11. Zhang, K. and J. Chen (2012) *The regulation of integrin function by divalent cations*. Cell Adh Migr. **6**(1): p. 20-9.
12. Bommas-Ebert, U., P. Teubner, and R. Voß (2011) *Kurzlehrbuch Anatomie und Embryologie, 3. Auflage*. Seite 40, 41, 453 - 455. Georg Thieme Verlag Stuttgart.

13. Rohen, J.W. and E. Lütjen-Drecoll (2012) *Funktionelle Embryologie, 4. Auflage*. Seite 31-50, 171. Schattauer GmbH Stuttgart.
14. Aicher, W.K., et al. (2011) *Regeneration of cartilage and bone by defined subsets of mesenchymal stromal cells--potential and pitfalls*. *Adv Drug Deliv Rev.* **63**(4-5): p. 342-51.
15. Burr, S.P., F. Dazzi, and O.A. Garden (2013) *Mesenchymal stromal cells and regulatory T cells: the Yin and Yang of peripheral tolerance?* *Immunol Cell Biol.* **91**(1): p. 12-8.
16. Opitz, C.A., et al. (2009) *Toll-like receptor engagement enhances the immunosuppressive properties of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by inducing indoleamine-2,3-dioxygenase-1 via interferon-beta and protein kinase R*. *Stem Cells.* **27**(4): p. 909-19.
17. Francois, M., et al. (2012) *Cryopreserved mesenchymal stromal cells display impaired immunosuppressive properties as a result of heat-shock response and impaired interferon-gamma licensing*. *Cytotherapy.* **14**(2): p. 147-52.
18. Sioud, M. (2011) *New insights into mesenchymal stromal cell-mediated T-cell suppression through galectins*. *Scand J Immunol.* **73**(2): p. 79-84.
19. Francois, M., et al. (2012) *Human MSC suppression correlates with cytokine induction of indoleamine 2,3-dioxygenase and bystander M2 macrophage differentiation*. *Mol Ther.* **20**(1): p. 187-95.
20. Hass, R., et al. (2011) *Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC*. *Cell Commun Signal.* **9**: p. 12.
21. Sensebe, L., M. Gadelorge, and S. Fleury-Cappellesso (2013) *Production of mesenchymal stromal/stem cells according to good manufacturing practices: a review*. *Stem Cell Res Ther.* **4**(3): p. 66.
22. Dominici, M., et al. (2006) *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. *Cytotherapy.* **8**(4): p. 315-7.

23. Smith, S.J., et al. (2012) *CD105 (Endoglin) exerts prognostic effects via its role in the microvascular niche of paediatric high grade glioma*. *Acta Neuropathol.* **124**(1): p. 99-110.
24. Rau, K.M., et al. (2012) *Neovascularization evaluated by CD105 correlates well with prognostic factors in breast cancers*. *Exp Ther Med.* **4**(2): p. 231-236.
25. Gromova, P., et al. (2012) *ENDOGLIN/CD105 is expressed in KIT positive cells in the gut and in gastrointestinal stromal tumours*. *J Cell Mol Med.* **16**(2): p. 306-17.
26. Rosu-Myles, M., et al. (2010) *Non-multipotent stroma inhibit the proliferation and differentiation of mesenchymal stromal cells in vitro*. *Cytotherapy.* **12**(6): p. 818-30.
27. Sanchez-Elsner, T., et al. (2002) *Endoglin expression is regulated by transcriptional cooperation between the hypoxia and transforming growth factor-beta pathways*. *J Biol Chem.* **277**(46): p. 43799-808.
28. Zhang, Y., et al. (2012) *Positron emission tomography and optical imaging of tumor CD105 expression with a dual-labeled monoclonal antibody*. *Mol Pharm.* **9**(3): p. 645-53.
29. Wang, L., et al. (2013) *Graft-versus-host disease is enhanced by selective CD73 blockade in mice*. *PLoS One.* **8**(3): p. e58397.
30. Niemela, J., et al. (2008) *IFN-beta regulates CD73 and adenosine expression at the blood-brain barrier*. *Eur J Immunol.* **38**(10): p. 2718-26.
31. Schubert, K., et al. (2011) *Thy-1 (CD90) regulates the extravasation of leukocytes during inflammation*. *Eur J Immunol.* **41**(3): p. 645-56.
32. Jin, J., et al. (2012) *HIV-1 Tat-induced microglial activation and neuronal damage is inhibited via CD45 modulation: A potential new treatment target for HAND*. *Am J Transl Res.* **4**(3): p. 302-15.
33. Kuban-Jankowska, A., et al. (2012) *Activation of hydrogen peroxide to peroxytetradecanoic acid is responsible for potent inhibition of protein tyrosine phosphatase CD45*. *PLoS One.* **7**(12): p. e52495.

34. Trempus, C.S., et al. (2003) *Enrichment for living murine keratinocytes from the hair follicle bulge with the cell surface marker CD34*. *J Invest Dermatol.* **120**(4): p. 501-11.
35. Sehmi, R., et al. (1997) *Allergen-induced increases in IL-5 receptor alpha-subunit expression on bone marrow-derived CD34+ cells from asthmatic subjects. A novel marker of progenitor cell commitment towards eosinophilic differentiation*. *J Clin Invest.* **100**(10): p. 2466-75.
36. Blomkalns, A.L., et al. (2013) *CD14 directs adventitial macrophage precursor recruitment: role in early abdominal aortic aneurysm formation*. *J Am Heart Assoc.* **2**(2): p. e000065.
37. Zhao, Z., et al. (2007) *CD14 mediates cross talk between mononuclear cells and fibroblasts for upregulation of matrix metalloproteinase 9 by Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun.* **75**(6): p. 3062-9.
38. Bertrand, F.E., 3rd, et al. (1997) *Ig D(H) gene segment transcription and rearrangement before surface expression of the pan-B-cell marker CD19 in normal human bone marrow*. *Blood.* **90**(2): p. 736-44.
39. Bieback, K., S. Kinzebach, and M. Karagianni (2011) *Translating research into clinical scale manufacturing of mesenchymal stromal cells*. *Stem Cells Int.* **2010**: p. 193519.
40. Guillot, P.V., et al. (2008) *Intrauterine transplantation of human fetal mesenchymal stem cells from first-trimester blood repairs bone and reduces fractures in osteogenesis imperfecta mice*. *Blood.* **111**(3): p. 1717-25.
41. Horwitz, E.M., et al. (2002) *Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**(13): p. 8932-7.
42. Muller, I., et al. (2008) *Secretion of angiogenic proteins by human multipotent mesenchymal stromal cells and their clinical potential in the treatment of avascular osteonecrosis*. *Leukemia.* **22**(11): p. 2054-61.
43. Baker, B.M. and R.L. Mauck (2007) *The effect of nanofiber alignment on the maturation of engineered meniscus constructs*. *Biomaterials.* **28**(11): p. 1967-77.

44. Saliken, D.J., et al. (2012) *Decreased hypertrophic differentiation accompanies enhanced matrix formation in co-cultures of outer meniscus cells with bone marrow mesenchymal stromal cells*. *Arthritis Res Ther.* **14**(3): p. R153.
45. Ra, J.C., et al. (2011) *Stem cell treatment for patients with autoimmune disease by systemic infusion of culture-expanded autologous adipose tissue derived mesenchymal stem cells*. *J Transl Med.* **9**: p. 181.
46. Weng, J.Y., et al. (2010) *Mesenchymal stem cell as salvage treatment for refractory chronic GVHD*. *Bone Marrow Transplant.* **45**(12): p. 1732-40.
47. von Bonin, M., et al. (2009) *Treatment of refractory acute GVHD with third-party MSC expanded in platelet lysate-containing medium*. *Bone Marrow Transplant.* **43**(3): p. 245-51.
48. *Fachliche Beratung durch Prof. Dr. rer. nat. Wilhelm K. Aicher und Dr. Brigitte Angres (Cellendes, Reutlingen, D).*
49. *Gemäß SOP im Labor AG Aicher.*
50. Schmitz, S. (2011) *Der Experimentator Zellkultur, 3. Auflage*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg: p. 192-202, 206, 238.
51. Anderson, J.M., et al. (2009) *Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells directed by extracellular matrix-mimicking ligands in a biomimetic self-assembled peptide amphiphile nanomatrix*. *Biomacromolecules.* **10**(10): p. 2935-44.
52. Vater, C., P. Kasten, and M. Stiehler (2011) *Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells*. *Acta Biomater.* **7**(2): p. 463-77.
53. Mollenhauer, J., et al. (2010) *Injectable biocompatible composition*. Patent Application Publication. Portland OR 97204 (US).
54. *Fachliche Beratung durch Prof. Dr. rer. nat. Wilhelm K. Aicher und Dr. Helmut Wurst (Cellendes, Reutlingen, D).*
55. *BIORAD DC Protein Assay Instruction Manual*. Bulletin #LIT448.
56. (2012-2013) *Zell- und Gewebekultur*. Greiner Bio-One Product Catalogue 2012-2013/Kapitel 1 D.
57. Löffler, G., P.E. Petrides, and P.C. Heinrich (2007) *Biochemie & Pathobiochemie, 8. Auflage*. Seite 46-47. Springer Medizin Verlag Heidelberg.

58. Minuth, W.W., R. Strehl, and K. Schumacher (2005) *Tissue Engineering-Essentials for Daily Laboratory Work*. Wiley-VHC Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim: p. 45.
59. Hasselbach, F., S. Jauerneck, and P. Sonnentag (2007) *Versuchsanleitung zum Physikalischen Praktikum für Mediziner und Zahnmediziner*. Seite 16-18. Institut für Angewandte Physik der Universität Tübingen.
60. Bieback, K., et al. (2004) *Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood*. *Stem Cells*. **22**(4): p. 625-34.
61. Prockop, D.J. (2009) *Repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs): controversies, myths, and changing paradigms*. *Mol Ther*. **17**(6): p. 939-46.
62. Yannarelli, G., et al. (2013) *Brief report: The potential role of epigenetics on multipotent cell differentiation capacity of mesenchymal stromal cells*. *Stem Cells*. **31**(1): p. 215-20.
63. Harichandan, A. and H.J. Buhring (2011) *Prospective isolation of human MSC*. *Best Pract Res Clin Haematol*. **24**(1): p. 25-36.
64. Pieters, B.J., et al. (2010) *Inhaled Anesthetics Promote Albumin Dimerization through Reciprocal Exchange of Subdomains*. *Biochem Res Int*. **2010**: p. 516704.
65. Kollar, K., et al. (2009) *Molecular mechanisms involved in mesenchymal stem cell migration to the site of acute myocardial infarction*. *Int J Cell Biol*. **2009**: p. 904682.
66. Fischer, U.M., et al. (2009) *Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: the pulmonary first-pass effect*. *Stem Cells Dev*. **18**(5): p. 683-92.
67. Eggenhofer, E., et al. (2012) *Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion*. *Front Immunol*. **3**: p. 297.
68. Quimby, J.M., et al. (2013) *Safety and efficacy of intravenous infusion of allogeneic cryopreserved mesenchymal stem cells for treatment of chronic kidney disease in cats: results of three sequential pilot studies*. *Stem Cell Res Ther*. **4**(2): p. 48.

69. Lu, S.S., et al. (2013) *In vivo MR imaging of intraarterially delivered magnetically labeled mesenchymal stem cells in a canine stroke model*. PLoS One. **8**(2): p. e54963.
70. Gundlach, C.W.t., et al. (2011) *Synthesis and evaluation of an anti-MLC1 x anti-CD90 bispecific antibody for targeting and retaining bone-marrow-derived multipotent stromal cells in infarcted myocardium*. Bioconjug Chem. **22**(8): p. 1706-14.
71. Sharma, M.B., L.S. Limaye, and V.P. Kale (2012) *Mimicking the functional hematopoietic stem cell niche in vitro: recapitulation of marrow physiology by hydrogel-based three-dimensional cultures of mesenchymal stromal cells*. Haematologica. **97**(5): p. 651-60.
72. Yang, S., et al. (2013) *Does pretreatment of bone marrow mesenchymal stem cells with 5-azacytidine or double intravenous infusion improve their therapeutic potential for dilated cardiomyopathy?* Med Sci Monit Basic Res. **19**(1): p. 20-31.
73. Lee, R.H., et al. (2009) *The CD34-like protein PODXL and alpha6-integrin (CD49f) identify early progenitor MSCs with increased clonogenicity and migration to infarcted heart in mice*. Blood. **113**(4): p. 816-26.
74. Bexell, D., et al. (2012) *Rat multipotent mesenchymal stromal cells lack long-distance tropism to 3 different rat glioma models*. Neurosurgery. **70**(3): p. 731-9.
75. Walczak, P., et al. (2008) *Dual-modality monitoring of targeted intraarterial delivery of mesenchymal stem cells after transient ischemia*. Stroke. **39**(5): p. 1569-74.
76. Chen, J., et al. (2013) *Enhanced osteogenesis of human mesenchymal stem cells by periodic heat shock in self-assembling peptide hydrogel*. Tissue Eng Part A. **19**(5-6): p. 716-28.
77. Horii, A., et al. (2007) *Biological designer self-assembling peptide nanofiber scaffolds significantly enhance osteoblast proliferation, differentiation and 3-D migration*. PLoS One. **2**(2): p. e190.
78. (März 2012) *3-D Life Hydrogels User Guide, Version 3.4.1*. Cellendes GmbH, 72770 Reutlingen, Germany.