

**Vergleich des osteogenen Differenzierungspotenzials  
von AdMSCs verschiedener Körperregionen**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von:**

**Arnold, Sigrid Annette**

**2016**

Dekan: Professor Dr. I.B. Autenrieth  
1. Berichterstatter: Professor Dr. A. Nüssler  
2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. D. Alexander-Friedrich

Meinen Eltern

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>VI</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Überblick Stammzellen.....	1
1.2 Mesenchymale Stammzellen (MSCs) .....	3
1.3 Stammzellen und ihre Regulation .....	4
1.4 Stammzellmarker .....	5
1.5 Nutzung mesenchymaler Stammzellen in der Therapie.....	7
1.6 Knochengewebe und mesenchymale Stammzellen.....	8
1.7 Fettgewebe .....	12
1.8 Zielsetzung und Versuchsaufbau .....	12
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>14</b>
2.1 Materialien .....	14
2.1.1 Chemikalienliste .....	14
2.1.2 Verbrauchs- und Gebrauchsmaterial.....	16
2.1.3 Geräteliste.....	17
2.1.4 Software .....	18
2.2 Methoden.....	19
2.2.1 Isolierung humaner Fettstammzellen (Ad-MSCs).....	19
2.2.2 Kultivierung humaner Fettstammzellen .....	20
2.2.3 Osteogene Differenzierung der Ad-MSCs .....	21
2.2.4 Von Kossa Färbung.....	22
2.2.5 Alizarin Rot Färbung.....	23

2.2.6	<i>Aktivitäts-Bestimmung der Alkalischen Phosphatase</i> .....	25
2.2.7	<i>Sulforhodamin B (SRB) Protein Färbung</i> .....	27
2.2.8	<i>PCR</i> .....	28
2.2.9	<i>Isolierung von RNS mittels TriFast</i> .....	28
2.2.10	<i>Verdau der genomischen DNS mit DNase I</i> .....	29
2.2.11	<i>RNS Integritätscheck</i> .....	30
2.2.12	<i>Herstellung von cDNS</i> .....	31
2.2.13	<i>Bestimmung der Genexpression durch Real-Time PCR</i> .....	32
2.2.14	<i>Hämatoxylin-Eosin Färbung</i> .....	33
2.2.15	<i>Statistische Auswertung</i> .....	33
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>35</b>
3.1	<i>Charakterisierung des Adipozytengewebes durch HE-Färbung</i> ..	36
3.2	<i>Aktivitätsbestimmung der alkalischen Phosphatase</i> .....	38
3.2.1	<i>Bestimmung der AP-Aktivität vor Differenzierung</i> .....	38
3.2.2	<i>Bestimmung der AP-Aktivität nach Differenzierung</i> .....	40
3.3	<i>Matrixfärbungen</i> .....	41
3.4	<i>Genexpression der STZ-Marker vor osteogener Differenzierung</i>	50
3.5	<i>Zusammenfassung der Ergebnisse</i> .....	53
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>54</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>61</b>
<b>6</b>	<b>Veröffentlichungen</b> .....	<b>62</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>64</b>
<b>8</b>	<b>Eigenständigkeitserklärung</b> .....	<b>69</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>70</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

Ad-MSCs	Adipozyten-Mesenchymale Stammzellen
AP	Alkalische Phosphatase
BGP	$\beta$ -Glyzerol-Phosphate
BMP	Bone morphogenetic protein
B-MSCs	Bone–Mesenchymal stem cells (mesenchymale SZ des Knochenmarks)
cDNA	komplementäre DNA
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethyldicarbonat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DOC	Desoxycholsäure
DZ	Dendritische Zelle
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ES	Embryonale Stammzelle
EtOH	Ethanol
EZM	Extrazellulärmatrix
FCS	Fetales Kälberserum
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure
HSC	Hämatopoetische Stammzelle
iPSC	induzierte pluripotente Stammzellen
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Natriumcarbonat
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Natriumthiosulfat
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Sodium orthovanadate
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Sodium fluoride
NaOH	Natriumhydroxid
OD	Optische Dichte

## Inhaltsverzeichnis

---

PCR	Polymerasekettenreaktion
PI	Pixel Intensität
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pNP	4-Nitrophenol
pNPP	Para-Nitrophenylphosphat
RNS	Ribonukleinsäure
STZ	Stammzellen
STZ-Marker	Stammzellmarker
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Entwicklungsmöglichkeiten einer totipotenten Stammzelle, .....	3
Abbildung 2: Entwicklung mesenchymaler Stammzellen .....	4
Abbildung 3: Mesenchymale Stammzellen.....	13
Abbildung 4, Standardkurve Alizarin Rot, .....	25
Abbildung 5: Standardkurve der AP-Aktivität .....	27
Abbildung 6: Mit Hämatoxylin-Eosin gefärbtes Fettgewebe .....	36
Abbildung 7: Ad-MSCs in Passage 3 während der Zellkultur.. .....	37
Abbildung 8: Aktivitätsbestimmung der AP-Aktivität vor Differenzierung. ....	39
Abbildung 9: AP-Aktivität nach osteogener Differenzierung. ....	40
Abbildung 10: Die AP-Aktivität vor und nach osteogener Differenzierung.....	41
Abbildung 11: Von Kossa Färbung von Oberschenkel, Flanke und Abdomen vor osteogener Differenzierung. ....	42
Abbildung 12: Von Kossa Färbung, Tag 16.....	42
Abbildung 13: Matrix Mineralisierung nach osteogener Differenzierung.....	43
Abbildung 14: Vergleich der Matrix- Mineralisierung von Tag 0 und 14 sowie zwischen den einzelnen Körperregionen.....	44
Abbildung 15: Alizarin Rot Färbungen.....	45
Abbildung 16: Alizarin Rot Färbung.....	46
Abbildung 17: Alizarin Rot Färbung nach osteogener Differenzierung. ....	47
Abbildung 18: Mineralisierung der Regionen Flanke/Hüfte, Oberschenkel und Abdomen vor und nach osteogener Differenzierung. ....	48
Abbildung 19: Von Kossa und Alizarin Rot Färbung.....	49
Abbildung 20: Genexpression des Stammzellmarkers Nanog vor Beginn der Differenzierung. ....	50
Abbildung 21: Genexpression des Stammzellmarkers Oct-4 vor Beginn der Differenzierung. ....	51
Abbildung 22: Genexpression des Stammzellmarkers Sox-2 vor Beginn der Differenzierung. ....	52

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Schema für den Ablauf der Experimente .....	13
Tabelle 2: Ausplattierungsschema der Ad-MSCs .....	22
Tabelle 3: PCR-Zyklus .....	32
Tabelle 4: Verwendete Primersequenzen der PCR.....	32
Tabelle 5: Spenderübersicht der Ad-MSCS .....	35

## 1 Einleitung

*„Tir Nan Og“ – altirisch; das Land der ewigen Jugend*

Dieses fiktive Land, das namensgebend für den Stammzellfaktor Nanog war, wäre wohl der Traum eines jeden Menschen. Wie der Weg nach Tir Nan Og, der ein sehr beschwerlicher sein soll, ist auch die Stammzellforschung ein breites und kompliziertes Gebiet, für das viele Anstrengungen unternommen werden müssen. Mit der Forschung an Stammzellen wird auf unterschiedlichsten Wegen versucht, die ewige Jugend oder wenigstens einen guten Ersatz für defektes Gewebe zu schaffen.

Über den Einsatz embryonaler Stammzellen in der Forschung gibt es seit Jahren Debatten über die ethischen Probleme, die sich daraus ergeben. Nicht allein deshalb wurde nach Möglichkeiten gesucht, Stammzellen aus anderen Ressourcen zu gewinnen.

### 1.1 Überblick Stammzellen

Stammzellen sind undifferenzierte Zellen, die sich unbegrenzt vermehren, also sogenannte Tochterzellen bilden, oder sich weiter ausdifferenzieren können. Dabei unterscheidet man pluripotente Stammzellen, aus denen kein eigenständiger Organismus mehr entstehen kann, von totipotenten Stammzellen, aus denen dies möglich ist.

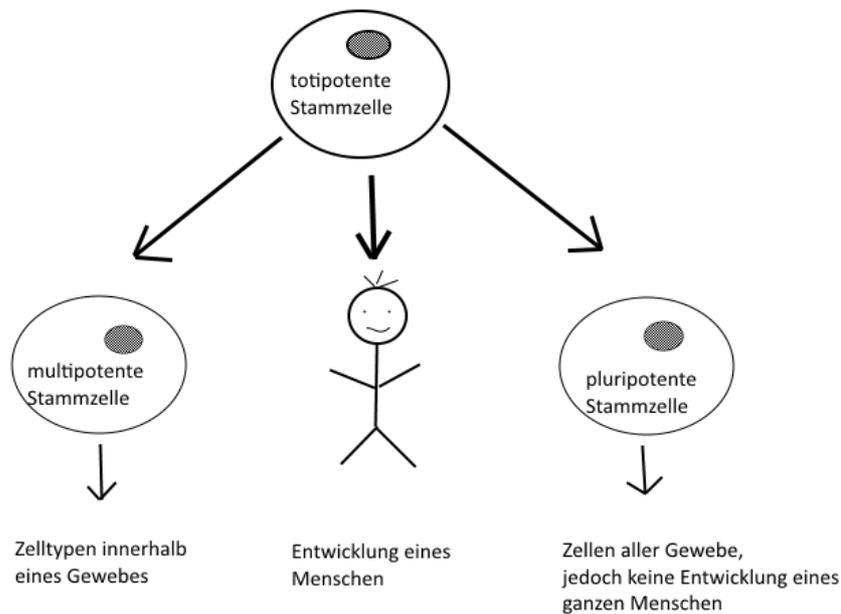
Zusätzlich teilt man Stammzellen nach ihrem Ursprungsort ein. Hierbei unterscheidet man zwischen embryonalen, fetalen und adulten Stammzellen. Embryonale Stammzellen (ES) sind Zellen des Embryoblasten, adulte Stammzellen (Adult Stem Cells, ASC) befinden sich in verschiedenen Organen und stellen dort den Zellersatz [1]. Fetale Stammzellen werden aus abgetriebenen Föten gewonnen und auch als primordiale Stammzellen bezeichnet [2].

Embryonale Stammzellen können sich in das Gewebe aller drei Keimblätter, also Meso-, Ekto- und Entoderm differenzieren. Aus dem Mesoderm wiederum können sich hämatopoetische Stammzellen entwickeln [3].

Adulte Stammzellen sind laut Definition Zellen, die unbeschränkt zur Selbstreplikation fähig sind und sich in Vorläuferzellen teilen können. Diese können sich durch Wachstums-, und Differenzierungsfaktoren in ausdifferenzierte Zellen entwickeln [4] [5].

Adulte Stammzellen kann man in zwei Typen einteilen, die sich in ihrem Ursprung und in ihrer Differenzierungskapazität unterscheiden. Zum einen gibt es die hämatopoetischen Stammzellen, die ihren Ursprung im Knochenmark haben. Der zweite Typ adulter Stammzellen sind mesenchymale Stammzellen, die sich in verschiedene Zelllinien des Mesoderms, also in Osteozyten, Chondrozyten, Adipozyten und Myozyten differenzieren können [3]. Des Weiteren findet man adulte Stammzellen ekto- und endodermalen Ursprungs in Leber, Gehirn, Herz, Epidermis, Pankreas, Nieren, Haut, Gefäßen und Muskeln [6].

Nachteil der adulten gegenüber den embryonalen Stammzellen ist die eingeschränkte Lebensdauer sowie die eingeschränkte Vermehrungsfähigkeit [2]. Durch den wissenschaftlichen Fortschritt in den letzten Jahren gibt es noch weitere, im Labor generierte pluripotente Stammzellen, die induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSC), die sich theoretisch auch zu jedem Zelltyp des Körpers differenzieren können [7].



**Abbildung 1: Entwicklungsmöglichkeiten einer totipotenten Stammzelle**, modifiziert nach Volker Henn, [www.Wissensschau.de](http://www.Wissensschau.de) [8]

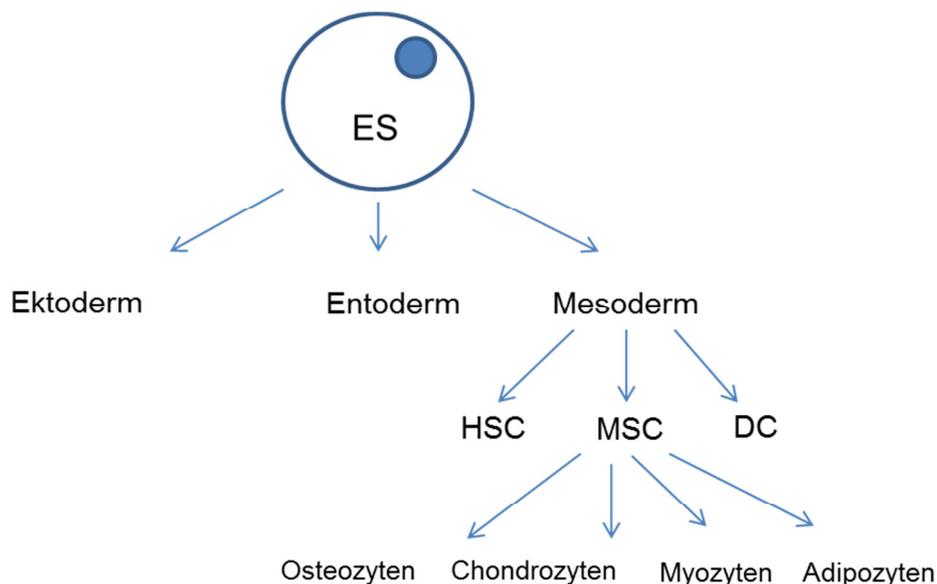
## 1.2 Mesenchymale Stammzellen (MSCs)

Mesenchym ist ein Synonym für embryonales Bindegewebe, das aus undifferenzierten Zellen besteht [9].

Bereits 1968 berichteten Friedenstein et al. über Fibroblasten-ähnliche Zellen, die aus Knochenmark gewonnen werden können. Er beschrieb diese Zellen als multipotente colony-forming unit fibroblasts (CFU-F) [10]. Inzwischen wurden die Zellen genauer erforscht und charakterisiert. MSCs sind multipotente adulte Stammzellen und stammen von embryonalem Mesenchym ab [11]. Sie liegen z.B. in Knochenmark, Nabelschnurblut, Fettgewebe und Muskeln vor und haben die Fähigkeit, sich innerhalb eines Gewebetyps zu verschiedenen Zellarten zu differenzieren [12]. MSCs dienen z.B. der Regeneration der Osteoblasten im Knochenstoffwechsel während des ständigen Knochenauf- und Abbaus sowie bei der Frakturheilung [13].

Von Dominici et al wurden 2006 Kriterien aufgestellt, die erfüllt sein müssen um Zellen als MSCs bezeichnen zu können:

In einer Standardkultur müssen die Zellen an Plastik haften können, sie müssen CD105, CD73 und CD90 exprimieren, dagegen dürfen CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79alpha, CD19 und HLA-DR-Oberflächen-Moleküle nicht exprimiert werden. Außerdem müssen sich MSCs *in vitro* zu Osteoblasten, Chondroblasten und Adipozyten differenzieren können [14].



**Abbildung 2: Entwicklung mesenchymaler Stammzellen:** ES (embryonale Stammzelle), HSC (hämatopoetische Stammzelle), MSC (mesenchymale Stammzelle), DC (dendritische Zelle)

### 1.3 Stammzellen und ihre Regulation

Adulte Stammzellen können sich entweder in spezialisierte Zellen entwickeln, oder sich selbst teilen und so den wichtigen Pool an pluripotenten Zellen erhalten. Unter dem Begriff der „Transdifferenzierung“ versteht man die Fähigkeit adulter Stammzellen, sich in Zellen eines anderen Gewebes zu entwickeln, als es eigentlich erwartet werden würde [15]. Welche von außen kommenden Signale Einfluss auf die Stammzellen haben ist bisher noch nicht genau geklärt. Bekannt ist jedoch der Einfluss sogenannter Stammzellmarker.

Diese wirken als Transkriptionsfaktoren. Unter den wichtigsten Stammzellmarkern sind Nanog, Oct-4 und Sox-2 [16]. Sie spielen bei der embryonalen Entwicklung eine außerordentlich wichtige Rolle. Sie sind nötig sowohl bei der Aufrechterhaltung der Pluripotenz als auch für die Selbsterneuerung der Stammzellen [17].

## 1.4 Stammzellmarker

Mittels Stammzellmarkern kann man Stammzellen unterschiedlicher Herkunft, z.B. Embryonal oder Adult sowie deren Eigenschaften kennzeichnen [18]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der Stammzellmarker Nanog, Oct-4 und Sox-2 untersucht. Diese Stammzellmarker (STZ-Marker) wurden ausgewählt, da sie nachweislich von mesenchymalen Stammzellen des Fettgewebes exprimiert werden [19].

Nanog, Oct-4 und Sox-2 bilden gemeinsam mit anderen Faktoren die Gruppe der Pluripotenzgene [20]. Dies bedeutet, dass sich Zellen mit diesen Faktoren in alle drei Keimblätter differenzieren können. Die drei Faktoren besetzen zu über 90 % die gleichen Promotorregionen für Zielgene, wie z.B. Homöoboxproteine, die für die Entwicklung und Regulation des Zellzyklus wichtig sind [17]. Des Weiteren regulieren sie die Expression von mikro-RNS (mikro-Ribonukleinsäure, miRNS), die ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Genregulation inne haben [21]. Sox-2 und Oct-4 regulieren sich darüber hinaus gegenseitig durch positive und negative Feedback- Schleifen was zeigt, dass die beiden voneinander abhängig sind [22].

Die STZ-Marker Sox-2 und Oct-4 sind wichtige Faktoren für die Herstellung von induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSC). Dabei bewirkt deren Überexpression in somatischen Zellen die Induktion zu pluripotenten Stammzellen [23]. Hierdurch wird deren Bedeutung für die Funktion der STZ hervorgehoben.

## **Oct-4**

Oct-4 ist ein Transkriptionsfaktor und gehört der POU- Familie an (POU = Pit-1, Oct-1 und Oct-2, Unc- 86) [24]. Für die embryonale Entwicklung, als auch in der Regulierung des Zellzyklus mit Zelldifferenzierung und Zellwachstum stellt Oct-4 ein wichtiger Faktor dar [25]. Es wirkt als Wächtergen der Differenzierung der Stammzelle entgegen [26].

## **Sox-2**

Sox-2 steht für „geschlechtsbestimmende Region Y-Box 2“ (sex determining region Y (SRY)- box 2; SRY-related HMG-Box Gene 2). Es gehört einer großen Gruppe in embryonalen Zellen exprimierter Gene an [27]. Sox-2 ist für die Aufrechterhaltung des Stammzellpotentials, also der Befähigung zur Selbsterneuerung von embryonalen und auch neuronalen Stammzellen nötig [28]. Essentiell ist das Vorhandensein von Sox-2 auch für die embryonale Entwicklung [13].

## **Nanog**

Nanog ist benannt nach dem Keltischen Land „Tir Nan Og“ – dem Land der ewigen Jugend [29]. Es ist ein Homöoboxprotein und wirkt als Transkriptionsfaktor. Um die Pluripotenz z.B. von embryonalem Stammzellen zu erhalten, ist Nanog ein ausschlaggebender Faktor [30]. Nanog wird sowohl in pluripotenten menschlichen Zellen als auch in Zelllinien von Mäusen exprimiert. Wird Nanog überexprimiert, bewirkt dies in Stammzellen von Mäusen eine Selbstreproduktion. Dies befähigt die Zellen außerdem, ihre Pluripotenz über viele Passagen zu erhalten. In differenzierten Zellen ist Nanog jedoch nicht mehr vorhanden [31] [32]. Werden Nanog und Oct-4 ausgeschaltet, beginnen sich die Zellen zu differenzieren [33].

## 1.5 Nutzung mesenchymaler Stammzellen in der Therapie

Durch die Erforschung von Stammzellen entstehen vielfältige neue Therapieoptionen, die ohne deren Einsatz schwierig zu erreichen wären. Deshalb wird derzeit intensiv an den Einsatzgebieten der mesenchymalen Stammzellen geforscht. Ein Vorteil speziell der mesenchymalen Stammzellen ist, dass sie direkt vom betroffenen Patienten gewonnen werden können und leicht zu kultivieren sind [34].

Wang et al. [35] haben 2012 vier Eigenschaften der MSCs zusammengefasst, die für das Verständnis der klinischen Einsatzmöglichkeiten am wichtigsten sind.

1. Bei intravenösem Einsatz der MSCs können diese bei Gewebeschäden zu den entzündeten Bereichen migrieren
2. Sie könne sich in viele verschiedenen Zelltypen differenzieren
3. MSCs sezernieren verschiedene bioaktive Moleküle , welche die Rekonvaleszenz geschädigter Zellen stimulieren und die Entzündungsreaktion hemmen können
4. Ihre fehlende Immunogenität sowie ihre Fähigkeit, immunmodulatorische Funktionen zu übernehmen

Der Einsatz mesenchymaler Stammzellen in der Therapie wird bisher, abgesehen von einem Auftreten vorübergehenden Fiebers während ihrer Anwendung, als sicher angesehen. Es konnte keine Beziehung zwischen einer möglichen malignen Transformierung und MSCs nachgewiesen werden. Ihre fehlende Immunogenität ist vermutlich auf die niedrige Expression von MHC-Proteinen zurückzuführen [36].

Mesenchymale Stammzellen haben ein großes Potential für neue Therapiemöglichkeiten im Rahmen orthopädischer Verfahren, im Bereich der regenerativen Medizin und der Tumorbehandlung. Des Weiteren können sie als Entzündungsinhibitoren, Immunsuppressiva und als Übertragungsvektoren in Gentherapien eingesetzt werden [37].

Bisher wurden mesenchymale Stammzellen des Knochenmarks (B-MSCs) z.B. bei der Regeneration von vernarbtem Herzmuskelgewebe eingesetzt [38]. Ebenso wird derzeit intensiv die Verwendung von adipozytären mesenchymalen Stammzellen (Ad-MSCs) bei der Transplantation von Lebergewebe [39] sowie in der Therapie des Lungenemphysems erforscht [40]. Wyles et al. erforschen derzeit die Möglichkeit, MSCs im Rahmen einer Stammzelltherapie bei der Behandlung von Osteoarthritis einzusetzen [41].

Gerade auch für die Heilung großer Knochendefekte ergaben sich bislang große Probleme, diese durch konventionelle chirurgische Verfahren wieder zu schließen. Auto- und Allogene Knochentransplantation sind bisher mögliche Techniken, um Defekte zu überbrücken. Probleme stellen dabei, vor allem bei der allogenen Knochentransplantation, die Immunogenität, sowie mögliche Infektionsgefahren dar.

Eine weitere Möglichkeit zum Knochenersatz bietet das Tissue Engineering. Dabei werden den Patienten Zellen entnommen, diese in vitro vervielfacht, auf biokompatible Trägermembranen verbracht und im Fall des Knochenersatzes in defekten Knochen verpflanzt [42]. Probleme entstehen hierbei allerdings durch die schlechten funktionellen Ergebnisse, den hohen Aufwand und die lange Behandlungsspanne [43] [44].

## **1.6 Knochengewebe und mesenchymale Stammzellen**

Knochen spielt eine wichtige Rolle im menschlichen Körper. Er ist Bestandteil des Bewegungsapparates und hat eine große Bedeutung bei der Stütz- und Skelettfunktion. Das knöcherne Skelett wirkt als Schutz des Organismus vor Gewalteinwirkung und dient außerdem als wichtiger Calcium- und Phosphatspeicher [45] [46].

Die Knochenmatrix verleiht den Knochen deren charakteristischen Eigenschaften, also vor allem Druck- und Zugfestigkeit [45].

Im Knochenstoffwechsel wichtige Zellen sind Osteoblasten, die für den Knochenaufbau und Osteoklasten, die für den Knochenabbau verantwortlich sind. Diese Zellen stehen in enger Verbindung, sodass ein Gleichgewicht

zwischen Knochenauf- und Abbau entsteht. Dies ist insbesondere für die Festigkeit des Knochens unabdingbar [47]. Osteoblasten entstehen aus mesenchymalen Stammzellen und differenzieren sich anschließend zu Osteozyten. Der Ursprung der Osteoklasten sind hämatopoetische Stammzellen aus dem Knochenmark [46]. Bauen sich Osteoblasten in die Extrazellulärmatrix (EZM) ein, werden sie Osteozyten genannt. Neben Osteoblasten und Osteoklasten besteht Knochen aus mineralisierter EZM, die sich aus Kollagenfibrillen und Hydroxylapatit-Kristallen zusammensetzt.

Die Knochenbildung kann durch desmale Ossifikation erfolgen, indem sich das Mesenchym in Knochengewebe umwandelt. Eine weitere Möglichkeit ist die enchondrale Ossifikation [48]. Dabei wird Knochen erst aus einem zuvor gebildeten Knorpelgerüst aufgebaut [9]. Osteoblasten sezernieren zudem das Osteoid, welches die unmineralisierte Knochenmatrix bildet [9]. Wichtig für die Mineralisierung der Matrix ist die Alkalische Phosphatase (AP), die von aktiven Osteoblasten synthetisiert wird [49].

Kommt es, z.B. entweder durch Unfall oder Osteoporose zu Knochenbrüchen, gibt es grundsätzlich 2 Arten der Frakturheilung. Bemerkenswerter Weise kommt es dabei nicht, wie in anderen Geweben zur Narbenbildung, sondern nahezu zur Restitutio ad integrum [50].

Bei der primären Frakturheilung, die in der Regel durch operative Osteosynthese induziert wird, kommt es zur direkten Kontaktheilung des Knochens [51]. Unter der sekundären, natürlichen Frakturheilung versteht man die Heilung des Knochens indirekt über die Bildung einer Narbe, die sowohl aus Bindegewebe als auch aus Knorpelgewebe besteht. Dabei entwickelt sich ein Kallus, der das Gewebe darstellt, aus dem später wieder Knochen entsteht. Während diesem Vorgang werden mesenchymale Stammzellen als Zellersatz rekrutiert, um den primären Knorpelkallus zu bilden [48]. Dieser Vorgang nimmt einige Wochen in Anspruch [9] [51].

Mit höherem Alter nimmt die Regenerationsfähigkeit der Knochen jedoch stetig ab, da immer weniger Osteoblasten zur Verfügung stehen [45]. Im hohen Alter oder bei ausgeprägten Knochendefekten kann es dazu kommen, dass diese

durch primäre oder sekundäre Ossifikation nicht mehr heilbar sind. Viele dieser Frakturen heilen nicht folgenlos aus. Dies ist nicht nur für die Patienten bedauerlich, sondern auch eine enorme wirtschaftliche Belastung [52].

Goldstandard für die Regeneration von Knochengewebe sind derzeit autologe Knochentransplantate wie Fibulatransfer, autologer Spongiosatransfer vom Beckenkamm und Allotransplantate. Des Weiteren werden Wachstumsfaktoren, Osteoprogenitorzellen und mPCL-TCP-Scaffolds (Polycaprolacton-Trikalziumphosphat) eingesetzt [53] [54] [55]. Für die Behandlung großer dia- und metaphysärer Frakturen kommt derzeit häufig auch die Masquelet-Technik zum Einsatz. Dies ist ein zweizeitiges Verfahren, mit dem durch Knochendébridement, Einsatz interner oder externer Fixateure sowie Verwendung eines Zementspacers im Frakturspalt die Bildung einer synovialen Fremdkörpermembran induziert wird. Der Spacer wird im Verlauf entfernt und es bildet sich neuer Periost [54].

Wichtig für den Einsatz von Stammzellen in der Therapie von ausgedehnten Knochendefekten ist, dass eine große Anzahl an Zellen verfügbar ist.

Die Gewinnung einer ausreichenden Anzahl an primären Osteoblasten ist in der Regel nur schwer erreichbar. Dies beruht auf der Tatsache, dass große Mengen davon nötig wären und es dadurch zu Schwachstellen in der Entnahmeregion kommen könnte. Deshalb differenziert man inzwischen Osteoblasten aus mesenchymalen Stammzellen, was mit einer größeren Anzahl an gewonnenen Zellen einhergeht. Ehnert et al. haben außerdem 2011 nachgewiesen, dass Ad-MSCs schneller proliferieren als B-MSCs und eine höhere basale AP-Aktivität besitzen [56]. Zu beachten ist bei der Differenzierungskapazität der Ad-MSCs auch das Alter des Spenders. Ad-MSCs von älteren Patienten zeigten eine verminderte Proliferationsrate und ein beeinträchtigtes Differenzierungspotenzial [57].

Bereits 2009 wurde beschrieben, dass durch die Infusion von MSCs und ihre anschließende Migration in frakturierten Knochen eine verbesserte Heilung

möglich ist. Durch die Expression des knochenmorphogenetischen Proteins 2 (bone morphogenetic protein 2, BMP-2) waren sie an der Entstehung und Entwicklung eines Kallus beteiligt [58]. Das Knochenmorphogenetische Protein 2 ist ein Wachstumsfaktor, der an der Regulation der Differenzierung von Osteoblasten und dem Knochenwachstum beteiligt ist [59].

Bis heute gibt es jedoch keinen synthetisch hergestellten oder heterologen Knochenersatz, der in der Funktion natürlichem Knochen ebenbürtig ist [53].

Deshalb ist es wichtig, die Forschung an Materialien und Zellen voranzubringen, um geeignete und auch wirtschaftlich tragbare Therapiealternativen entwickeln zu können.

Ad-MSCs sind ohne allzu großen Aufwand zu erhalten sowie in viel größerer Menge, was ein großer Vorteil z.B. gegenüber B-MSCs darstellt, deren Gewinnung deutlich komplizierter ist [60].

Um mesenchymale Stammzellen optimal in Osteoblasten-ähnliche Zellen differenzieren zu können, werden neben dem Basismedium DMEM zusätzlich 100 nM Dexamethason, 0,05 mM L-Ascorbin-2-Phosphat und 10 mM  $\beta$ -Glyzerol-Phosphate (BGP) benötigt [61]. Aufgrund neuer Studien wurde Dexamethason inzwischen durch  $1\alpha$ , 25-Dihydroxycalciferol ersetzt, das die Osteogenese effektiver induzieren kann [62] [63]. Durch die Zugabe von L-Ascorbinsäure-2-Phosphat wird das Zellwachstum in Anwesenheit von fetalem Kälberserum (fetal bovine serum, FBS) signifikant gesteigert. Außerdem erzielt man hierdurch eine höhere Kollagensynthese und AP-Aktivität, also eine erhöhte Expression osteogener Differenzierungsmarker [64]. BGP fungiert als Phosphatdonator für Hydroxylapatit und induziert die Expression der für die osteogene Differenzierung wichtigen Gene [65]. Eine hohe AP-Aktivität und die Ausbildung der Matrixmineralisierung sind somit Marker für osteogene Differenzierung [28] [66]. Osteoblasten-ähnliche Zellen zeigen in Zellkultur während der Bildung der Extrazellulärmatrix eine erhöhte AP-Aktivität [67]. Deshalb wurden diese beiden Marker im Rahmen des Experimentes miteinbezogen und untersucht.

## 1.7 Fettgewebe

Fettgewebe entstammt dem Mesenchym und wird grundsätzlich in braunes und weißes Fettgewebe aufgeteilt. Im Körper kommt vor allem das weiße Fettgewebe vor. Zelltypen, die in Fettgewebe vorkommen sind Adipozyten, Präadipozyten und verschiedene Stromazellen, darunter Ad-MSCs [39]. Aufgaben des weißen Fettgewebes sind neben der Bildung verschiedener Hormone die Energiespeicherung und mechanischer Schutz [68]. Braunes Fettgewebe ist bei kalter Umgebung in der Lage, durch Oxidation von Fettsäuren Wärme zu erzeugen [69].

## 1.8 Zielsetzung und Versuchsaufbau

### Fragestellung und Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollte durch die osteogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen (Ad-MSCs) aus Fettgewebe untersucht werden, welche Ursprungsregion der Ad-MSCs aus Körperfett sich am besten zur osteogenen Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen eignet.

Dafür erfolgte eine Grundcharakterisierung der Ad-MSCs mit Nachweis der Expression verschiedener Stammzellmarker wie Nanog, Oct-4 und SOX-2 in verschiedenen Fettgeweben. Die Fähigkeit zur osteogenen Differenzierung wurde anhand der Messung der AP- Aktivität und Erfassen der Mineralisierung durch die Knochenmatrix-Färbungen Von Kossa und Alizarin Rot nachgewiesen.

### Versuchsaufbau

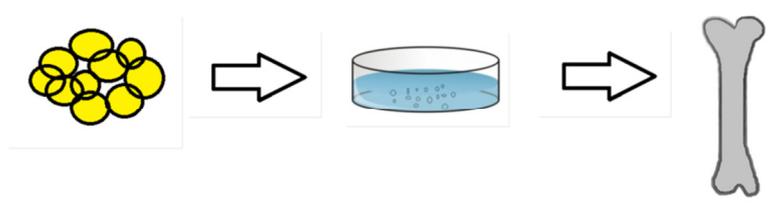
Die Ad-MSCs wurden aus dem von Patienten der BG-Klinik Tübingen erhaltenem Fett isoliert und über 2 Passagen kultiviert. Waren genügend Zellen in den Kulturflaschen vorhanden, d.h. die Zellen bedeckten ca. 80 % des Flaschenbodens, wurde sie für die unten genannte Versuchsreihe ausplattiert.

Tabelle 1 zeigt den Versuchsablauf mit den zu untersuchenden Komponenten und deren zeitlichen Verlauf.

**Tabelle 1, Schema für den Ablauf der Experimente**

An Tag 0 und 14 wurden je Protein und RNS- Lysate erzeugt, die AP- Aktivität gemessen sowie die Mineralisierung mittels Von Kossa und Alizarin Rot Färbung nachgewiesen.

	Tag 0	Tag 14
<b>Protein Lysate</b>	X	X
<b>RNS Lysate</b>	X	X
<b>AP-Aktivität</b>	X	X
<b>Mineralisierung (V. Kossa und A. Rot)</b>	X	X



**Abbildung 3: Mesenchymale Stammzellen:**

MSCs wurden aus Fettgewebe isoliert, kultiviert und anschließend osteogen differenziert.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalienliste

Name	Hersteller
37-40 % Formaldehyde Solution	Carl Roth
4-Nitrophenol solution 10 mM (pNP)	Sigma-Aldrich
Para-Nitrophenylphosphat (pNPP)	Carl Roth
99 % , 90%, 80 % . 70 %, 50 % Ethanol	Apotheke UKT
Azetessigsäure, purum >99,0 %	Carl Roth
Agarose Standard	Carl Roth
Alizarin Red S	Carl Roth
Antibiotic/Antimycotic Stock Solution	PAA
Borsäure	Carl Roth
Calciumchlorid	Carl Roth
Cell filter	BD Falcon
Cetylpyridiumchlorid Monohydrat 98 %	Carl Roth
Chloroform	Carl Roth
Cholecalciferol	Fluka
Collagenase II	PAA
Collagenase P	Roche
Desoxycholsäure (DOC)	Carl Roth
DEPC (Diethyldicarbonat)	Carl Roth
DMEM medium high glucose (4.5g/l) mit L-Glutamin	PAA
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Carl Roth
DNase I, RNase free 1u/μl, KIT	Fermantas
DNase/RNase-Free Distilled Water	Gibco
DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	PAA

EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) 0,5 M	Carl Roth
Eosin G-Solution 0,5 %	Carl Roth
Ethidiumbromid	Carl Roth
FCS	PAA
First Strand cDNA Synthesis KIT	Thermo Scientific
Glycerol	Carl Roth
Glycine	Carl Roth
Hämatoxylin-Solution nach Mayer	Carl Roth
HEPES	Carl Roth
Isopropanol	VWR
L-Ascorbinsäure-2-Phosphat	Sigma-Aldrich
Leupeptin	Carl Roth
L-Glutamine	PAA
Methanol	Carl Roth
MgCl <sub>2</sub> (Magnesiumchlorid)	Carl Roth
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (Natriumcarbonat)	Carl Roth
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (Natriumthiosulfat)	Carl Roth
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> (Sodium orthovanadate)	Sigma-Aldrich
NaCl (Natriumchlorid)	Carl Roth
NaF (Sodium fluoride)	Carl Roth
NaOH (Natriumhydroxid)	Carl Roth
Penicillin/Streptomycin	PAA
Pepstatin A	Sigma-Aldrich
peqGOLD TriFast	peqlab
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Carl Roth
Roti Histokitt	Carl Roth
Roticlear	Carl Roth
Roti-Mount	Carl Roth
Silbernitrat	Carl Roth
Sulforhodamine B sodium salt	Sigma-Aldrich

Tergitol Solution (NP 40 Substitute)	Sigma-Aldrich
Trypan Blue 0,5 %	Carl Roth
TRIS – Base (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Carl Roth
Trypsin	PAA
BGP ( $\beta$ -Glycerol-Phosphate)	Sigma-Aldrich
Bromphenol Blau	Carl Roth

### 2.1.2 Verbrauchs- und Gebrauchsmaterial

Name	Hersteller
15 ml, 50ml Falcon-Tubes	Greiner Bio-One
48, 96 - Well Kulturplatten	Greiner Bio-One
6 Well Kulturplatten	Becton Dickinson
Einfrierröhrchen für Zellen	PAA
Improved Neubauer Zählkammer	Superior Marienfeld
Lambda Plus Multipipetten	Corning
Magnetstäbchensortiment	Carl Roth
Pipettenspitzen 10 $\mu$ l	Biozym Scientific
Pipettenspitzen 1000 $\mu$ l	Ratiolab
Pipettenspitzen 200 $\mu$ l	SARSTEDT
Pipettierwannen	Camlass Trifill
Plastikküvetten	Eppendorf
Reaktionsgefäße 15 ml	SARSTEDT
Reaktionsgefäße 50 ml	SARSTEDT
Skalpelle Nr. 10	Feather
Spritzen 2 ml	BBraun
Spritzen 20 ml	BBraun
Sterilfilter 0,20 $\mu$ m	SARSTEDT
Zellkulturflaschen Cell star, 125, 175 cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-One
Zellkulturschalen 10 cm <sup>2</sup>	PAA
Zellschaber, 20 mm	Costar

Cell-stainer 70 µm	BD
--------------------	----

### 2.1.3 Geräteliste

Name	Hersteller
Analysenwaage ABJ 120-4M	Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Aqualine AL 25	LAUDA, Lauda-Königshofen, Deutschland
Arktik Thermal Cycler	Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland
Eismaschine	Scotsman
Elektrophoresekammer	Bio-Rad
EVOS FI	Advanced Microscopy Group (AMG), Mill Creek, USA
FLUO Star Omega	BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland
Gel stick imager	Intas, Göttingen, Deutschland
Heraeus Fresco 17 Zentrifuge	Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland
Heraeus Megafuge 40R	Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland
Inkubator	Binder
LSE Vortex Mixer	Corning, Corning, USA
Platereader FLUOstar	Omega
Power Pac 200	Bio-Rad, Hercules, USA
Präzisionswaage PCB 250-3 Waage	Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Primo Vert Invers-Mikroskop	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Secuflow Niedrigraum-Tischabzug	Waldner Laboreinrichtungen GmbH & Co.KG Wangen,

	Deutschland
Shaker DRS-12 SkyLine	ECMI
Sterilwerkbank MSC Advantage	Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland
Thermal Shaker	Peqlab
Veriti 96 well Thermocycler	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
Wasserbad inkl. Thermostat	Memmert, Schwabach, Deutschland

#### 2.1.4 Software

Name	Hersteller
EndNote X7	Japone/Team LnDL, Thomas Reuters, San Franzisko, USA
GraphPad Prism 5.04	GraphPad Software Inc., San Diego, USA
Image J 1.45s	National Institute of Health, USA
Intas Image Software	Imaging Instruments GmbH, Göttingen

### 2.2 Methoden

#### 2.2.1 Isolierung humaner Fettstammzellen (Ad-MSCs)

Das verwendete Fettgewebe stammte von Patienten der BG Unfallklinik Tübingen. Vor deren OP wurden die Patienten über die Nutzung von Gewebe zur Forschung aufgeklärt und um eine Zustimmung für die Gewebeentnahme zur Forschung gebeten. Nach erteilter Genehmigung wurde das Gewebe für die Studie genutzt.

Eine entsprechende Genehmigung des Ethikantrages (Einsatz von adulten Stammzellen in der Regenerativen Medizin - Herstellung und Charakterisierung von Knochen-ähnlichen Zellen als Ausgangsmaterial für mögliche zelltherapeutische Ansätze) wurde vor Versuchsbeginn erteilt (Antragsnummer: 385/12012BO2).

Die Isolierung und Kultivierung der Ad-MSCS erfolgte nach Vorgabe von Ehnert et al 2011 [43] sowie Seeliger, et al. (2012) [70].

Um die Ad-MSCs aus Fettgewebe zu isolieren, wurde dieses in kleine Stücke zerteilt, enzymatisch mit Kollagenase II gespalten, zentrifugiert und die erhaltenen Zellen anschließend kultiviert.

Die gesamte Isolierung der Ad-MSCs erfolgte unter sterilen Bedingungen unter der Sterilbank. Diese wurde vor Arbeitsbeginn gründlich mit 70 % Ethanol gereinigt.

Das gelieferte Fettgewebe wurde mit einer sterilen Schere, Pinzette und einem Skalpell unter der Sterilbank in kleine Stücke in Millimeter Größe geschnitten. Anschließend wurde mit 40 ml Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (D-PBS) gewaschen und 10 Minuten bei 430 g (22 °C) zentrifugiert. Danach erfolgte der Transfer des Fettes in ein neues 50 ml Falcon. Das Waschen des Fettes wurde zwei bis dreimal wiederholt, je nach Verunreinigungsgrad. Hierauf wurde pro ml Fett 0,7 mg Kollagenase II, in einer equivalenten Menge PBS gemischt und steril filtriert, dazugegeben.

Dadurch wurde der Verdau des Gewebes gestartet. Bei 37 °C wurde für 30-90 Minuten inkubiert, bis eine Fettemulsion entstand.

Zu der Fettemulsion wurden 10 ml warmes Kulturmedium (DMEM, 10 % FBS,

1 % Penicillin/Streptomycin Lösung) zupipettiert um die Kollagenase zu stoppen. Nach erneutem Mischen wurde das Gemisch 10 min bei 600 g zentrifugiert (22 °C). Der Überstand wurde anschließend abgenommen und das Pellet mit 10 ml warmem Kulturmedium resuspendiert. Anschließend erfolgte die Überführung der Suspension mit einem Zellfilter in ein neues 50 ml Falcon. Zu der Zellsuspension wurden weitere 15 ml Kulturmedium gegeben und anschließend in eine T175 Kulturflasche überführt. Die Zellen waren so in Passage 0.

### 2.2.2 Kultivierung humaner Fettstammzellen

Um nicht- adhärente Zellen zu entfernen wurde das Kulturmedium einen Tag nach der Isolation gewechselt. Dazu wurde das verunreinigte Kulturmedium abgesaugt, die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen und wieder 25 ml frisches Kulturmedium, das zuvor auf 37 °C erwärmt wurde, in die Kulturflasche pipettiert. Im Anschluss wurde das Kulturmedium jeden 2. Tag gewechselt.

Sobald die Zellen 80-90 % Konfluenz erreicht hatten, wurden sie in Passage 1 und danach bei gleicher Konfluenz in Passage 2 überführt.

Dazu wurde zuerst das Kulturmedium abgenommen, die Zellen mit 15 ml warmem D-PBS gewaschen und anschließend Trypsin zugefügt. Die Kulturflasche wurde dabei sorgfältig geschwenkt, damit alles mit Trypsin bedeckt war. Für T 175 Kulturflaschen wurden 2 ml Trypsin verwendet und für 5-15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Um die Zellen vom Boden zu lösen wurde die Flasche sanft geschwenkt. Dazu wurden 15 ml Kulturmedium gegeben, um das Trypsin zu stoppen. Es erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 600 g für 5 Minuten bei 22 °C. Nachdem der Überstand abgenommen war, wurde das Pellet mit warmem Kulturmedium resuspendiert, die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer gezählt und in neue Kulturflaschen überführt.

### 2.2.3 Osteogene Differenzierung der Ad-MSCs

Die osteogene Differenzierung wurde nach standardisiertem Protokoll von Ehnert et al (2011, Zeitschrift für Regenerative Medizin) durchgeführt. Für die osteogene Differenzierung der Ad-MSCs wurde ein Differenzierungsmedium hergestellt, in welchem die Zellen 14 Tage lang inkubiert wurden.

Lösungen

- Cholekalziferol Stock – Lösung
  - 19,25 mg Cholekalziferol (10mM) + 5 ml DMSO

Das Ad-MSC Differenzierungsmedium wurde hergestellt, indem 200  $\mu$ M L-Ascorbinsäure 2-Phosphat, 10 mM BGP, 25 mM HEPES, 1,5 mM  $\text{CaCl}_2$  und 5  $\mu$ M Cholekalziferol steril in DMEM mit 4,5 g/l Glukose filtriert wurden. Im Anschluss wurden noch 0,5 % FCS, 100 U/ml Penizillin und 100  $\mu$ /ml Streptomycin steril dazu filtriert. Um Kontaminationen auszuschließen wurde ein Medium-Test am Tag vor Gebrauch durchgeführt.

Die Zellen in Passage 2 wurden bei einer Dichte von ca. 80 % für die Experimente auf die Zellkulturplatten ausplattiert. Dafür wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit 5 ml Trypsin für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Vor der Zugabe des Kulturmediums wurde mit dem Lichtmikroskop kontrolliert, ob sich die Zellen gelöst hatten. Die erhaltene Suspension wurde für 10 Minuten bei 600 g zentrifugiert. Darauf wurden die Zellen gezählt und mit einer Dichte von 10.000 Zellen/  $\text{cm}^2$  auf die vorbereiteten Zellkulturplatten ausplattiert. Inkubiert wurde bei 37 °C und mit 5 %  $\text{CO}_2$ .

Die humanen Ad-MSCs wurden wie folgt ausplattiert:

**Tabelle 2, Ausplattierungsschema der Ad-MSCs**

<b>Assay</b>	<b>Kulturplatte</b>	<b>Fläche</b>	<b>Zellzahl/Well</b>	<b>Medium/Well</b>
AP Aktivität	96-Well-Platte	0,3 cm <sup>2</sup>	3000	100 µl
Von Kossa	48-Well-Platte	1 cm <sup>2</sup>	10.000	250 µ
Alizarin Rot	48-Well-Platte	1 cm <sup>2</sup>	10.000	250 µ
Protein Lysate	6-Well-Platte	10 cm <sup>2</sup>	100.000	2 ml
RNA Lysate	6-Well-Platte	10 cm <sup>2</sup>	100.000	2 ml

Ab Tag 1 nach Ausplattieren erfolgte die Differenzierung in Osteoblasten mit osteogenem Differenzierungsmedium für 14 Tage, mit Wechsel des Mediums alle 3-4 Tage.

Für die osteogene Differenzierung wurde das Medium auf 37 °C erhitzt, das Kulturmedium von den Zellen abgenommen und diese einmalig mit DPBS gewaschen. Anschließend wurde das osteogene Differenzierungsmedium zugefügt und die Zellen im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

### 2.2.4 Von Kossa Färbung

Mit der Von Kossa Färbung lassen sich Calciumablagerungen in der Zellmatrix nachweisen. Dafür wurde die Extrazellulärmatrix mittels Silbernitrat sichtbar gemacht. Der Versuchsablauf wurde anhand der Referenzen von Sheehan et al (1980) [71] durchgeführt.

#### Lösungen

- Silber Nitrat Lösung ( 3%)
  - 30 g Silbernitrat
  - 1 l ddH<sub>2</sub>O
- Natriumthiosulfat Lösung
  - 50 g Natriumthiosulfat

- 1 l ddH<sub>2</sub>O
- Natriumkarbonat – Formaldehyd – Lösung
  - 50 g Natriumkarbonat mit
  - 250 ml 37 – 40 % Formaldehyd auf insgesamt 1 l verdünnt mit ddH<sub>2</sub>O

Die Färbung wurde in Zellkulturplatten mit 48-Well durchgeführt um ein qualitativ hochwertiges Bild zu erhalten. Zuerst wurde das Medium von den Zellen abgesaugt, anschließend die Zellen mit 99 % Ethanol für 1 Stunde bei -20 °C fixiert. Danach erfolgte dreimaliges waschen mit Leitungswasser. Hierauf wurde eine 3 % Silbernitratlösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur (RT) dazu pipettiert. Es folgte wieder dreimaliges Waschen mit Leitungswasser. Nun wurde Natriumkarbonat-Formaldehydlösung für 2 min bei RT dazugegeben. Die Zellen wurden nun dreimal mit Leitungswasser gewaschen. Es folgte die Zugabe von 5 % Natriumthiosulfat-Lösung für 5 min bei RT um das Silbernitrat zu entfernen. Anschließend erfolgte wieder dreimaliges Waschen mit Leitungswasser und Dokumentation des Ergebnisses. Die Platten wurden für die Quantifizierung mit Densitometrie eingescannt und mit dem Mikroskop fotografiert.

### 2.2.5 Alizarin Rot Färbung

Alizarin Rot färbt Calcium und bestimmte Calciumverbindungen in roter oder heller violetter Farbe und weist so die Mineralisierung der Knochenmatrix nach. Für die Durchführung des Experiments wurde das Protokoll nach Sheehan et al verwendet [71].

#### Lösungen

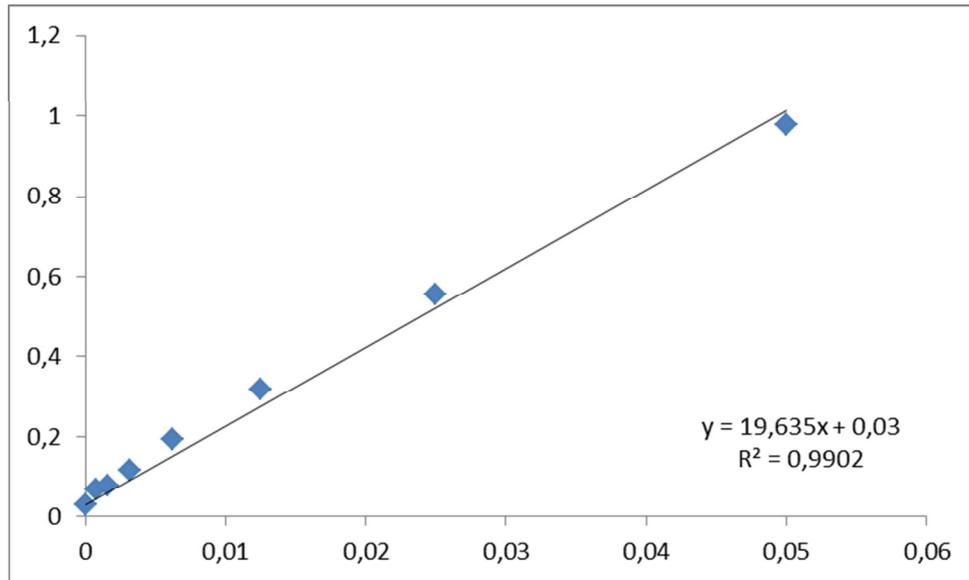
- Alizarin Rot Färbelösung 0,5 %
  - 200 mg Alizarin Rot
  - 40 ml ddH<sub>2</sub>O

- Cetylpyridiumchlorid Lösung
  - 10 g Cetylpyridiumchlorid Monohydrat
  - 100 ml Leitungswasser

Die Färbung erfolgte in 48-Well-Zellkulturplatten um ein qualitativ hochwertiges Bild erfassen zu können.

Das Medium wurde von den Zellen aspiriert und diese für 60 Min. bei -20 °C in 99 % Ethanol fixiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit Leitungswasser gewaschen und 0,5 % Alizarin-Rot Färbelösung für 30 Min. bei RT dazupipettiert. Hierauf erfolgte wieder dreimaliges Waschen mit Leitungswasser. Um die Resultate Densitometrisch zu dokumentieren, wurden die Platten eingescannt und mit dem Mikroskop fotografiert. Für die Quantifizierung der Ergebnisse wurde das Leitungswasser abgenommen und die Platten luftgetrocknet. Nachdem die Platten trocken waren wurde Cetylpyridiumchlorid Lösung für 15-60 min (auf dem Shaker) auf die Zellen aufgebracht. Nach komplettem Auflösen des Farbstoffes wurde die Absorption mit dem Omega Plate Reader gemessen.

Um die Konzentration von Alizarin Rot bestimmen zu können, wurde eine Standardkurve pipettiert und photometrisch die Extinktion bei 562nm gemessen:



**Abbildung 4, Standardkurve Alizarin Rot**, Senkrecht OD [560 nm], waagrecht Alizarin Rot [%]  
Die obige Formel wurde nach x aufgelöst, so konnte jedem Extinktionswert eine bestimmte Alizarin Rot Konzentration zugeordnet werden.

$$x = y - 0,03 / 19,635$$

Die gemessenen Extinktionen wurden für y eingesetzt. Man erhielt so die Konzentration von Alizarin Rot in  $\mu\text{M}$ .

### 2.2.6 Aktivitäts-Bestimmung der Alkalischen Phosphatase

Die Alkalische Phosphatase ist ein Enzym, das beim Menschen vor allem im wachsenden Knochen, Leber, Dünndarm und in der Plazenta vorkommt. Die Knochen-spezifische AP dient in der Medizin als Indikator für Veränderungen des Knochenstoffwechsels. Als Grundlage der AP-Aktivitäts-Bestimmung diente die Verfahrensanleitung von Ehnert et al. (2010) PLoS ONE [72] sowie Ehnert et al., Zeitschrift für Regenerative Medizin [43].

Prinzip der Messung der AP-Aktivität ist die Reaktion der Zellen mit para-Nitrophenylphosphat (pNPP), wodurch ein wasserlösliches Produkt des pNPPs erzeugt wird, das photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm messbar ist.

### Lösungen

- AP- Aktivitäts Test-Puffer (pH = 10,5)
  - 3,75 g Glyzin 50 mM,
  - 12,11g Tris-Base 100 mM und
  - 203 mg MgCl<sub>2</sub> 1 mM wurden auf insgesamt 1000 ml mit ddH<sub>2</sub>O vermischt.
  
- AP – Substrat Lösung
  - 1,3 mg pNPP 3,5 mM
  - 1ml AP-Aktivitäts Test-Puffer 0,1M

Für die Bestimmung der AP- Aktivität wurden die Zellen in 96-Well-Platten kultiviert. Die AP Substratlösung bestand aus 50 mM Glyzin, 100 mM Tris-Base und 1 mM MgCl<sub>2</sub> in ddH<sub>2</sub>O mit einem pH von 10,5. Auf jedes Well wurden 100 µl AP Substratlösung gegeben, zusätzlich auch in eine Reihe ohne Zellen für die Background-Erfassung. Die Zellen wurden für 120 min bei 37 °C inkubiert. Das Reaktionsgemisch sollte eine gelbe Farbe annehmen. Es erfolgt die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm. Die Zellen wurden anschließend mit 99 % Ethanol fixiert um anschließend eine SRB Färbung für die Quantifizierung der relativen Proteinmenge durchführen zu können [73].

Für die Standardkurve wurde die erhaltene OD<sub>405</sub> nm gegen die korrespondierende pNP Konzentration aufgetragen und eine lineare Trendlinie eingefügt. Die erhaltene Formel wurde nach x aufgelöst. Die gemessene OD der Proben wurde für x eingefügt um die Höhe des nNP in µM zu erhalten. Folgend wurde durch 10 dividiert um die aktuelle Höhe der pNP -Konzentration pro Well in pmol zu erhalten. Anschließend wurde durch die Inkubationszeit in min dividiert. Mit der SRB Färbung erfolgte die Normalisierung des Signals.

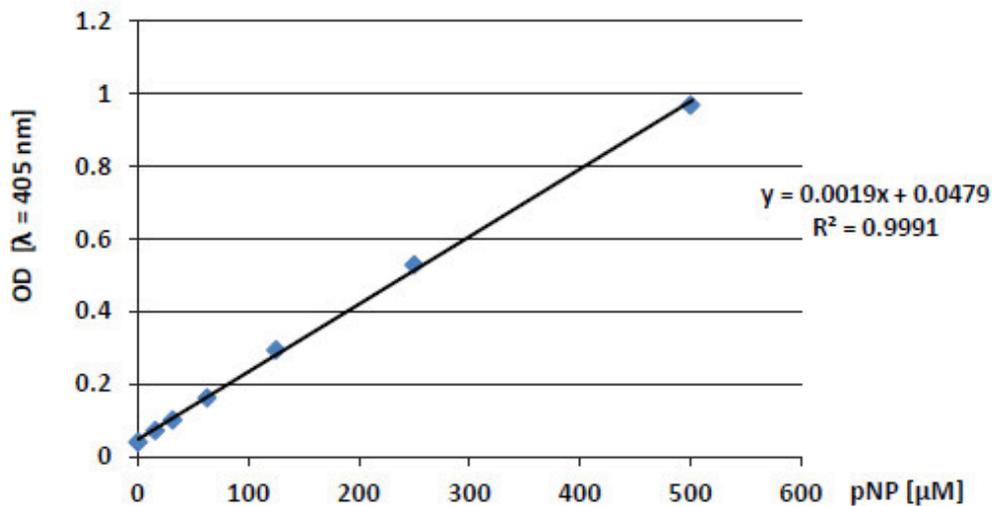


Abbildung 5: Standardkurve der AP-Aktivität

### 2.2.7 Sulforhodamin B (SRB) Protein Färbung

Sulforhodamin B bindet an Oberflächenproteine und kann so zur Dokumentation des Zellwachstums dienen.

Für die SRB Färbung wurden die Zellen nach der AP-Messung mit 99 % Ethanol für 15 min bei -20 °C fixiert. Danach wurden die Zellen mit SRB Lösung bedeckt, vor Licht geschützt und für 30 min bei RT auf dem Shaker belassen. Anschließend wurde die Lösung abgenommen und die Zellen vier Mal mit 1 % Azetessigsäure-Lösung gewaschen. Für die Quantifizierung wurde das SRB mit 10 mM ungepufferter TRIS Lösung gelöst. Die Platte wurde wiederum vor Licht geschützt und 5-10 min bei RT auf dem Shaker inkubiert. Die Absorption wurde bei 565 nm und 690 nm gemessen. Die bei 565 nm gemessene optische Dichte (OD) entspricht der SRB Konzentration, diejenige bei 690 nm entspricht der OD mit Unreinheiten und Kratzer. Deshalb wurde von der OD<sub>565 nm</sub> die OD<sub>690 nm</sub> abgezogen. Als Referenz für diesen Versuch wurde das Protokoll von Skehan et al. (1990) [73] herangezogen.

### 2.2.8 PCR

Um die Stammzellmarker Nanog, Sox-2 und Oct-4 in den Ad-MSCs quantifizieren zu können, wurde zuerst Ribonukleinsäure (RNS) aus den Zellen isoliert, mittels PCR vervielfältigt, anschließend durch Gelelektrophorese getrennt und mittels Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Als Grundlage der Durchführung diente das Technical Manual der Firma Thermo Scientific [74].

### 2.2.9 Isolierung von RNS mittels TriFast

Die Isolation der RNS mittels TriFast erfolgte nach der Anleitung von peqlab peqGOLD TriFast.

TriFast ist ein gebrauchsfertiges Reagenz um RNS von DNS und Proteinen zu trennen. RNS ist ein Polynukleotid, das in der Zelle z.B. als Informationsüberträger dient.

Die hier genutzte Ein-Schritt RNS Isolation basiert auf Phasenseparation. Durch Zentrifugieren werden drei Phasen geformt. In der oberen, wässrigen Phase ist die RNS enthalten. Protein ist in der unteren, organischen Phase zu finden. Desoxyribonukleinsäure (DNS) kommt sowohl in der Zwischenphase als auch in der organischen Phase vor.

#### Lösungen

- DEPC H<sub>2</sub>O (0,1 %)
  - 1 ml DEPC
  - 1 l ddH<sub>2</sub>O bei 37 °C für 1 Std. inkubieren
- Ethanol 70 % zum waschen
  - 35 ml Ethanol 99 %
  - 15 ml DEPC H<sub>2</sub>O

Die Zellen wurden in einer 6-Well-Kulturplatte kultiviert (je Spender 3 Well). Dazu wurden 500 µl TriFast gegeben. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber

abgenommen und in sterile Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Diese wurden 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 100 µl Chloroform (pro 500 µl TriFast) zu der Zellsuspension dazugegeben. Die Mischung wurde 15 Sekunden gevortext und wieder 5-10 min bei RT inkubiert, danach bei 14 000 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Während der Zentrifugation wurden in neue Eppendorf Gefäße jeweils 250 µl Isopropanol pipettiert. Nach dem Zentrifugieren wurde die RNS haltige, obere wässrige Phase in die neuen, Isopropanol enthaltenden Eppendorf Gefäße, überführt. Hier wurde die Isolation unterbrochen, um die RNS Proben bei -20 °C für 1-24 Stunden einzufrieren, um die Präzipitation der RNS zu fördern. Danach wurden die Proben 5-10 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend bei 14 000 g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand (Gel-artig) über dem Pellet wurde abgenommen und das RNS Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen. Es wurde hierauf bei 14 000 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Gel-artige Phase erneut mit 70 % Ethanol gewaschen. Das Gel-artige Pellet wurde danach mit 30-50 µl DEPC Wasser gelöst und die Menge der Enthaltenen RNS photometrisch bestimmt. Um Kontaminationen auszuschließen, wurde eine RNS-Quantifizierung durchgeführt. Dies wurde mit Hilfe von „LVis Platten“ des Omega Plate-Readers durchgeführt. Zuerst erfolgte ein „dust check“ ohne Proben, bei dem die gemessene OD unter 3 sein sollte. Dies erfolgte mittels 2 µl DECP H<sub>2</sub>O. Anschließend wurden 2 µl der RNS-Proben in die einzelnen Löcher der Platte pipettiert und mit dem Programm „LVIS DNA“ gemessen.

### **2.2.10 Verdau der genomischen DNS mit DNase I**

RNS Proben enthalten oft Verunreinigungen genomischer DNS. Der einfachste Weg dieses Problem zu lösen ist, diese durch Verdau mit Desoxyribonuklease I (DNase I) zu entfernen. Zu den RNS Proben in Eppendorf-Reaktionsgefäßen wurde 1 µl DNase /µg RNS zugefügt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Um den DNase Verdau zu stoppen, wurde anschließend 50 mM EDTA (1 µl pro 10 µl Reaktionsvolumen) dazugegeben und für 10 min bei 65 °C inkubiert. Danach wurde erneut die Konzentration der RNS gemessen.

### 2.2.11 RNS Integritätscheck

Der RNS Integritätscheck wurde durchgeführt, um Kontaminationen der RNS mit Salz, Proteinen oder genomischer DNS auszuschließen, sowie eine Degradation der RNS aufgrund von Ribonucleasen (RNAsen). Diese könnten bei der reversen Transkription zu Problemen führen und müssen daher ausgeschlossen werden. Dazu wird eine Gelelektrophorese durchgeführt, um genomische DNS oder RNS- Zerfall nachweisen zu können. Nach Trennung der RNS- Probe auf dem Agarosegel sollten die 18S und 28S ribosomale RNS deutlich zu sehen sein. Eine ungefähr gleiche Intensität der Banden bestätigt die Quantifizierung. Als Referenz dienten die Vorgabe von Sambrook und Green [75].

#### Lösungen

- DEPC H<sub>2</sub>O (0,1 %)
  - 1 ml DEPC
  - 1 l ddH<sub>2</sub>O
- 10x TBE
  - 540 g TRIS (0,89 M)
  - 275 g Borsäure (0,89 M)
  - 37,3 g EDTA (20mM) gelöst auf insgesamt 5 l mit ddH<sub>2</sub>O mit pH 8,3
- PCR – Ladepuffer (5x)
  - 25 mg Bromphenol Blau
  - 5 ml TBE 10x
  - 5 ml Glyzerol (10 %)

Um eine Elektrophorese durchführen zu können, wurde zuerst ein 1,8 % Agarosegel hergestellt (1,8 g Agarose, 100 ml TBE 10x, 7µl Ethidiumbromid, 45 min ruhen lassen zum aushärten). 4/5 des finalen Volumens war die zu untersuchende RNS-Lösung, mit ddH<sub>2</sub>O zur Anpassung des Volumens. 1/5 des

finalen Volumens war der 5x konzentrierte PCR Ladepuffer. Der Marker (1,5 µl) und die Proben wurden auf das vorbereitete Agarosegel geladen und für 40-50 min eine Spannung von 90 Volt angebracht. Durch Gelelektrophorese ist es möglich, DNS-/RNS-Fragmente mittels einer angebrachten Spannung nach ihrer Größe aufzutrennen. Dabei wandern kürzere DNS-/RNS-Fragmente schneller als längere DNS-/RNS-Fragmente. Abschließend wurden Bilder mit dem Gel-Doc erstellt, wobei die DNS/RNS-Banden mittels Ethidiumbromid unter UV Licht sichtbar gemacht worden waren.

### 2.2.12 Herstellung von cDNS

cDNS ist von ihrer Basenabfolge komplementär zur RNS, und kann so später dafür verwendet werden, die Höhe der Expressionsrate der verwendeten RNS darzustellen.

Die Erstellung der cDNS erfolgt durch das Enzym Reverse Transkriptase (RT), einer RNS- abhängigen DNS- Polymerase.

Für die Herstellung der cDNS wurde das First Strand cDNS Synthesis Kit von Fermentas verwendet. Im Thermocycler wurde ein Programm für die cDNS Synthese erstellt. Zuerst wurde die zuvor verdaute RNS mit Oligo(dT)18 Primer, Random Hexamer Primer und Nuklease-freiem Wasser gemischt und bei 65 °C für 5 Minuten im Thermocycler inkubiert. Danach wurde das Gemisch kurz entnommen, auf Eis gekühlt und 5 facher Reaktionspuffer, bestehend aus Ribolock, MULV sowie DNTP-Mix, zugegeben. Die Proben wurden nun in den Thermocycler zurückgestellt. Die weitere Inkubation erfolgte dort für 60 min bei 37 °C und für 5 Minuten bei 70 °C um die Synthese zu beenden. Die Herstellung der cDNS erfolgte nach einem Protokoll des Siegfried-Weller-Institutes der BG-Klinik Tübingen.

### 2.2.13 Bestimmung der Genexpression durch Real-Time PCR

Mittels PCR, der Polymerase-Kettenreaktion, ist es möglich, DNS zu vervielfältigen. Die DNS – Abschnitte, die am Anfang vorlagen stehen jeweils als Ausgangspunkt für die nächsten Zyklen zur Verfügung, was zu einer exponentiellen Vermehrung der zu untersuchenden DNS- Abschnitte führt.

Das Technical Manual des qPCR Kit der Firma Thermo Scientific wurde als Grundlage für die Durchführung des Experiments genutzt [74].

Die zu analysierende cDNS wurde in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Als Negativ Kontrolle diente DECP-H<sub>2</sub>O. Zu jeder Probe wurde ein Mastermix (je 0,5 µl dNTPs, 2 µl MgCl<sub>2</sub>, 2 µl Puffer, 1 µl F-Primer, 1 µl R-Primer, 0,1 µl Taq-Polymerase und DEPC-H<sub>2</sub>O) zugefügt.

**Tabelle 3: PCR-Zyklus**

Primer	Initiale Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	Endgültige Elongation
GAPDH	95 °C, 3 min	95 °C, 10 s	59 °C, 15 s	72 °C, 15 s	72 °C, 5 min
Sox 2	95 °C, 3 min	95 °C, 10 s	62 °C, 15 s	72 °C, 15 s	72 °C, 5 min
Nanog	95 °C, 3 min	95 °C, 10 s	59 °C, 15 s	72 °C, 15 s	72 °C, 5 min
Oct-4	95 °C, 3 min	95 °C, 10 s	59 °C, 15 s	72 °C, 15 s	72 °C, 5 min

**Tabelle 4: Verwendete Primersequenzen der PCR**

Primer	Forward-Primer	Reverse-Primer	Amplicon-Größe Basenpaare
Sox 2	CATGCACCGCTACGACG(17)	CGGACTGACCGAAC(18)	152
Nanog	AACTGGCCGAAGAATAGCAA(20)	ACTGGATGTTCTGGGTCTGG(20)	175
Oct-4	AGTGAGAGGCAACCTGGAGA(20)	GCCTCAAATCCTCTCGTTG(20)	177

Die Gelelektrophorese-Gele wurden mittels densitometrischer Analyse mit der Software ImageJ ausgewertet. Die gemessenen Werte wurden anschließend auf

die densitometrischen Werte des GAPDH-PCR-Gels der untersuchten cDNS-Probe normalisiert.

### 2.2.14 Hämatoxylin-Eosin Färbung

Die H-E Färbung erfolgte nach einem Färbeprotokoll von Sheehan und Hrapchak [71]. Hämatoxylin färbt saure (basophile) Strukturen blau, also z.B. Zellkerne mit DNS sowie das raue Endoplasmatische Retikulum. Das dazu verwendete Eosin färbt dagegen basische, eosinophile Strukturen rot an. Dies sind z.B. das glatte Endoplasmatische Retikulum, Mitochondrien und Kollagen.

Für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurden Schnitte aus Paraffin-Blöcken mit enthaltenem Spenderfett verwendet.

Vor dem Färben war es nötig, die Schnitte zu Entparaffinieren, was mit Roticlear-Lösung (5 Minuten) erreicht wurde. Darauf folgte die Rehydratation mit einer absteigenden Reihe von Ethanol (EtOH 99,9 % 3 min, 90 % 2 min, 80 % 2 min, 70 % 2 min, 50 % 2 min, danach 2 min destilliertes Wasser).

Anschließend folgte das fünfminütige Färben mit Hämalaunlösung, welches darauf 3 x 5 min mit Leitungswasser ausgewaschen wurde. Hierauf folgte der zweite Färbeschritt mit Eosin G-Lösung 0,5 % für 3 Minuten, worauf mit destilliertem Wasser gewaschen wurde.

Die Dehydrierung erfolgte mit einer aufsteigenden Ethanol-Reihe ( 80% 30 sec, 2 x 90 % für 4 min, 99,9 % 3 min, 99,9 % 5 min). Der letzte Schritt, das so genannte klären, erfolgte mit Roticlear für 5 Minuten.

Zum Abschluss wurden die gefärbten Schnitte mit Roti-Histokitt und einem Objektglas bedeckt um sie vor Zerstörung zu schützen.

### 2.2.15 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte über one-way ANOVA. Da bei 4 Replikaten keine Normalverteilung zu erwarten war, wurde der one-way ANOVA mittels

Kruskal-Wallis Test und Dunn's Multiple Comparison Test durchgeführt. Als statistische Vorgabe wurde  $p < 0,05$  als signifikant vorgegeben. Die Grafiken wurden mittels Graph Pad Prism (El Camino Real, USA) erstellt.

### 3 Ergebnisse

Die drei Spendergruppen Flanke/Hüfte, Abdomen und Oberschenkel unterschieden sich sowohl im Durchschnittsalter sowie der Geschlechterzuordnung. Ursprünglich waren neben den oben genannten Regionen noch der Unterschenkel sowie der Ober/- und Unterarm in den Experimenten enthalten. Es wurden allerdings nicht genügend Spender dieser Regionen erhalten, so dass diese im Verlauf nicht mehr berücksichtigt wurden.

**Tabelle 5: Spenderübersicht der Ad-MSCS**

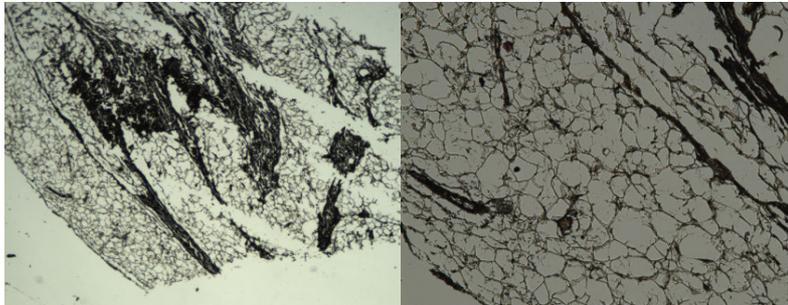
<b>Herkunftsregion der Ad-MSCs</b>	<b>Durchschnittsalter in Jahren</b>	<b>Geschlechterverhältnis w:m</b>
Flanke/Hüfte	70,4	4:1
Abdomen	50,6	2:3
Oberschenkel	61	4:1

Ziel dieser Arbeit war es, die osteogenen Differenzierungsfähigkeiten der mesenchymalen Stammzellen aus Fettgewebe unterschiedlicher Körperregionen zu charakterisieren. Dazu wurde von Patienten der BG Tübingen, mit deren Einverständnis, Fettproben entnommen und die darin enthaltenen Ad-MSCs zuerst isoliert, kultiviert und anschließend osteogen differenziert. Die osteogene Differenzierung mit Bildung einer Knochenmatrix wurde mittels Alizarin Rot und Von Kossa Färbung nachgewiesen. Ebenso wurde die Aktivität der Alkalischen Phosphatase vor und nach Beginn der Differenzierung dokumentiert. Die Stammzellmarker Nanog, Oct-4 und SOX-2 wurden vor Beginn der Differenzierung durch PCR bestimmt. Des Weiteren wurde die Entwicklung der Ad-MSCs in osteogene Zellen mittels Evos FI dokumentiert. Abschließend wurden die Unterschiede der osteogenen Differenzierungskapazitäten der Ad-MSCs unterschiedlicher Körperregionen verglichen und graphisch dargestellt.

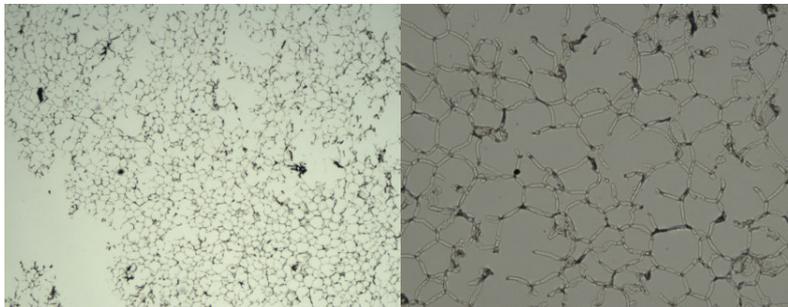
### 3.1 Die Charakterisierung des Adipozytengewebes durch HE-Färbung zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Regionen

Nach Erhalt des Fettgewebes und vor der Isolierung und Differenzierung der Ad-MSCs wurde das erhaltene Fettgewebe histologisch aufgearbeitet und nach H&E Färbung photographisch festgehalten. Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Morphologie der untersuchten Fettgewebe der verschiedenen Körperregionen. Die mikroskopischen Bilder zeigten in allen Regionen weißes, univakuoläres Fettgewebe.

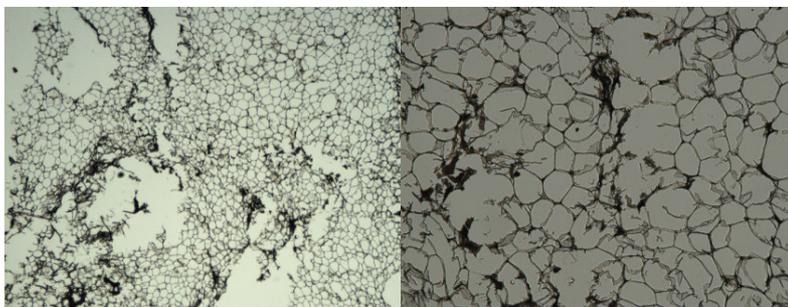
Flanke



Abdomen

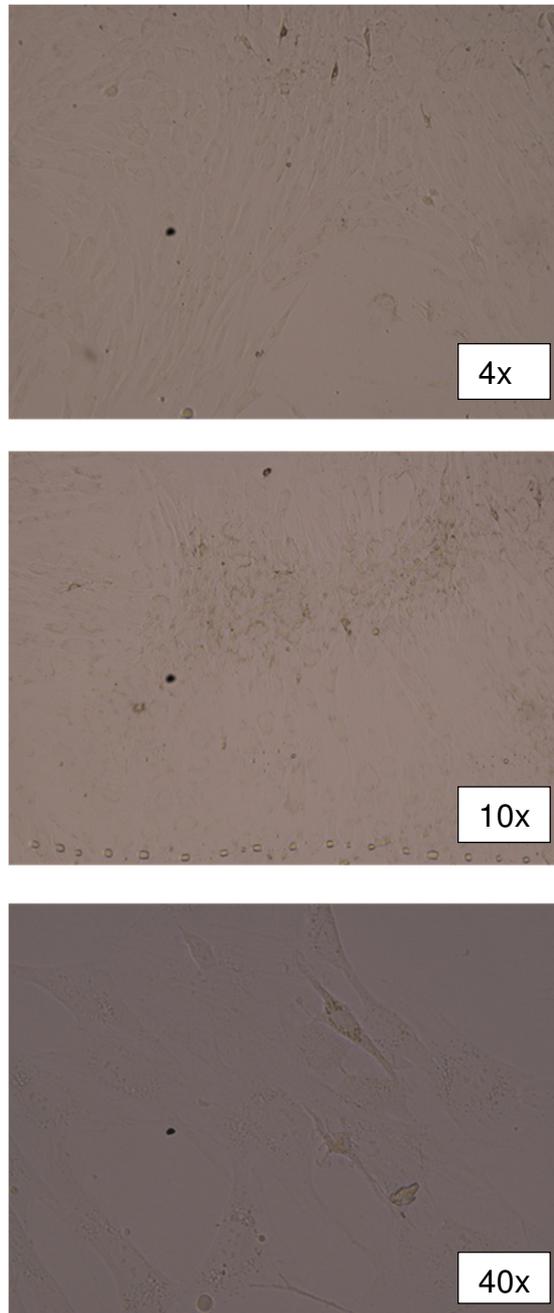


Oberschenkel



**Abbildung 6: Mit Hämatoxylin-Eosin gefärbtes Fettgewebe** der Flanke, des Abdomens und des Oberschenkels, li.: 2x Vergrößerung, re.: 10x Vergrößerung

Ebenso konnte während der Proliferationsphase kein signifikanter morphologischer Unterschied zwischen den Ad-MSCs gesehen werden.



**Abbildung 7: Ad-MSCs in Passage 3 während der Zellkultur..**

### 3.2 Aktivitätsbestimmung der alkalischen Phosphatase

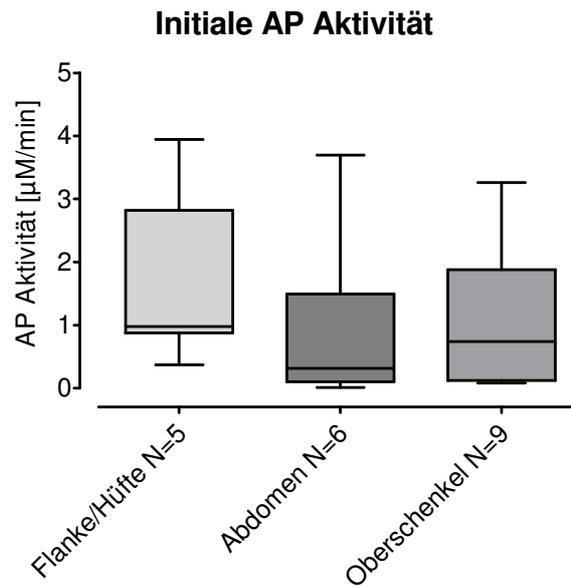
Die Alkalische Phosphatase wird oft als Stammzellmarker angesehen, weshalb eine hohe Expression auf eine bessere Differenzierungsfähigkeit der AdMSCs schließen lassen sollte. Die Bestimmung der AP erfolgte deshalb vor Beginn der Differenzierung, um die osteogene Differenzierungskapazität, die durch die Matrixfärbungen bestimmt werden kann, mit der ursprünglichen Höhe der AP-Aktivität vergleichen zu können. Es wurde anschließend an die osteogene Differenzierung erneut die Aktivität der AP gemessen, die zu Beginn der osteogenen Differenzierung ansteigen und durch die Ausdifferenzierung der Ad-MSCs abgenommen haben sollte.

Die gemessenen AP-Aktivitäten der untersuchten Körperregionen wurden anschließend graphisch sowohl im Vergleich der Regionen untereinander an Tag 0 und Tag 14, sowie direkt im Vergleich der Tage und Körperregionen dargestellt.

#### 3.2.1 Bestimmung der AP-Aktivität vor Differenzierung

Erwartungsgemäß konnte in allen Ad-MSCs der drei untersuchten Körperregionen eine Aktivität der Alkalischen Phosphatase nachgewiesen werden.

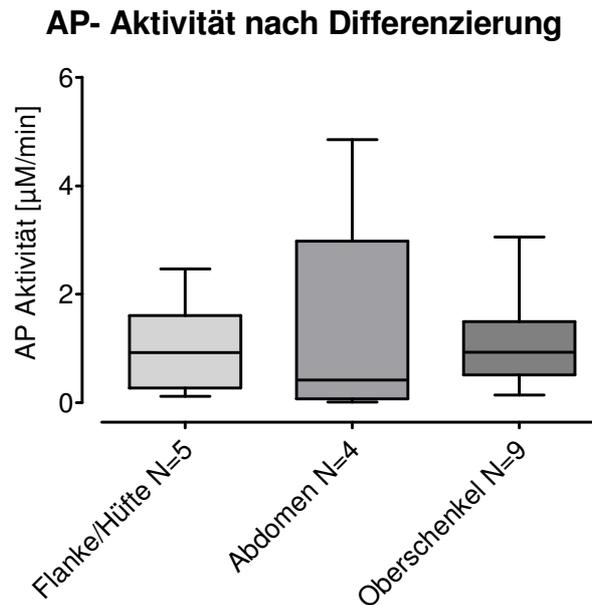
An Tag 0 gab es keine signifikanten Unterschiede in der AP-Aktivität der drei untersuchten Körperregionen.



**Abbildung 8: Aktivitätsbestimmung der AP-Aktivität vor Differenzierung.** Die höchste AP-Aktivität der unbehandelten Ad-MSCs fand sich im Fett der Flanken/Hüftregion. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Regionen.

Die höchste Tendenz der Aktivität der alkalischen Phosphatase vor osteogener Differenzierung zeigte sich vor allem in der Flanken/Hüftregion. Der Oberschenkel wies eine geringere Aktivität der alkalischen Phosphatase auf als die Flanke, jedoch eine etwas höhere als im Abdomen.

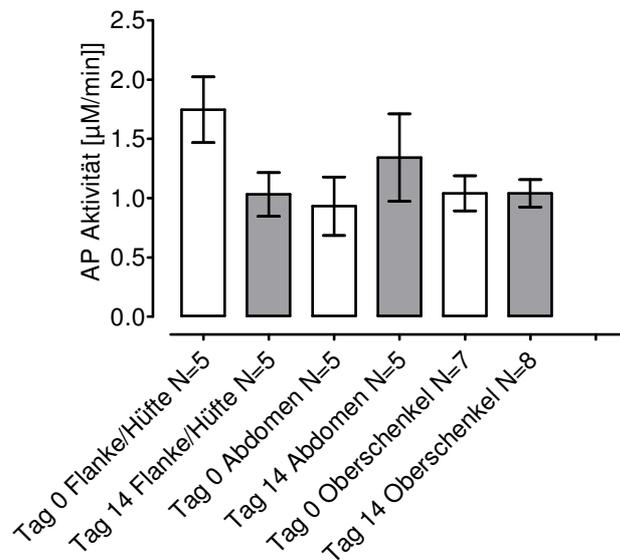
## 3.2.2 Bestimmung der AP-Aktivität nach Differenzierung



**Abbildung 9: AP-Aktivität nach osteogener Differenzierung.** Die AP-Aktivitäten der einzelnen Regionen zeigten keine signifikanten Unterschiede.

Nach 14 Tagen osteogener Differenzierung zeigte sich weder zwischen Flanke/Hüfte und Oberschenkel, zwischen Abdomen und Oberschenkel, noch zwischen Abdomen und Flanke/ Hüfte ein signifikanter Unterschied in der Höhe der AP-Aktivität. Die höchste Aktivität der Alkalischen Phosphatase nach der Differenzierung zeigte sich im Abdomen. Die AP-Aktivität im Bereich der Flanken/Hüftregion nahm deutlich ab, was durch die Entwicklung der Ad-MSCs zu Osteoblasten-ähnlichen Zellen und somit ihrer Ausdifferenzierung zu erwarten war. Die AP-Aktivität des Oberschenkels blieb jedoch fast identisch mit der Ausgangshöhe.

### AP-Aktivität vor (weiß) und nach (grau) Differenzierung



**Abbildung 10: Die AP-Aktivität vor und nach osteogener Differenzierung** zeigt innerhalb, sowie zwischen den einzelnen Regionen keine signifikanten Unterschiede.

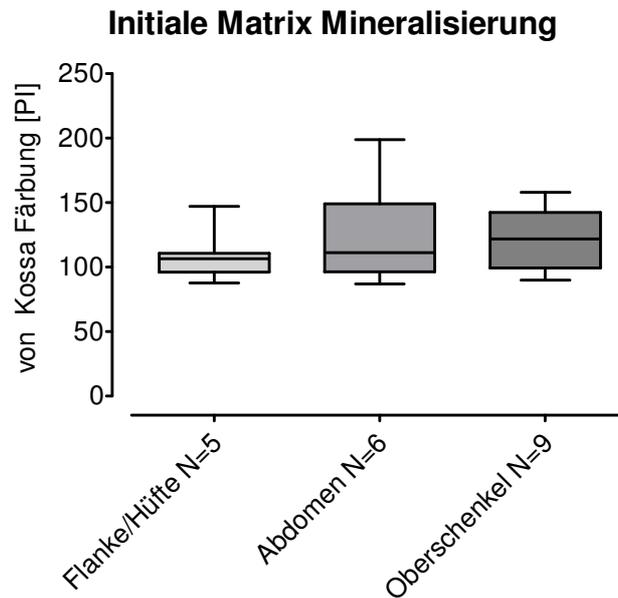
### 3.3 Matrixfärbungen

Vor Beginn der osteogenen Differenzierung sowie nach deren Beendigung wurden jeweils die Matrixfärbungen Von Kossa und Alizarin Rot verwendet, um den Stand der Mineralisierung zu dokumentieren und nachzuweisen. Dabei zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den Stammzellen der unterschiedlichen Körperregionen nach abgeschlossener Differenzierung, jedoch erwartungsgemäß nicht vor osteogener Differenzierung.

#### 3.3.1 In der Von Kossa Färbung zeigt die Flanken/Hüftregion die ausgeprägteste Mineralisierung

Für den Nachweis der Ausbildung einer extrazellulären Matrix wurden die ausplattierten Zellen mit Silbernitrat gefärbt.

Im Vergleich der Differenzierungsfähigkeiten der Ad-MSCs der einzelnen Körperregionen gab es vor Beginn der osteogenen Differenzierung keine signifikanten Unterschiede, da bis dahin keine Knochenmatrix gebildet wurde.

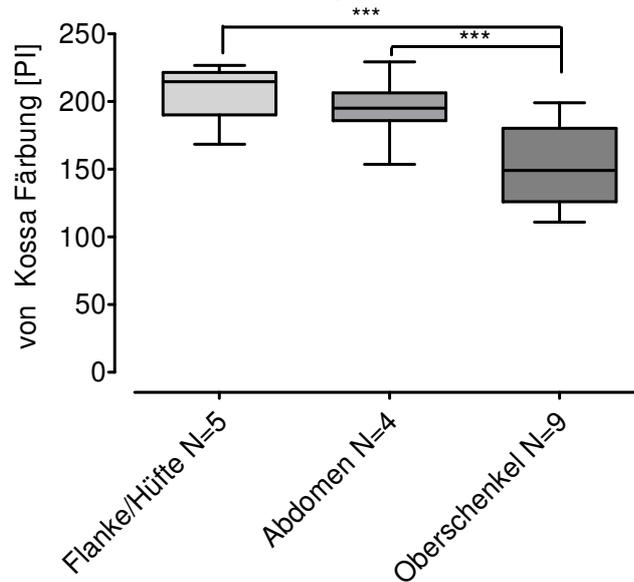


**Abbildung 11: Von Kossa Färbung von Oberschenkel, Flanke und Abdomen vor osteogener Differenzierung.** Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Regionen.

Die höchste initiale Matrixmineralisation bei der Färbung mit Von Kossa vor osteogener Differenzierung zeigte sich im Abdomen. Die Mineralisation im Oberschenkel war etwas geringer ausgeprägt als im Abdomen, aber höher als in der Flankenregion.



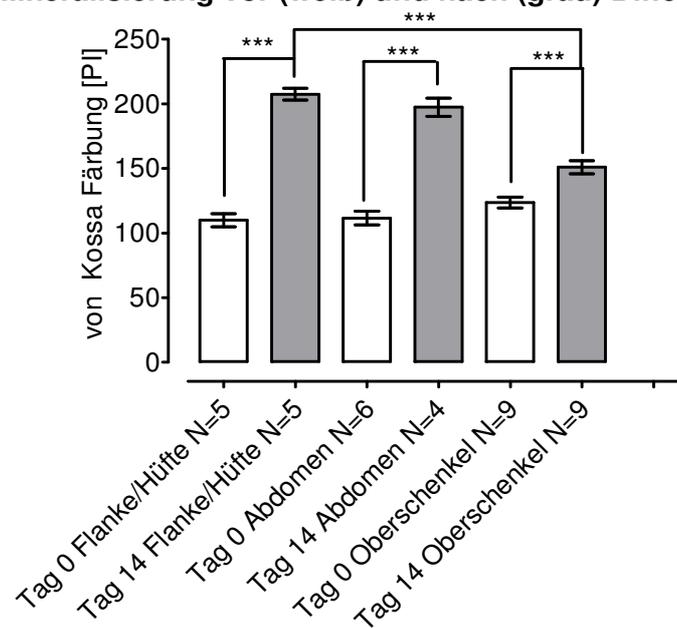
**Abbildung 12: Von Kossa Färbung, Tag 16**  
von links nach rechts: Flanke/Hüfte, Abdomen, Oberschenkel

**Matrix Mineralisierung nach Differenzierung**

**Abbildung 13: Matrix Mineralisierung nach osteogener Differenzierung.** Hier waren signifikante Unterschiede sowohl zwischen der Region Flanke/Hüfte und dem Oberschenkel, sowie zwischen Abdomen und Oberschenkel zu erkennen. Zwischen Flanke/Hüfte und Abdomen waren keine signifikanten Unterschiede nachweisbar.

Nach Abschluss der Differenzierung zeigte sich eine deutliche Zunahme der Mineralisierung aus den Proben der Flanke/Hüftregion sowie des Abdomens. Die Mineralisierung des Oberschenkels war wesentlich geringer ausgeprägt als aus den anderen Regionen und zeigte des Weiteren eine geringere Zunahme. Allerdings war im Vergleich der Tage 0 und 14 in jeder der drei Versuchsgruppen ein signifikanter Anstieg der Matrix-Mineralisierung vorhanden. Dies weist auf die erfolgreiche osteogene Differenzierung der Ad-MSCs hin und beweist die Ausbildung einer Knochenmatrix. Die höchste Mineralisierung in der Von Kossa Färbung ist in der Flanken/Hüftregion erreicht worden. Dies passt zu den initial ermittelten hohen Werten der AP-Aktivität der Ad-MSCs dieser Körperregion.

### V. Kossa: Mineralisierung vor (weiß) und nach (grau) Differenzierung

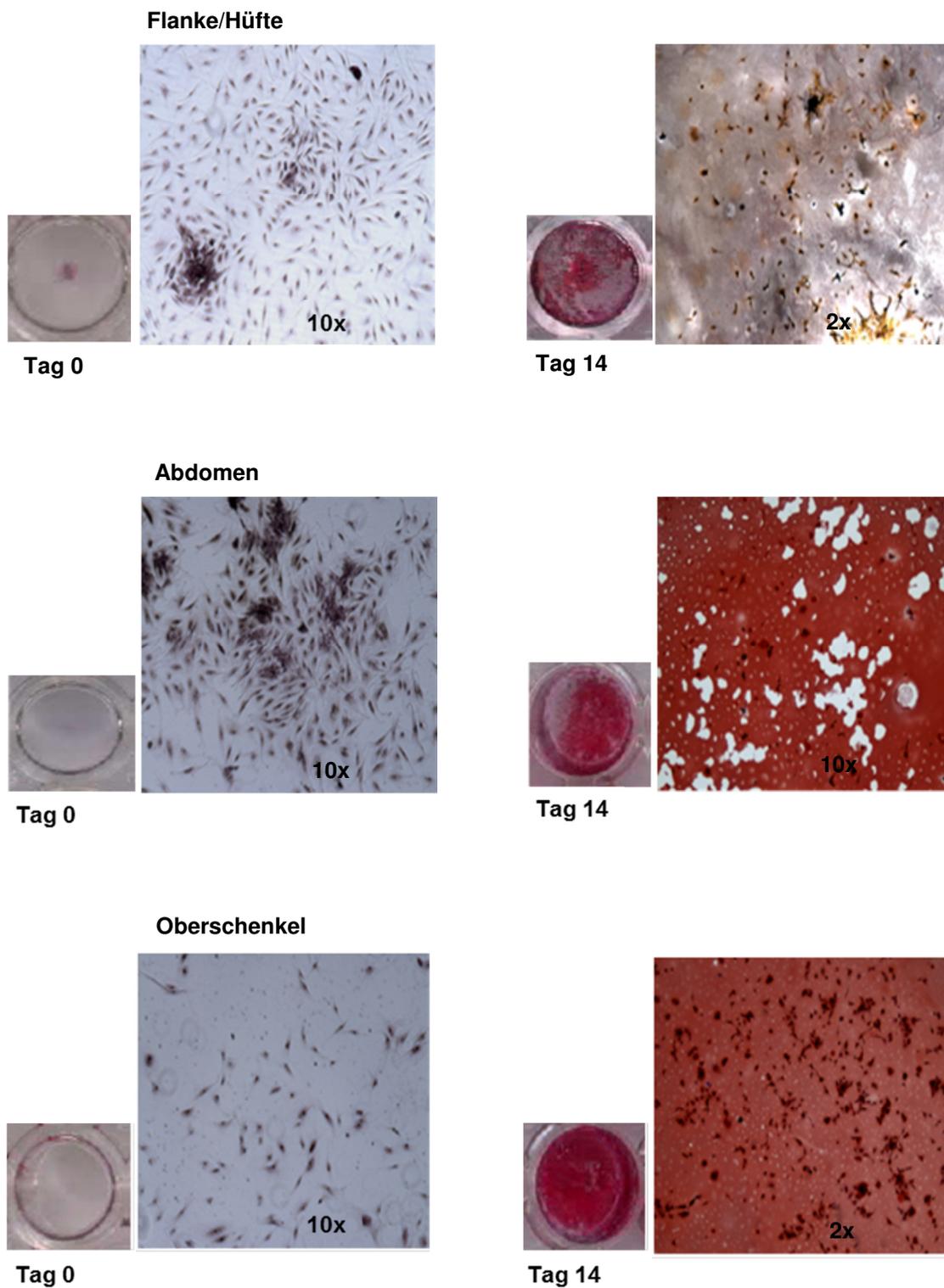


**Abbildung 14: Vergleich der Matrix- Mineralisierung von Tag 0 und 14 sowie zwischen den einzelnen Körperregionen.**

Dabei zeigten sich signifikante Unterschiede in der Mineralisierung aller 3 untersuchten Körperregionen zwischen Tag 0 und Tag 14.

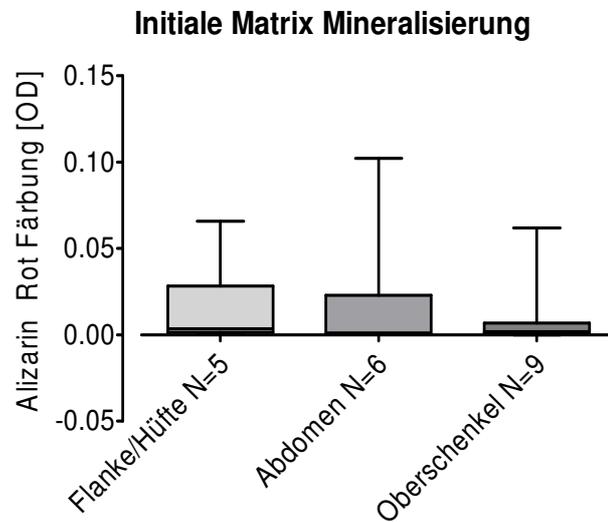
#### 3.3.2 Alizarin Rot Färbung

Alizarin Rot stellt eine weitere Möglichkeit dar, die Matrix-Mineralisierung zu quantifizieren und so die Differenzierung der Ad-MSCs in Osteozyten nachzuweisen. Dazu wurde die Färbung an Tag 0 sowie an Tag 14 der Versuchsreihe ausgeführt.



**Abbildung 15: Alizarin Rot Färbungen** der Regionen Flanke/Hüfte, Abdomen und Oberschenkel an Tag 0 sowie Tag 14. An Tag 14 ist in allen Regionen eine deutlich mineralisierte Matrix nachzuweisen, während diese an Tag 0 erwartungsgemäß nicht vorhanden war.

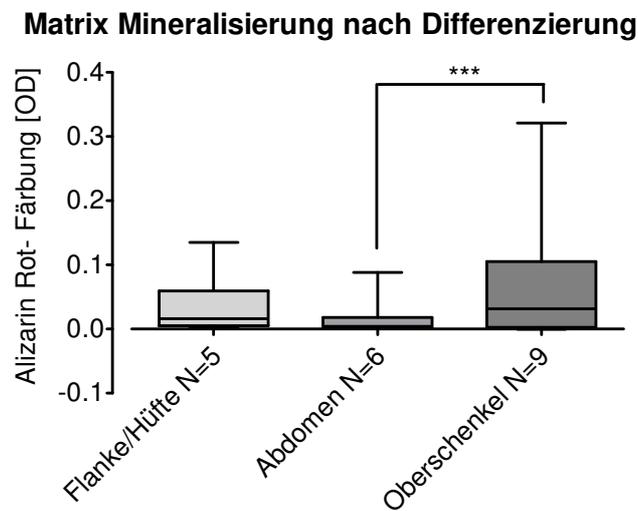
### Alizarin Rot Färbung vor osteogener Differenzierung



**Abbildung 16: Alizarin Rot Färbung** von Oberschenkel, Flanke und Abdomen vor osteogener Differenzierung. Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Matrix-Mineralisierung zwischen den Regionen Flanke/Hüfte, Abdomen und Oberschenkel.

An Tag 0 vor Beginn der osteogenen Differenzierung waren erwartungsgemäß zwischen Flanke/Hüfte, Oberschenkel und Abdomen keine signifikanten Unterschiede der Matrix-Mineralisation nachzuweisen. Hier konnte sich, wie in der Von Kossa Färbung, kaum Farbstoff ablagern, da noch keine Knochenmatrix vorhanden war.

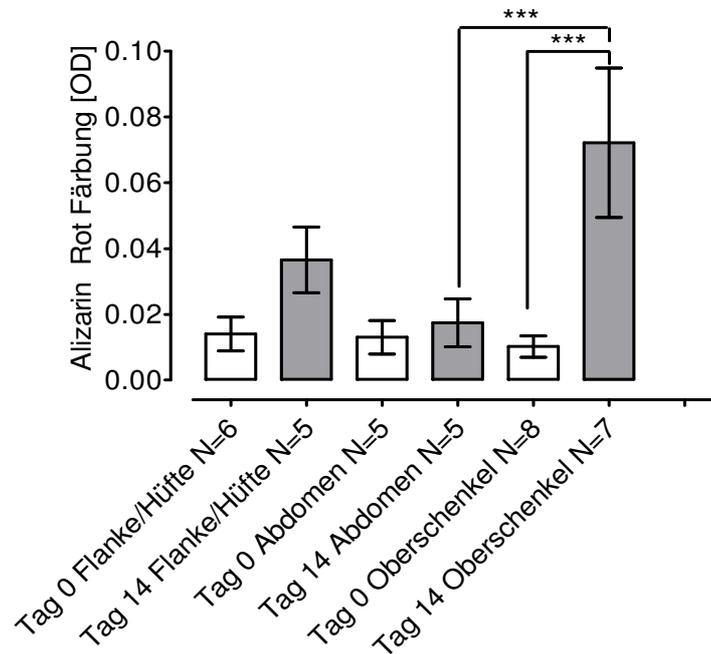
### Alizarin Rot Färbung nach osteogener Differenzierung



**Abbildung 17: Alizarin Rot Färbung nach osteogener Differenzierung.** Ein signifikanter Unterschied der vorhandenen Matrix-Mineralisierung war nur zwischen dem Abdomen und Oberschenkel vorhanden. Zwischen den anderen Regionen bestanden keine signifikanten Unterschiede.

Bei der Alizarin Rot Färbung war die höchste Matrixmineralisation nach Differenzierung im Oberschenkel zu beobachten, während die niedrigste im Abdomen vorlag. Die Flankenregion zeigte eine geringere Matrixmineralisation als der Oberschenkel, jedoch mehr als im Abdomen.

**A. Rot: Mineralisierung vor (weiß) und nach (grau) Differenzierung**

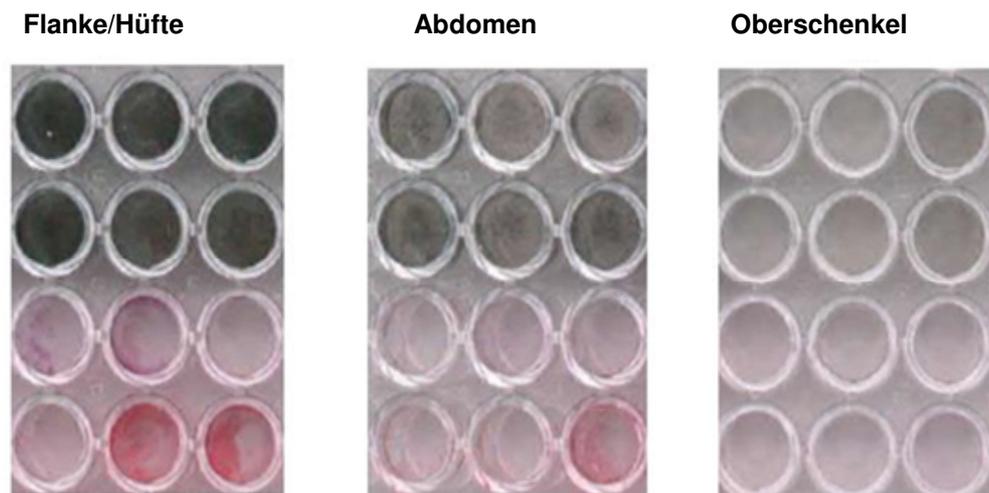


**Abbildung 18: Mineralisierung der Regionen Flanke/Hüfte, Oberschenkel und Abdomen vor und nach osteogener Differenzierung.** Signifikante Unterschiede zeigten dabei das Abdomen und der Oberschenkel an Tag 14 sowie der Oberschenkel an Tag 0 und Tag 14.

Signifikante Unterschiede in der Mineralisation zwischen Tag 0 und Tag 14 sind bei der Alizarin Rot Färbung nur aus der Region des Oberschenkels zu verzeichnen. Interessanterweise war die initiale AP-Aktivität des Oberschenkels unter derjenigen der Flanken/Hüftregion, welche in der Alizarin Rot Färbung keinen signifikanten Unterschied in der Zunahme der Matrixmineralisierung zeigte. Der Unterschied in der Mineralisierung des Abdomens zwischen Tag 0 und 14 war ebenfalls nicht signifikant.

### 3.3.3 Zusammenfassung der Matrix-Färbungen: In der Flanken/Hüftregion wurde die höchste Matrix-Mineralisation nachgewiesen

Nach der Differenzierung war die meiste Mineralisierung in den Ad-MSCs der Flanken/Hüftregion (210 p.I; Pixel Intensität) nachzuweisen, gefolgt von abdominellen Ad-MSCs (200 p.I.) und Oberschenkel-Ad-MSCs (200 p.I.). Dies korreliert mit der initialen AP-Aktivität an Tag 0, die in den Ad-MSCs der Flanken/Hüftregion am höchsten war. AP-Aktivität wird oft als Stammzellmarker verwendet. Zusammenfassend ist festzustellen, dass Ad-MSCs durch Zugabe eines osteogenen Kulturmediums und Kultivierung über 14 Tage die Fähigkeit besitzen, sich in Osteoblasten-ähnliche Zellen zu differenzieren und extrazelluläre Matrix zu bilden.



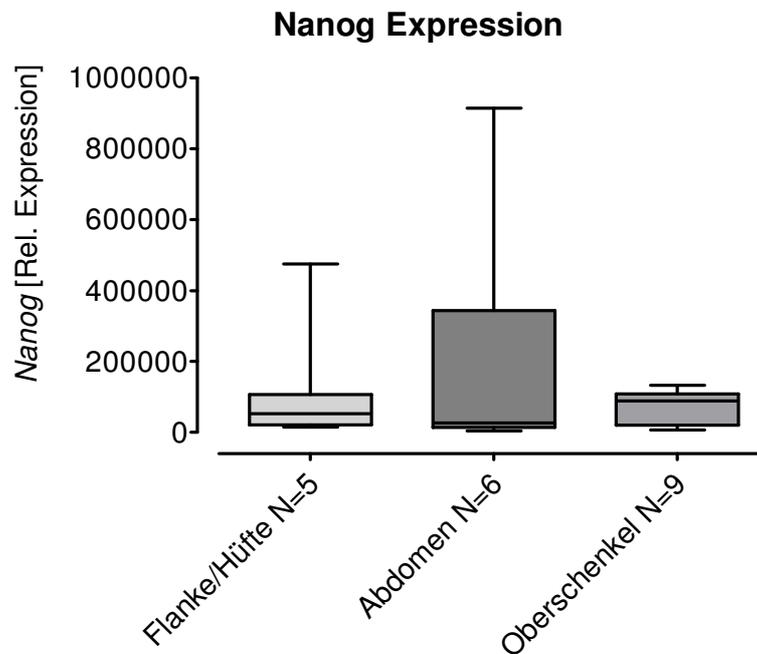
**Abbildung 19: Von Kossa und Alizarin Rot Färbung** von Abdomen, Flanke/Hüfte und Oberschenkel desselben Spenders an Tag 14

Auffallend ist, dass obwohl in der Region des Oberschenkels die Alizarin Rot Färbung die ausgeprägteste Matrix-Mineralisierung nachweist, diese in der Von Kossa Färbung im Vergleich zu den anderen Körperregionen am niedrigsten ist. Eine ausgeprägte Mineralisierung in beiden Matrix-Färbungen wurde in der Flanken/Hüftregion erhalten.

### 3.4 Genexpression der STZ-Marker vor osteogener Differenzierung

Um die Ad-MSCs zu charakterisieren und deren Stammzeleigenschaften nachzuweisen, wurden vor Beginn der Differenzierung von den ausplattierten Zellen RT-PCR's durchgeführt, um die Stammzellmarker Nanog, Oct-4 und SOX-2 nachzuweisen. Dabei wurden die zuvor in Zellkulturflaschen kultivierten Ad-MSCs in 6-Well Platten ausgestreut, nach zwei Tagen abgekratzt und anschließend für die PCR aufbereitet.

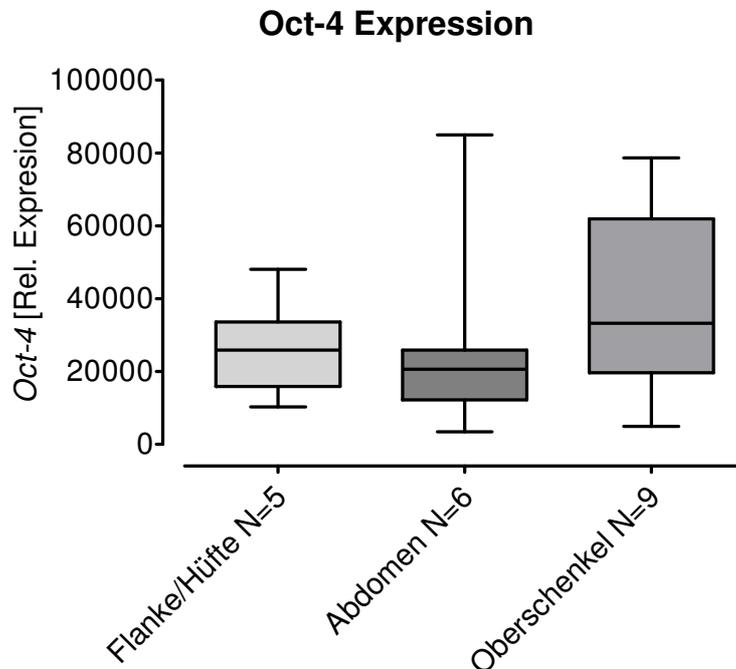
#### 3.4.1 Genexpression von Nanog



**Abbildung 20: Genexpression des Stammzellmarkers Nanog vor Beginn der Differenzierung.** Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Expressionsrate nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der PCR vor osteogener Differenzierung zeigen eine niedrige Expression des Stammzellmarkers Nanog in der Flanken/Hüftregion, trotz der hohen initialen AP-Aktivität und der Matrix-Mineralisierung an Tag 14.

### 3.4.2 Genexpression von Oct-4

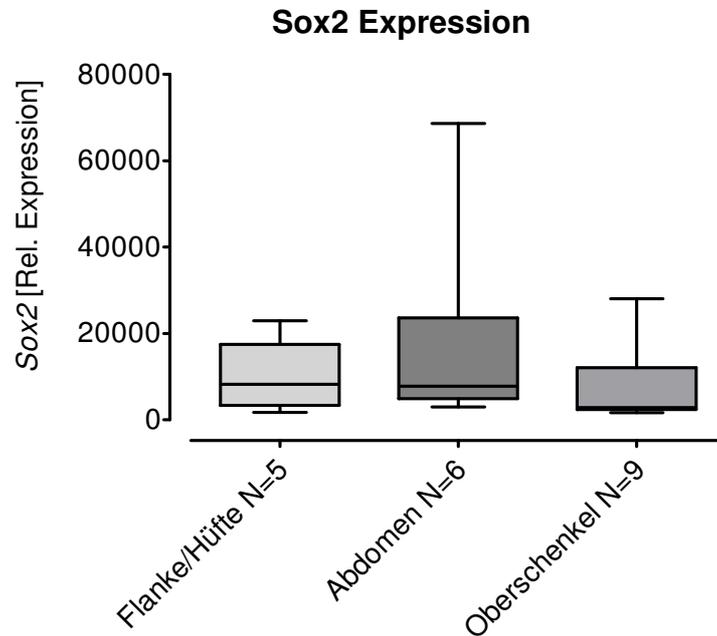


**Abbildung 21: Genexpression des Stammzellmarkers Oct-4 vor Beginn der Differenzierung.** Die Expressionsraten der drei Regionen zeigten keine signifikanten Unterschiede.

Der Stammzellmarker Oct-4 zeigt in allen Ad-MSCs der unterschiedlichen Regionen eine etwas erhöhte Tendenz.

Trotz der geringsten Mineralisierungstendenz in den Matrixfärbungen zeigt die Oct-4 Expression aus den aus dem Oberschenkel isolierten Ad-MSCs eine etwas erhöhte Expression. Diese fällt trotz der initial höheren AP-Aktivität der Flanken/Hüftregion und der besseren Mineralisierung in der Alizarin Rot Färbung des Abdomens in diesen beiden Regionen niedriger aus.

### 3.4.3 Die Genexpression von Sox 2 zeigt in allen Regionen niedrige Werte



**Abbildung 22: Genexpression des Stammzellmarkers Sox-2 vor Beginn der Differenzierung.** Wie bei Nanog und Oct-4 konnten ergaben sich bei Sox-2 keine signifikanten Unterschiede.

Die Sox-2 Expression zeigte sich in den Ad-MSCs aller drei Regionen nur gering eleviert. Es war eine leichte Erhöhung des Stammzellmarkes im Abdomen zu erkennen. Die geringste Sox-2 Expression zeigten die Ad-MSCs aus der Region des Oberschenkels.

### 3.4.4 Zusammenfassung der PCR Ergebnisse

Insgesamt ist zusammenzufassen, dass interessanterweise in der Flanken/Hüftregion keiner der Stammzellmarker Nanog, Sox-2 und Oct-4 signifikant erhöht war, obwohl diese Region die deutlichste Matrix-Mineralisation in der Von Kossa und Alizarin Rot Färbung aufwies.

Des Weiteren zeigt jedoch der Stammzellmarker Oct-4 in der Oberschenkelregion eine leicht erhöhte Tendenz, obwohl in diesem Bereich die

niedrigste Matrix-Mineralisierung nachzuweisen war. Oct-4 zeigte sich des Weiteren in den Ad-MSCs aller untersuchten Körperregionen leicht erhöht.

#### 3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Ergebnisse des Experimentes zeigen, dass die Herkunft der Ad-MSCs die osteogene Differenzierung beeinflussen kann. Während der Kultur konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Morphologie und Proliferation der Ad-MSCs verschiedener Körperregionen beobachtet werden. Die initiale Matrixmineralisierung zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Ad-MSCs verschiedenen Ursprungs.

In meinem Experiment zeigten die Ad-MSCs der Flanken/Hüftregion das beste osteogene Differenzierungspotential, gefolgt vom Abdomen. Die Flanken/Hüftregion weist eine relativ stabile Expression von Nanog, Oct-4 und Sox-2 auf.

In den Ergebnissen der Alizarin-Rot-Färbung kann eine Korrelation mit der initialen AP-Aktivität gesehen werden. Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase wird oft als Stammzellmarker herangezogen und ist vor Differenzierung in der Flanken/Hüftregion am Höchsten, während das initiale Mineralisierungspotenzial niedrig war.

Im Oberschenkel war die AP-Aktivität vor Differenzierung niedrig, während sich die Oct-4 Expression hier höher als in den anderen Körperregionen zeigte. Trotz der hohen Oct-4- Expression war diejenige von Nanog und Sox-2 unter dem Level der beiden anderen Regionen. Im Abdomen ließ sich eine hohe Expression aller drei untersuchten Stammzellmarker beobachten.

Einige Körperregionen mussten als Ressource für Fettgewebe verworfen werden, da von Ihnen zu selten Gewebe aus der BG- Klinik Tübingen zu erhalten war. Dazu gehörten sowohl der Arm als auch der Unterschenkel. Fettgewebe aus der Flanke, des Abdomens und des Oberschenkels waren öfter und auch in größerer Menge vorhanden.

## 4 Diskussion

### „Tir Nan Og“ – Das Land der ewigen Jugend

Kommen wir durch den unermüdlichen Arbeitseifer vieler Wissenschaftler weltweit diesem Traum näher? Durch den Einsatz von Stammzellen in der Medizin entstehen derzeit viele neue, bis dahin unbekannte Therapiemöglichkeiten.

Stammzellen können in vielen verschiedenen Bereichen eingesetzt werden.

Die in dieser Arbeit forcierte Gewinnung von mesenchymalen Stammzellen aus Fettgewebe und deren osteogene Differenzierung zeigt eine Möglichkeit auf, Osteoblasten aus eigenem Körperfett zu gewinnen und so einen autologen Ersatz für defekten Knochen zu erhalten.

Für die erfolgreiche Rekonstruktion von großflächigen Knochendefekten ist es wichtig, dass Ausgangszellen zur Verfügung stehen, die zum einen in großer Anzahl verfügbar sind und zum anderen ausreichende Stammzellfunktionen besitzen. Diese beinhalten sowohl das Potential, dass sich die Zellen selbst erneuern können sowie Multipotenz besitzen. Daneben muss die Fähigkeit zur Selbsterneuerung auch für die Tochtergenerationen gegeben sein [57] [76].

In den durch die Experimente gewonnenen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass sich die Ad-MSCs aus dem Fettgewebe der Flanken/Hüftregion des menschlichen Körpers leicht isolieren und kultivieren lassen. Ebenso ist es möglich, eine osteogene Differenzierung zu Osteoblasten-ähnlichen Zellen zu induzieren, was durch die Matrixfärbungen bewiesen werden konnte.

Erwartungsgemäß war es möglich, durch enzymatischen Verdau mit Kollagenase II und Zentrifugation Ad-MSCs aus Fettgewebe zu isolieren [77].

Bereits 2012 wurde von Banas postuliert, dass aus abdominalem Fett reichlich Ad-MSCs zu isolieren sind und dieses des Weiteren leicht zugänglich ist [77]. Dies konnte durch die vorliegenden Ergebnisse bestätigt werden. Aus allen drei untersuchten Körperregionen waren Ad-MSCs aus Fettgewebe isolierbar und konnten in ausreichender Menge kultiviert werden. Während des

Versuchsablaufes mussten jedoch verschiedene Herkunftsregionen der Ad-MSCs, wie Ober-/Unterarm und der Unterschenkel aus den Experimenten genommen werden. Aus diesen Regionen standen zu wenige Spender zur Verfügung. Hier könnte durch Kooperation mit mehreren Kliniken Abhilfe geschaffen werden.

Der Einsatz von FBS für die Kultur von Ad-MSCs wurde bereits kritisch hinterfragt, da es Hinweise auf die Möglichkeit einer Kontamination durch Zoonosen gab und die Immunogenität gesteigert wurde [78]. Durch die Nutzung eines speziellen Protokolls nach Spees kann jedoch ein Großteil des FBS wieder von den Zellen entfernt und so die Immunogenität gesenkt werden [79]. In einigen Spenderproben ergab sich jedoch das Problem durch Verunreinigung mit nicht näher untersuchten Keimen, welches in den ersten Versuchsreihen nicht aufgetreten war. Dieses Problem konnte auch durch mehrmaliges neues Herstellen des Kulturmediums als auch des osteogenen Mediums in einigen Zellreihen nicht beherrscht werden, sodass diese Kulturen entsorgt werden mussten. In Zukunft muss selbstverständlich sowohl auf das keimarme Arbeiten unter der Sterilbank, als auch bereits bei der Fettentnahme auf Sterilität geachtet werden.

Um eine gleichmäßige Ausgangsposition für das Wachstum der Ad-MSCs zu schaffen, wurden standardisiert 10.000 Zellen/ cm<sup>2</sup> ausplattiert. Laut Colter et al kann eventuell ein schnelleres Wachstum der MSCs erreicht werden, wenn pro cm<sup>2</sup> eine geringere Zellanzahl ausgesät wird [80].

Zur osteogenen Differenzierung der Ad-MSCs wurde ein osteogenes Differenzierungsmedium mit HEPES, L-Ascorbin-2-Phosphat, BGP und 1 $\alpha$ , 25-Dihydroxycalciferol auf DMEM- Basis verwendet. Aufgrund früherer Studien wurde anstatt Dexamethason Dihydroxycalciferol verwendet [61] [62]. Dieses induziert die Expression von BMP-2 und wirkt somit bei der osteogenen Differenzierung mit [63]. Die osteogene Differenzierung konnte durch Einsatz dieses Medium in allen isolierten Ad-MSCs eingeleitet werden. Die Ad-MSCs

wurden für 14 Tage mit dem osteogenen Differenzierungsmedium behandelt, wobei das Medium alle 2-3 Tage gewechselt wurde.

Bereits 2001 wurde nachgewiesen, dass durch Zugabe von Ascorbinsäure und BGP zu kultivierten Osteoblasten diese eine ausgeprägte Extrazellulärmatrix bilden [67]. Durch Zugabe der oben genannten Stoffe in das osteogene Kulturmedium konnte eine ausreichende Mineralisierung und Bildung der EZM erfolgen.

Durch die *in vivo* Gabe von Basic- Fibroblastenwachstumsfaktor (Fibroblast Growth Factor, bFGF) an Ratten war es nach Nakamura et al. möglich, die Rekrutierung von Präosteoblasten und die Knochenneubildung zu steigern [81]. Eventuell könnte eine Zugabe von FGF zu osteogen differenzierten Ad-MSCs zu einer Verbesserung der osteogenen Differenzierungsfähigkeit bzw. einer verbesserten Matrixbildung führen.

Durch die Matrixfärbungen von Kossa und Alizarin Rot konnte nach 14 Tagen die Existenz einer Knochenmatrix nachgewiesen werden. An Tag 0 fielen diese Färbungen erwartungsgemäß negativ aus. Die Alizarin Rot Färbung der Region Flanke/Hüfte fiel an Tag 14 geringer als im Oberschenkel aus, trotz der initial höchsten AP-Aktivität. Eventuell kann es hier während des Färbeverfahrens zur Verfälschung der Ergebnisse durch abplättern der Farbe gekommen sein.

Um die osteogene Differenzierung bzw. das Vorliegen von Osteoblasten-ähnlichen Zellen nachzuweisen, könnten neben der von Kossa und Alizarin Rot Färbung Osteoblasten spezifische Marker wie Knochensialoprotein (BSP) oder Osteocalcin untersucht werden [82].

Aufgrund der Zellkultur in Kulturflaschen wurden in diesem Experiment nur Aussagen zum 2-D Wachstum der differenzierten Zellen erhalten. Gegenstand zukünftiger Forschung sollte eine 3-D Kultur sein, um das Wachstumsverhalten der Zellen genauer definieren zu können. Dies ist wichtig für das Einwachsen der Osteoblasten im Knochen *in vivo*. MSCs könnten so z.B. mit synthetischem oder autologen Trägermaterial zum Knochenaufbau eingesetzt werden. Für B-

MSCs wurde eine solche Kultivierung bereits erfolgreich beschrieben. Als Trägermaterial diente Kollagen-Fleece, welches mit Hydroxylapatit beschichtet war [42]. Für die Art des eventuellen Einsatzes von Ad-MSCs als Osteoblasten-ähnliche Zellen für die Regeneration von Knochendefekten gibt es verschiedene Ansätze. Zu denken ist z.B. eine Infusion von Ad-MSCs mit Zugabe osteogener Substanzen *in vivo* oder einen Einsatz der Ad-MSCs in Kombination mit einem Scaffold *in vitro* und anschließender Implantation in das geschädigte Gewebe. In Mäusen wurde bereits nachgewiesen, dass bei der Implantation von mit ESZ beschichteten Polyhydroxyapatit- Composite-Scaffolds eine signifikante Knochenbildung erreicht werden kann [83]. Diese Versuche könnten auch mit Ad-MSCs durchgeführt werden, um festzustellen, ob damit vergleichbare Ergebnisse erzielbar wären.

In meinem Experiment wurden die Stammzellmarker Nanog, Oct-4 und Sox-2 bestimmt.

Oct-4 zeigte in allen untersuchten Körperregionen eine erhöhte Expression, während Nanog nur im Abdomen eleviert war. Interessanterweise war Sox-2 im Vergleich zu Oct-4 nur im Abdomen erhöht. Beide sind jedoch synergistisch an der Aktivierung der Transkription von Zielgenen beteiligt [17]. Zu beachten ist auch die Tatsache, dass trotz der hohen initialen AP-Aktivität in der Flanke/Hüfte die Expression der Stammzellmarker in dieser nicht signifikant erhöht war. Eventuell lässt sich dies dadurch erklären, dass die terminale Differenzierung der Ad-MSCs zu Versuchsbeginn schon eingesetzt hatte und dies zu einer verringerten Expression der STZ-Marker führte. Ungeachtet dessen konnte durch die Von Kossa Färbung eine ausgeprägte Matrix-Mineralisation nachgewiesen werden. Die beiden Regionen Flanke/Hüfte und Oberschenkel, welche die niedrigste Nanog Expression aufwiesen, hatten zu Beginn der Experimente jedoch die höchste AP-Aktivität. Demgegenüber steht das Abdomen, in dem eine hohe Expression von Nanog nachzuweisen war, jedoch die geringste AP-Aktivität der drei Körperregionen. Dies wirft die Frage auf, ob eine hohe Expressionsrate der Stammzellmarker auch die beste Ausgangsposition für eine osteogene Differenzierung bietet, oder welche

anderen Faktoren noch eine wichtige Rolle spielen. Eventuell ist für die Zielgene auch eine niedrigere Expression von Nanog als von den anderen beiden STZ-Markern nötig, um Ihre Aufgaben zu erfüllen.

Im Tierversuch mit Kaninchen konnte die osteogene Differenzierungskapazität von Ad-MSCs verbessert werden, indem zusätzlich Oct-4 über Lentiviren in die Ad-MSCs eingeschleust wurde [84]. In meinen Versuchen zeigte sich jedoch trotz niedriger Expression von Oct-4 eine ausgeprägte Mineralisierung, vor allem im Bereich Flanke/Hüfte.

Interessanterweise ergaben die Experimente von Ding 2012, dass eine Überexpression von Sox-2 in C3H10T1/2 Zellen zwar die Proliferation fördert, die osteogene Differenzierung jedoch hemmt [15]. Demgegenüber stehen Ergebnisse, nach denen trotz Überexpression von Sox-2 in humanen MSCs deren Fähigkeit erhalten bleibt, sich in Osteoblasten zu differenzieren [85]. Die Sox-2 Expression ist des Weiteren abhängig von der Zell-Passage sowie deren Ursprungsgewebe [86].

Durch eine Inaktivierung von Sox-2 in Osteoblasten wird deren osteogenes Differenzierungspotenzial stark beeinträchtigt. Eine Überexpression von Sox-2 ist also nötig, um die Proliferation von Osteoblasten aufrechtzuerhalten, während dies für die osteogene Differenzierung hinderlich ist. Für letztere ist zwar eine Sox-2 Expression nötig, jedoch in geringerem Umfang [13]. In den durchgeführten Experimenten zeigte sich die Expression von Sox-2 in den unterschiedlichen Regionen als basal überall vorhanden, jedoch gering exprimiert. Dies spricht dafür, dass eine niedrige Expression von Sox-2 in Ad-MSCs deren osteogene Differenzierung erlaubt.

Aufgrund der Charakterisierung der Stammzellmarker vor Beginn der Differenzierung war es möglich, das Stammzellpotential der Ad-MSCs zu definieren. In weiteren Versuchen sollten die Stammzellmarker nach Ende des Differenzierungsprozesses bestimmt werden, um das Verhalten des Stammzellpotenzials untersuchen zu können.

Für das Gelingen der osteogenen Differenzierung gilt es auch zu beachten, dass bei älteren Fettspendern durch eine erhöhte Sox-2, sowie erniedrigte

Nanog, Oct-4 und Lin28A-Expression ein vermindertes osteogenes Differenzierungspotenzial der Ad-MSCs auftritt [57]. Ebenso ist bei diesen Spendern die Proliferationsrate eingeschränkt. Durch die Behandlung der Ad-MSCs mit 5-Azacytidin ist es möglich, deren DNS zu demethylieren, was wiederum zu einer höheren Expressionsrate der Stammzellmarker führt und die osteogene Differenzierung verbessert. Durch diese Versuche von Yan et al. könnte eine Verbesserung des Einsatzes von Ad-MSCs auch bei alten Menschen, sowie eventuell bei Fettgewebe aller Regionen gelingen [57].

Eine mögliche maligne Transformation der MSCs sollte nicht außer Acht gelassen werden, auch wenn diese bisher nicht nachgewiesen wurde [36]. Deshalb sollte in Zukunft die Regulation und Funktion der Ad-MSCs genauer untersucht werden, da unter anderem in einer Studie von Shigemura et al. nach Gabe von MSCs deren Verbleib nicht genau dokumentiert werden konnte [40].

### **Limitierungen der Studie**

Durch den Versuchsaufbau ergaben sich Limitierungen, die in folgenden Experimenten berücksichtigt werden sollten.

Je Körperregion wurden zwischen 4 und 9 Spender in die Ergebnisse miteinbezogen. Durch diese limitierte Anzahl ist die Aussagekraft des Experimentes begrenzt. Mit einer größeren Anzahl an Spendern aus der Flanken/Hüftregion könnten die Versuche wiederholt werden um die Reliabilität der erhobenen Daten zu erhöhen. Auch bezüglich des Alters könnte die Fähigkeit zur osteogenen Differenzierung weiter spezifiziert werden.

Um festzustellen, welche Anzahl an Stammzellen aus einer gewissen Menge Fettgewebe isoliert werden kann, wäre es denkbar, bei Wiederholen der Experimente vor Isolierung das Gewicht des Gewebes zu bestimmen. So ließen sich standardisierte Entnahmeverfahren zum einen für die Ursprungsregion des Fettes als auch für dessen Umfang festlegen.

### Ausblick

Durch die vielfältigen Einsatzmöglichkeiten der Ad-MSCs werden sich in Zukunft viele neue mögliche Therapieansätze ergeben.

Es gilt, die Isolation der Ad-MSCs sowie deren Kultur genauer zu definieren, um die maximale Anzahl an geeigneten Zellen zu erhalten. Ebenso ist es wichtig, aus der bisherigen 2D eine 3D-Zellkultur zu erreichen, die für den Einsatz in der Therapie von dreidimensionalen Knochendefekten nötig ist.

Denkbar ist ein Einsatz der Ad-MSCs sowohl mit als auch ohne Trägermaterial im Bereich des Tissue Engineering [87] [88], bei Krankheiten wie Osteoporose, Osteogenesis Imperfecta [89] sowie als Entzündungsinhibitoren, Immunsuppressiva und als Übertragungsvektoren in Gentherapien [37].

Die erfolgreiche Differenzierung zu Osteoblasten-ähnlichen Zellen *in vitro* muss ebenfalls *in vivo* untersucht werden.

Auf jeden Fall stellen Ad-MSCs eine gute Alternative zu embryonalen Stammzellen dar, deren Einsatz durchaus kontrovers diskutiert wird.

Es bleibt festzuhalten, dass es bisher trotz intensiver Forschung nicht gelungen ist, sowohl für den Patienten als auch wirtschaftlich zufriedenstellende Ergebnisse der Heilung großer Knochendefekte zu verwirklichen. Deshalb ist eine weitere intensive Forschung an mesenchymalen Stammzellen, die sehr vielversprechend scheint, für die Zukunft unabdingbar.

## 5 Zusammenfassung

Es war bisher bereits bekannt, dass Fettgewebe eine gute Quelle für Ad-MSCs darstellt. Nichtsdestotrotz wurde ihr osteogenes Potenzial oft unzureichend beschrieben. Bis jetzt ist nicht bekannt, welche Rolle die verschiedenen Körperregionen spielen. Deshalb war es Ziel dieser Arbeit, das osteogene Differenzierungspotenzial der verschiedenen Regionen zu vergleichen.

Die Ad-MSCs der Flanken/Hüftregion, des Abdomens und des Oberschenkels wurden durch Kollagenase-Verdau aus Fettgewebe isoliert. Durch ein osteogenes Differenzierungsmedium, mit dem die ausplattierten Ad-MSCs 14 Tage lang behandelt wurden, konnte die Osteogenese induziert werden. Die differenzierten Zellen wurden sowohl auf ihre AP-Aktivität als auch auf Matrix-Mineralisation mittels von Kossa und Alizarin Rot – Färbungen analysiert. Des Weiteren wurden undifferenzierte Ad-MSCs auf die Expression der Stammzellmarker Nanog, Sox-2 und Oct-4 durch RT-PCR untersucht.

Nach der osteogenen Differenzierung war die beste Mineralisierung in der Flanken/Hüftregion festzustellen, gefolgt vom Abdomen. Die Flanken/Hüftregion weist eine mehr oder weniger stabile Expression von Nanog, Oct-4 und Sox-2 auf. In den Ergebnissen der Mineralisierung kann eine Korrelation mit der initialen AP-Aktivität festgestellt werden. Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase wird oft als Stammzellmarker herangezogen und ist vor Differenzierung in der Flanken/Hüftregion am Höchsten, während das initiale Mineralisierungspotenzial niedrig ist. Im Oberschenkel ist die AP-Aktivität vor Differenzierung niedrig, während die Oct-4 Expression hier höher ist als in den anderen Körperregionen. Trotz der hohen Oct-4 Expression ist diejenige von Nanog und Sox-2 unter dem Level der beiden anderen Regionen. Im Abdomen ist eine hohe Expression aller drei untersuchten Stammzellmarker zu beobachten. Aus den durchgeführten Experimenten lässt sich schließen, dass es möglich ist, osteogene Differenzierung in Ad-MSCs zu induzieren. Des Weiteren ist es wichtig, die Ursprungsregion der Ad-MSCs genau in Betracht zu ziehen. Abschließend bleibt festzustellen, dass die Ad-MSCs der Flanken/Hüftregion das beste osteogene Differenzierungspotenzial besitzen.

## 6 Veröffentlichungen

Postervorstellung bei den Chirurgischen Forschungstagen 2013 in Frankfurt am Main.



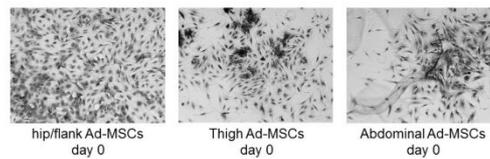
## Hipgold: The ideal source of AdMSCs for osteogenic differentiation

S. Arnold, X. Yan, A.K. Nüssler, S. Ehnert  
BG Trauma Center, Eberhard Karls Universität Tübingen, Tübingen, Germany

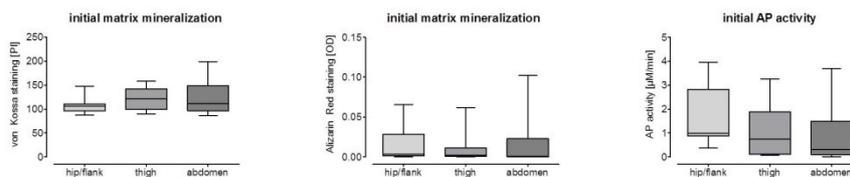
**Introduction:** It is well known, that fat tissue is a good source for mesenchymal stem cells (Ad-MSCs). As adults stem cells the isolated Ad-MSCs may differentiate in various cell types, mainly in the mesoderm lineage. Their osteogenic potential is nevertheless often critically discussed. Just recently we could show that with increasing donor age the hepatic and osteogenic differentiation potential of Ad-MSCs decreases. Other groups reported a similar effect dependent on the gender. However, until now it is obscure which role the location of the fat tissue in the body plays.

**Aim:** Aim of this study was to compare the osteogenic differentiation potential of AdMSCs of different body regions, namely flank/hip, abdomen and thigh.

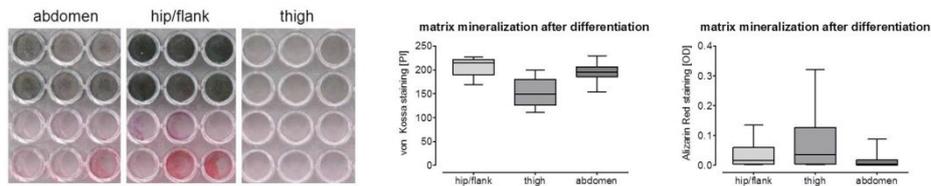
**Material/Methods:** Fat tissue was obtained from patients with their written consent according to the ethical guidelines of the BG trauma center, Tübingen. Ad-MSCs of the flank/hip, the abdomen and the thigh were isolated from adipose tissue by collagenase digestion. Osteogenesis was induced by cultivation in osteogenic differentiation medium for 14 days. The differentiated cells were analyzed for AP-activity and matrix-mineralization (Alizarin red and von Kossa staining). Undifferentiated cells were analyzed for the expression of stem cell markers Nanog, Sox-2 and Oct-4 by semi-quantitative RT-PCR.



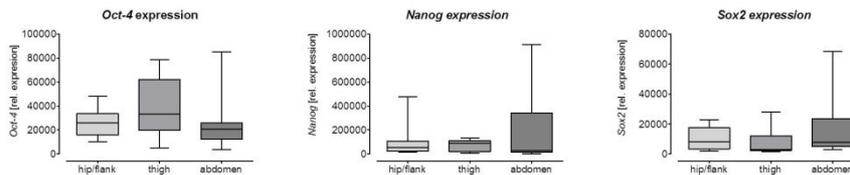
**Results:** During culture no significant differences between the Ad-MSCs obtained from the different body regions could be observed regarding morphology and proliferation, e.g. comparable amounts of cells could be obtained. There were no significant differences in the initial matrix mineralization observed, as determined by von Kossa and Alizarin Red staining. However, initial AP activity was highest in Ad-MSCs obtained from the hip/flank region (N = 5, n = 4), followed by the thigh region (N = 7, n = 4) and the abdominal region (N = 5, n = 4).



After differentiation most mineralization was obtained by Ad-MSCs of the flank/hip region (210 p.i.), followed by the abdominal Ad-MSCs (200 p.i.) and the thigh (150 p.i.). This correlates with the initial AP-activity (day 0), which was highest in the flank/hip Ad-MSCs (1.6-fold).



AP-activity is often used as a stem-cell-marker. Interestingly, none of the investigated stem cell markers is significantly elevated in flank/hip Ad-MSCs. However, Oct4 showed a tendency to be increased in Ad-MSCs from thigh, which showed the lowest mineralization.



**Conclusion:** Our results clearly show that it is possible to induce osteogenic differentiation in AdMSCs, however, the source of the AdMSCs needs to be clearly defined. In our experiments AdMSCs of the flank/hip region showed the best osteogenic differentiation potential.

Contact Information: Sigrid Arnold, BG Unfallklinik Tübingen, Schnarrenbergstr. 95, D-72076 Tübingen, Email: Sigrid-Annette.Arnold@student.uni-tuebingen.de

## 7 Literaturverzeichnis

1. Welsch, U. and T. Deller, *Sobotta Lehrbuch Histologie*. Vol. 3. 2010: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH. p. 65.
2. DFG.  
[http://dfg.de/dfg\\_magazin/forschungspolitik\\_standpunkte\\_perspektiven/stammzellenforschung/was\\_sind\\_stammzellen/index.html](http://dfg.de/dfg_magazin/forschungspolitik_standpunkte_perspektiven/stammzellenforschung/was_sind_stammzellen/index.html) Stand 17.06.2015.
3. Ogliari, K.S., et al., *Stem cells in dermatology*. *An Bras Dermatol*, 2014. **89**(2): p. 286-92.
4. National Institutes of Health, U.S.D.o.H.a.H.S., *Scientific Progress and Future Research Directions. In Stem Cell Information*, Bethesda. Stem Cells 2009.
5. Blau, H.M., T.R. Brazelton, and J.M. Weimann, *The evolving concept of a stem cell: entity or function?* *Cell*, 2001. **105**(7): p. 829-41.
6. Schöler, H., *Das Potential von Stammzellen – Ist der Mensch regenerierbar?* *Naturwissenschaftliche Rundschau* 2003. **56**: p. 525-539.
7. Hadenfeld, M., <http://www.eurostemcell.org/de/factsheet/reprogrammierung-wie-jede-zelle-des-körpers-zu-einer-pluripotenten-stammzelle-gemacht-werd> Stand 17.06.2015.
8. Henn, V.  
[http://www.google.de/imgres?imgurl=http://www.wissensschau.de/images/stammzellen/stammzellen\\_arten.jpg&imgrefurl=http://www.wissensschau.de/stammzellen/stammzellen\\_entwicklung\\_teilung.php&h=280&w=328&tbnid=6iVIRhXpPKu3IM:&tbnh=87&tbnw=102&usq=YjNR7TCUJzDWFrEJlgTHB-JI9b8=&docid=tllBMqOa9lOjoM&sa=X&ved=0CDYQ9QEwAmoVChMI4LPImtSexwIViIgUCh0MJQ7U](http://www.google.de/imgres?imgurl=http://www.wissensschau.de/images/stammzellen/stammzellen_arten.jpg&imgrefurl=http://www.wissensschau.de/stammzellen/stammzellen_entwicklung_teilung.php&h=280&w=328&tbnid=6iVIRhXpPKu3IM:&tbnh=87&tbnw=102&usq=YjNR7TCUJzDWFrEJlgTHB-JI9b8=&docid=tllBMqOa9lOjoM&sa=X&ved=0CDYQ9QEwAmoVChMI4LPImtSexwIViIgUCh0MJQ7U). Stand 10.08.2015.
9. Lüllmann-Rauch, R., *Taschenlehrbuch Histologie*. 2009: Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York. p. 144-165.
10. Friedenstein, A.J., et al., *Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues*. *Transplantation*, 1968. **6**(2): p. 230-47.
11. Zuk, P.A., et al., *Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells*. *Mol Biol Cell*, 2002. **13**(12): p. 4279-95.
12. Clara Sanz Nogués, M.C., (20. Juni 2012)  
<http://www.eurostemcell.org/de/factsheet/mesenchymale-stammzellen-die-%E2%80%9Eanderen-knochenmark-stammzellen> Stand 17.06.2015.
13. Basu-Roy, U., et al., *The transcription factor Sox2 is required for osteoblast self-renewal*. *Cell Death Differ*, 2010. **17**(8): p. 1345-1353.
14. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. *Cytotherapy*, 2006. **8**(4): p. 315-7.
15. Stem Cell Basics. In *Stem Cell Information*. Bethesda, M.N.I.o.H., U.S. Department of Health and Human Services, 2009  
<<http://stemcells.nih.gov/info/basics/Pages/Default.aspx> Stand 21.07.2015.
16. Zhang, H.a.W., Z. Z. , *Mechanisms that mediate stem cell self-renewal and differentiation*. *J. Cell. Biochem*, 2008(103): p. 709–718.

17. Boyer, L.A., et al., *Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells*. Cell, 2005. **122**(6): p. 947-56.
18. NIH. *Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions*. Department of Health and Human Services Juni 2001 Stand 14.08.2015].
19. Riekstina, U., et al., *Embryonic Stem Cell Marker Expression Pattern in Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow, Adipose Tissue, Heart and Dermis*. Stem Cell Reviews and Reports, 2009. **5**(4): p. 378-386.
20. Yu, J., et al., *Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells*. Science, 2007. **318**(5858): p. 1917-1920.
21. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell, 2004. **116**(2): p. 281-97.
22. Rizzino, A., *Sox2 and Oct-3/4: A Versatile Pair of Master Regulators that Orchestrate the Self-renewal and Pluripotency of Embryonic Stem Cells by Functioning as Molecular Rheostats*. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med, 2009. **1**(2): p. 228-36.
23. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. Cell, 2006. **126**(4): p. 663-76.
24. Scholer, H.R., et al., *New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4*. Nature, 1990. **344**(6265): p. 435-439.
25. Ryan, A.K. and M.G. Rosenfeld, *POU domain family values: flexibility, partnerships, and developmental codes*. Genes Dev, 1997. **11**(10): p. 1207-25.
26. Niwa, H., *How is pluripotency determined and maintained?* Development, 2007. **134**(4): p. 635-646.
27. Collignon, J., et al., *A comparison of the properties of Sox-3 with Sry and two related genes, Sox-1 and Sox-2*. Development, 1996. **122**(2): p. 509-20.
28. Ding, Daofang et al. *“Over-Expression of Sox2 in C3H10T1/2 Cells Inhibits Osteoblast Differentiation through Wnt and MAPK Signalling Pathways*. International Orthopaedics 36.5, 2012: p. 1087–1094.
29. Edinburgh, T.U.O. *Cells Of The Ever Young: Getting Closer To The Truth.* ScienceDaily. ScienceDaily, 2 June 2003. Stand 14.07.2015].
30. Okita, K., T. Ichisaka, and S. Yamanaka, *Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells*. Nature, 2007. **448**(7151): p. 313-7.
31. Chambers, I., et al., *Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells*. Cell, 2003. **113**(5): p. 643-55.
32. Darr, H., Y. Mayshar, and N. Benvenisty, *Overexpression of NANOG in human ES cells enables feeder-free growth while inducing primitive ectoderm features*. Development, 2006. **133**(6): p. 1193-201.
33. Zaehres, H., et al., *High-efficiency RNA interference in human embryonic stem cells*. Stem Cells, 2005. **23**(3): p. 299-305.
34. Cignarelli, A., et al., *Human adipose tissue stem cells: relevance in the pathophysiology of obesity and metabolic diseases and therapeutic applications*. Expert Rev Mol Med, 2012. **14**: p. e19.
35. Wang, S., X. Qu, and R.C. Zhao, *Clinical applications of mesenchymal stem cells*. J Hematol Oncol, 2012. **5**: p. 19.
36. Lalu, M.M., et al., *Safety of cell therapy with mesenchymal stromal cells (SafeCell): a systematic review and meta-analysis of clinical trials*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e47559.

37. Cook, D. and P. Genever, *Regulation of mesenchymal stem cell differentiation*. Adv Exp Med Biol, 2013. **786**: p. 213-29.
38. Chen, S.L., et al., *Improvement of cardiac function after transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in patients with acute myocardial infarction*. Chin Med J (Engl), 2004. **117**(10): p. 1443-8.
39. Nussler, A. and S.O. Sajadian, *Adult Stem Cells*, in *Stem-Cell Nanoengineering*. 2015, John Wiley & Sons, Inc. p. 1-23.
40. Shigemura, N., et al., *Autologous Transplantation of Adipose Tissue-Derived Stromal Cells Ameliorates Pulmonary Emphysema*. American Journal of Transplantation, 2006. **6**(11): p. 2592-2600.
41. Wyles, C.C., et al., *Mesenchymal stem cell therapy for osteoarthritis: current perspectives*. Stem Cells Cloning, 2015. **8**: p. 117-24.
42. Niemeyer, P., et al., *Mesenchymale Stammzellen zum Tissue Engineering von Knochen: Dreidimensionale osteogene Differenzierung auf mineralisiertem Kollagen*. Z Orthop Ihre Grenzgeb, 2003. **141**(06): p. 712-717.
43. Ehnert, S., *Mesenchymale Stammzellen aus Fettgewebe - Die bessere Alternative zu Knochenmarkszellen für das Tissue Engineering von Knochen?*, ed. J. Häuser, et al. Vol. 4. 2011. 3.
44. Hentz, V.R. and J. Chang, *Tissue Engineering for Reconstruction of the Thumb*. New England Journal of Medicine, 2001. **344**(20): p. 1547-1548.
45. Welsch, S. and T. Deller, *Sobotta Lehrbuch Histologie*. Vol. 3. 2010: Elsevier Verlag, München.
46. de Baat, P., M.P. Heijboer, and C. de Baat, *[Development, physiology, and cell activity of bone]*. Ned Tijdschr Tandheelkd, 2005. **112**(7): p. 258-63.
47. Katagiri, T. and N. Takahashi, *Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation*. Oral Dis, 2002. **8**(3): p. 147-59.
48. Marsell, R., and Thomas A. Einhorn. "THE BIOLOGY OF FRACTURE HEALING." *Injury* 42.6 (2011): p. 551-555.
49. Remedios, A., *Bone and bone healing*. Vet Clin North Am Small Anim Pract, 1999. **29**(5): p. 1029-44, v.
50. McKibbin, B., *The biology of fracture healing in long bones*. J Bone Joint Surg Br, 1978. **60-b**(2): p. 150-62.
51. R, B., *Osteoporose, Prävention-Diagnostik-Therapie*. 2010: Georg Thieme Verlag, Stuttgart - New York. p. 191-193.
52. Marsell, R. and T.A. Einhorn, *Emerging bone healing therapies*. J Orthop Trauma, 2010. **24 Suppl 1**: p. S4-8.
53. Dimitriou, R., et al., *Bone regeneration: current concepts and future directions*. BMC Medicine, 2011. **9**(1): p. 1-10.
54. Krappinger, D., et al., *Die Masquelet-Technik zur Behandlung großer dia- und metaphysärer Knochendefekte*. Operative Orthopädie und Traumatologie, 2015: p. 1-12.
55. Reichert, J.C., et al., *Knochen-Tissue-Engineering. Rekonstruktion Segmentaler Knochendefekte Kritischer Größe in der Schafstibia*. Der Orthopäde 41.4 2012. **280**.
56. Ehnert, S., et al., *Mesenchymale Stammzellen aus Fettgewebe. Die bessere Alternative zu Knochenmarkszellen für das Tissue Engineering von Knochen?* Regenerative Medizin 4(1), 2011.

57. Yan, X., et al., *5-Azacytidine Improves the Osteogenic Differentiation Potential of Aged Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells by DNA Demethylation*. PLoS One, 2014. **9**(3).
58. Granero-Molto, F., et al., *Regenerative effects of transplanted mesenchymal stem cells in fracture healing*. Stem Cells, 2009. **27**(8): p. 1887-98.
59. Ramazzotti, G., et al., *BMP-2 Induced Expression of PLCbeta1 That Is a Positive Regulator of Osteoblast Differentiation*. J Cell Physiol, 2015.
60. Strioga, M., et al., *Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells*. Stem Cells Dev, 2012. **21**(14): p. 2724-52.
61. Jaiswal, N., et al., *Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro*. J Cell Biochem, 1997. **64**(2): p. 295-312.
62. Logovskaya, L.V., et al., *Induction of osteogenic differentiation of multipotent mesenchymal stromal cells from human adipose tissue*. Bull Exp Biol Med, 2013. **155**(1): p. 145-50.
63. Zhou, Y.S., Y.S. Liu, and J.G. Tan, *Is 1, 25-dihydroxyvitamin D3 an ideal substitute for dexamethasone for inducing osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived stromal cells in vitro?* Chin Med J (Engl), 2006. **119**(15): p. 1278-86.
64. Takamizawa, S., et al., *Effects of ascorbic acid and ascorbic acid 2-phosphate, a long-acting vitamin C derivative, on the proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells*. Cell Biol Int, 2004. **28**(4): p. 255-65.
65. Langenbach, F. and J. Handschel, *Effects of dexamethasone, ascorbic acid and beta-glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro*. Stem Cell Res Ther, 2013. **4**(5): p. 117.
66. Lanza R., K.I., *Essential Stem Cell Methods*. 2011: Academic Press. p. 308.
67. Toesca, A., A. Pagnotta, and N. Specchia, *Characterization of human bone cells in culture*. Ital J Anat Embryol, 2001. **106**(1): p. 13-26.
68. Schwegler, J.S. and R. Lucius, *Der Mensch - Anatomie und Physiologie*. 2011: Thieme. p. 23.
69. Enerback, S., et al., *Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese*. Nature, 1997. **387**(6628): p. 90-94.
70. Seeliger, C., et al., *Decrease of Global Methylation Improves Significantly Hepatic Differentiation of Ad-MSCs: Possible Future Application for Urea Detoxification*. Cell Transplantation, 2013. **22**(1): p. 119-131.
71. Sheehan D, H.B., *Theory and Practice of Histotechnology, 2nd Ed*. Battelle Press, Ohil., 1980: p. 226-227.
72. Ehnert, S., et al., *TGF-beta1 as possible link between loss of bone mineral density and chronic inflammation*. PLoS One, 2010. **5**(11): p. e14073.
73. Skehan, P., et al., *New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening*. J Natl Cancer Inst, 1990. **82**(13): p. 1107-12.
74. Scientific, T., *Thermo Scientific DyNAmo Flash SYBR Green qPCR Kit*. Technical Manual, 2011. **3**.
75. Green, M.R. and J. Sambrook, *Molecular cloning : a laboratory manual*. 2012, Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
76. He, S., D. Nakada, and S.J. Morrison, *Mechanisms of stem cell self-renewal*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2009. **25**: p. 377-406.

77. Banas, A., *Purification of adipose tissue mesenchymal stem cells and differentiation toward hepatic-like cells*. *Methods Mol Biol*, 2012. **826**: p. 61-72.
78. Shahdadfar, A., et al., *In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability*. *Stem Cells*, 2005. **23**(9): p. 1357-66.
79. Spees, J.L., et al., *Internalized antigens must be removed to prepare hypoimmunogenic mesenchymal stem cells for cell and gene therapy*. *Mol Ther*, 2004. **9**(5): p. 747-56.
80. Colter, D.C., et al., *Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000. **97**(7): p. 3213-3218.
81. Nakamura, T., et al., *Stimulation of endosteal bone formation by systemic injections of recombinant basic fibroblast growth factor in rats*. *Endocrinology*, 1995. **136**(3): p. 1276-84.
82. Aubin, J.E., et al., *Osteoblast and chondroblast differentiation*. *Bone*, 1995. **17**(2 Suppl): p. 77-83.
83. Kim, S., et al., *In vivo bone formation from human embryonic stem cell-derived osteogenic cells in poly(d,l-lactic-co-glycolic acid)/hydroxyapatite composite scaffolds*. *Biomaterials*, 2008. **29**(8): p. 1043-53.
84. Han, S.-H., et al., *Effect of ectopic OCT4 expression on canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cell proliferation*. *Cell Biology International*, 2014. **38**(10): p. 1163-1173.
85. Go, M.J., C. Takenaka, and H. Ohgushi, *Forced expression of Sox2 or Nanog in human bone marrow derived mesenchymal stem cells maintains their expansion and differentiation capabilities*. *Exp Cell Res*, 2008. **314**(5): p. 1147-54.
86. Yoon, D.S., et al., *Importance of Sox2 in maintenance of cell proliferation and multipotency of mesenchymal stem cells in low-density culture*. *Cell Proliferation*, 2011. **44**(5): p. 428-440.
87. Melief, S.M., et al., *Adipose tissue-derived multipotent stromal cells have a higher immunomodulatory capacity than their bone marrow-derived counterparts*. *Stem Cells Transl Med*, 2013. **2**(6): p. 455-463.
88. Montespan, F., et al., *Osteodifferentiated mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue express HLA-G and display immunomodulatory properties in HLA-mismatched settings: implications in bone repair therapy*. *J Immunol Res*, 2014.
89. Randau, T.M., S. Gravius, and A. Nüssler, *Aktueller Stand der Stammzelltherapie in Orthopädie und Unfallchirurgie*. *Z Orthop Unfall*, 2014. **152**(04): p. 320-327.

## 8 Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet. Ich versichere die Richtlinien zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten an der Eberhard-Karls-Universität beachtet zu haben. Ich erkläre außerdem, dass die hier vorliegende Dissertation nur in diesem und in keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht wurde und dass diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

Tübingen, den \_\_\_\_\_

## 9 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei vielen Personen bedanken, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein erster Dank geht an Prof. Dr. Andreas Nüssler für die gute Betreuung meiner Arbeit und deren Begutachtung.

Bei Dr. Sabrina Ehnert möchte ich mich besonders bedanken. Durch Ihre Unterstützung und Ihren Ratschlag stand Sie mir während der ganzen Zeit, von Beginn der Experimente, bis zur Fertigstellung meiner Arbeit, zur Seite.

Vielen Dank dafür, Sabrina!

Ein großer Dank geht auch an alle Mitarbeiter des Siegfried Weller Institutes, die mich mit Ihrem Fachwissen unterstützt haben.

Bei Xueying Yan bedanke ich mich für die Einführung in mein Thema und die Einarbeitung in die Experimente.

Ich danke Nicola Kambeitz, für eine wunderbare Zeit während des Studiums in Tübingen und das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Mein besonderer und größter Dank geht an meine Familie, vor allem an meine Eltern. Vielen lieben Dank, dass ihr mir das Studium ermöglicht und mich dabei unterstützt habt.