

Ableitung humaner mesenchymaler Zelltypen aus induzierten pluripotenten Stammzellen

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Chem. Ramona Weist, geb. Winkler

geboren am 16.06.1985 in Bernburg

2015

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Andrea Hoffmann
Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Scheper

Tag der Promotion: 03. September 2015

Erklärung zur Dissertation

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation „Ableitung humaner mesenchymaler Zelltypen aus induzierten pluripotenten Stammzellen“ während meiner Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung für Unfallchirurgie der Medizinischen Hochschule Hannover selbstständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie Mitwirkungen und Hilfeleistungen herangezogener Institutionen vollständig angegeben habe.

Die Dissertation wurde nicht bereits als Diplom-, Master- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, 03. September 2015

Ramona Weist

Zusammenfassung

Humane mesenchymale Stammzellen (MSC) sind multipotente Vorläuferzellen mit hervorragenden Proliferations- und Differenzierungspotentialen sowie anti-inflammatorischen Eigenschaften. Sie lassen sich aus vielen verschiedenen Geweben isolieren und stellen damit eine effektive Zellquelle für die Regenerative Medizin dar. Leider ist die Zellqualität der MSC stark spenderabhängig und die Proliferationskapazität *ex vivo* begrenzt. Daher sind Forscher und Ärzte daran interessiert, alternative Zellquellen zu finden. Induzierte pluripotente Stammzellen (iPSC) könnten eine solche Alternative darstellen. Ein großer Vorteil dieser Zellen ist vor allem ihre Fähigkeit, in Zellen aller drei Keimblätter zu differenzieren. Damit sind sie embryonalen Stammzellen sehr ähnlich, sind ethisch aber unbedenklich und gesetzlich nicht reglementiert. Außerdem können iPSC aus vielen verschiedenen somatischen Zelltypen generiert und somit auch autolog eingesetzt werden. Aufgrund ihrer Pluripotenz können iPSC auch in multipotente MSC differenziert werden (sogenannte iPS-MSC). Für eine klinische Anwendung müssten qualitativ hochwertige iPS-MSC möglichst schnell, einfach und kostengünstig erzeugt werden können.

Mit diesem Hintergrund wurde zunächst verifiziert, ob iPSC eine Zellquelle mit gleichbleibenden Eigenschaften darstellen. Dabei stellte sich heraus, dass sowohl das Ursprungsgewebe, als auch das Alter und die Kulturbedingungen einen Einfluss auf den Phänotyp und das Differenzierungsverhalten der iPSC hatten. Weiterhin wurde analysiert, welche der beiden am häufigsten verwendeten Differenzierungsmethoden (Monolayer (ML) oder Embryoid Body (EB)-Methode) in Bezug auf Qualität, Homogenität, Dauer und Kosten die bessere Variante zur Erzeugung von iPS-MSC ist. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Differenzierung über einen EB-Schritt im Vergleich zu der ML-Methode besser geeignet ist. iPS-MSC konnten so schneller, effizienter und kostengünstiger erzeugt werden. Der anschließende Vergleich der selbst generierten iPS-MSC mit humanen MSC aus Knochenmark zeigte eine weitestgehend gute Übereinstimmung, teilweise aber auch geringe Abweichungen in der Genexpression (CD105) sowie den Oberflächenantigenen (SSEA-4, CD106). Nachteilig war zudem, dass die iPS-MSC eine deutlich geringere Differenzierungskapazität als genuine MSC aufwiesen und *in vitro* nicht langzeitstabil waren. Daraus ließ sich schlussfolgern, dass iPSC-MSC und adulte MSC aus dem Knochenmark sich zwar sehr ähneln, aber nicht identisch sind.

Abschließend wurden verschiedene Modifikationen beider Methoden getestet, um den Differenzierungsprozess zu optimieren. Beispielsweise wurden die generierten iPS-MSC durch Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung aufgereinigt, zusätzliche dirigierende Agenzien (TGF- β 1, 17 β -Estradiol) angewandt oder die Differenzierung durch genetische Manipulation forciert. Leider führte keine der Modifizierungen zu einer deutlichen Verbesserung der Qualität oder Stabilität der iPS-MSC-Kultur. Anhand aller Ergebnisse konnten jedoch ein Modell des Differenzierungsprozesses postuliert und davon ausgehend weitere Modifikationsmöglichkeiten abgeleitet werden.

Stichworte: mesenchymale Stammzellen, induzierte pluripotente Stammzellen, iPS-MSC, Embryoid Body-Methode, Monolayer-Methode

Abstract

Mesenchymal stem cells (MSC) are multipotent progenitor cells and can be isolated from many different tissues. They are representing an effective cell source for regenerative medicine especially due to their proliferation and differentiation potential as well as their anti-inflammatory characteristics. Unfortunately the cell quality is highly donor-dependent and their proliferative capacity *ex vivo* is limited. Due to these facts researchers and physicians are interested in alternative cell sources. Induced pluripotent stem cells (iPSC) turned out to be a potential alternative to MSC. One big advantage of these iPSC is, their ability to differentiate into cells of all three germ layers similar to embryonic stem cells but without their ethical difficulties. Additionally, they can be derived from many different mature cell types, even in an autologous manner. Due to their pluripotency iPSC can be differentiated into multipotent MSC (so-called iPS-MSC). For a clinical application high quality iPS-MSC are necessary and have to be generated as fast, easy and cost-effective as possible. Two basic methods have been established to differentiate iPSC into MSC: the two-dimensional monolayer (ML) and the three-dimensional embryoid body (EB)-method.

One of the main questions of the present work was to find out whether the used induced pluripotent stem cells can serve as a cell source with consistent properties. Therefore three different iPSC populations were assessed. It was found that the origin tissue, the age and the culture conditions of the iPSC population have an effect on the phenotype and the differentiation behavior. Furthermore, it was investigated which of the two mostly used differentiation methods (ML- or EB-method) is the better way to generate iPS-MSC with regard to quality, homogeneity, duration of differentiation and efficiency. This work reveals that a differentiation induced by an embryoid body step is the more suitable way to generate iPS-MSC compared to the ML-method due to a much faster, more efficiently and cost-effective differentiation procedure. Afterwards, generated iPS-MSC were compared with human MSC from bone marrow. A good agreement was shown concerning the gene expression and surface antigens of both cell types. Nevertheless, small variations were observed. It was concluded that iPS-MSC and bone marrow derived MSC were very similar but not identical. Disadvantageously, a long-term stable iPS-MSC culture could not be generated by using one of the two basic methods.

Finally, various modifications of both methods were tested to optimize the differentiation process. For example, generated iPS-MSC were purified by fluorescence-activated cell sorting and additionally leading agents (TGF- β 1, 17 β -estradiol) or a differentiation through genetic manipulation were used. Unfortunately, none of the modifications led to a considerable improved quality or stability. However, all the results were used to postulate a differentiation model from which further modifications can be derived.

Key words: mesenchymal stem cells, induced pluripotent stem cells, iPS-MSC, embryoid body-method, monolayer-method

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IX
Abbildungsverzeichnis	XI
Tabellenverzeichnis	XIII
1 Einleitung	1
1.1 Stammzellen	1
1.1.1 Mesenchymale Stammzellen	3
1.1.2 Induzierte pluripotente Stammzellen	4
1.2 Einsatz von Stammzellen in der Regenerativen Medizin	6
1.3 Differenzierung von (induzierten) pluripotenten zu mesenchymalen Stammzellen	10
1.4 Epithelial-mesenchymale Transition	12
1.4.1 Generierung von iPS-MSC ist eine EMT	14
2 Zielsetzung der Arbeit	17
3 Methoden	19
3.1 Ethikerklärung	19
3.2 Zellkultur	19
3.2.1 Aufreinigung und Kultivierung von humanen MSC aus Knochenmark	19
3.2.2 Gelatinieren von Zellkulturflaschen und -platten	20
3.2.3 Differenzierung von iPSC zu iPS-MSC und deren Kultivierung	21
3.2.3.1 Monolayer-Methode	22
3.2.3.2 Embryoid Body-Methode	23
3.2.4 Einfrieren und Auftauen von MSC und iPS-MSC	24
3.2.5 Mesodermale <i>in vitro</i> -Differenzierung	24
3.2.5.1 Adipogenese und Osteogenese	24
3.2.5.2 Chondrogenese	24
3.3 Histologische Färbungen	25
3.3.1 PFA-Fixierung	25
3.3.2 Histologischer Nachweis der osteogenen Differenzierung	25
3.3.3 Histologischer Nachweis der adipogenen Differenzierung	26
3.3.4 Histologischer Nachweis der chondrogenen Differenzierung	27
3.4 Analytische Methoden	28
3.4.1 FCM und FACS	28
3.4.1.1 Kompensation	31
3.4.1.2 Probenvorbereitung und Durchführung der Messung	32
3.4.1.3 Hinweise zur Auswertung der FCM-Daten	33
3.4.2 Isolierung der Gesamt-RNA aus Zellkulturproben	35
3.4.3 DNase-Verdau und cDNA-Synthese	36

3.4.4	Polymerasekettenreaktion	37
3.4.5	Agarose-Gelelektrophorese	40
3.4.6	Microarrays	41
3.4.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	41
3.4.8	Western Blot	42
3.5	Klonierung von humanem CD105	43
3.5.1	Amplifikation der DNA	43
3.5.2	Restriktionsverdau und Phenolextraktion	44
3.5.3	Ligation	44
3.5.4	Transformation mittels Elektroporation	45
3.5.5	Sequenzieren	47
3.6	Lentivirale Überexpression von CD105 und Knockdown von CD24	47
3.6.1	Generierung des Lentivirus für CD105-Überexpression	47
3.6.2	Lentiviral-vermittelte Transduktion von hBMSC und iPSC	49
3.7	Magnetische Zellsortierung	49
4	Ergebnisse	51
4.1	iPSC als Zellquelle zur Erzeugung mesenchymaler Zelltypen	52
4.1.1	Analyse und Charakterisierung von iPSC als gleichbleibende Zellquelle	52
4.1.2	Direkte mesodermale <i>in vitro</i> -Differenzierung von hCB-iPSC	58
4.2	Generierung und Charakterisierung von iPS-MSC mittels EB- und ML-Methode	66
4.2.1	Vergleichende Differenzierung von hCB-iPSC zu MSC mittels ML- und EB-Methode und Charakterisierung der iPS-MSC	66
4.2.1.1	Microarray-Analysen	77
4.2.2	Generierung und Charakterisierung von hFF- und hHSC-iPS-MSC	81
4.3	Untersuchung der <i>in vitro</i> Differenzierungskapazität unterschiedlicher iPS-MSC im Vergleich zu hBMSC	82
4.3.1	Kurzzeitadipogenese	89
4.4	Modifizierungen der EB- und ML-Methoden für eine Optimierung des Differenzierungsprozesses	91
4.4.1	Aufreinigung unvollständig differenzierter iPSC mittels FACS	93
4.4.2	Generierung von iPS-MSC ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren	96
4.4.3	Generierung von iPS-MSC durch Zugabe von TGF- β 1	97
4.4.4	Generierung von iPS-MSC durch Zugabe von 17 β -Estradiol	101
4.4.5	Generierung von iPS-MSC durch Knockdown von CD24	101
4.4.6	Generierung von iPS-MSC durch Überexpression von CD105	104
5	Diskussion	109
5.1	Analyse und Bewertung von iPSC als gleichbleibende Zellquelle und zur Erzeugung mesenchymaler Zelltypen	109
5.1.1	Bewertung verschiedener iPSC-Populationen als gleichbleibende Zellquelle	109
5.1.2	Direkte mesodermale <i>in vitro</i> -Differenzierung von hCB-iPSC	112
5.2	Generierung und Charakterisierung von iPS-MSC mittels EB- und ML-Methode	112

5.3	Beurteilung der <i>in vitro</i> Differenzierungskapazität unterschiedlicher iPS- MSC im Vergleich zu hBMSC	118
5.3.1	Kurzzeitadipogenese	121
5.4	Modifizierungen der EB- und ML-Methode für eine Optimierung des Dif- ferenzierungsprozesses	121
6	Ausblick	129
	Literaturverzeichnis	133
	Anhang	149
A	Verwendete Geräte, Materialien und Chemikalien	149
A.1	Geräte	149
A.2	Verwendete Materialien und Chemikalien	151
A.3	Medien, Puffer und Lösungen	160
B	Hinweise zur Darstellung von qRT-Daten als Boxplot	164
C	FCM-Ergebnisse aller analysierten iPSC-Populationen	165
	Publikationsliste	171
	Lebenslauf	173

Abkürzungsverzeichnis

β-GP	β-Glycerophosphat
3/4-PS	3- bzw. 4-Plasmid-System
ASC	Adulte Stammzelle
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
bp	Basenpaare
c	Konzentration
C_T	<i>cycle threshold</i>
c-MYC	<i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
CD34t	CD34 trunkiert, nicht funktionsfähiges CD34
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
EB	Embryoid Body
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ESC	Embryonale Stammzelle
FABP4	<i>Fatty acid binding protein 4</i>
FACS	fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung, engl. <i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCM	Durchflusszytometrie, engl. <i>flow cytometry</i>
FSC	Vorwärtsstreulicht, engl. <i>forward scatter</i>
hBMSC	humane Stammzelle/Stromazelle aus dem Knochenmark, engl. <i>human bone marrow derived stroma cells</i>
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
IBSP	<i>integrin-binding sialoprotein</i>
LD	Lipid Droplet
LPL	Lipoproteinlipase
MACS	magnetische Zellsortierung, engl. <i>magnetic cell sorting</i>
MET	mesenchymal-epitheliale Transition
ML	Monolayer
MSC	mesenchymale Stammzelle/Stromazelle, engl. <i>mesenchymal stem or stromal cells</i>
NaH_2PO_4	Natriumdihydrogenphosphat
OCT4, POU5F1	<i>octamer-binding transcription factor 4</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PFA	<i>para</i> -Formaldehyd
PPAR-γ	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
qRT-PCR	quantitative Real-time Polymerasekettenreaktion
ROCK-Inhibitor	Rho-Kinase-Inhibitor
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (semiquantitativ)
RUNX-2	<i>Runt-related transcription factor 2</i>

SDS	Natriumdodecylsulfat, engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
shRNA	<i>short hairpin</i> RNA
SOX2/9	<i>sex determining region Y-box 2/9</i>
SSC	Seitwärtsstreulicht, engl. <i>side scatter</i>
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
x g	Vielfaches der mittleren Erdbeschleunigung

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Übersicht der verschiedenen Stammzellgruppen mit Einteilung nach ihrem Differenzierungspotential und Beispielen für mögliche Zielzellen.	1
1.2	Schematische Darstellung der retroviralen Reprogrammierung	5
1.3	Einsatz autologer iPSC in der Regenerativen Medizin	9
1.4	Schematische Darstellung der ML- und EB-Differenzierungsmethoden	11
3.1	Schematische Darstellung der Aufreinigung von MSC mittels Dichtegradientenzentrifugation	20
3.2	Schematische Gegenüberstellung der Monolayer- und der Embryoid Body-Methode zur Differenzierung von iPSC zu MSC.	22
3.3	Schematische Darstellung durchflusszytometrischer Messungen.	28
3.4	Mögliche Darstellungen durchflusszytometrischer Daten.	29
3.5	Schematische Darstellung der Kompensation für durchflusszytometrische Messungen.	31
3.6	Beispiele zur Auswertung von durchflusszytometrischen Daten.	34
4.1	Durchflusszytometrische Analyse verschiedener pluripotenter und mesenchymaler Oberflächenproteine auf iPSC verschiedenen Ursprungs, Passage und Kultur.	54
4.2	Boxplot-Diagramme der normierten relativen Genexpressionswerte aller iPSC-Populationen in verschiedenen Passagen.	56
4.3	Analyse der Oberflächenmarker und der Genexpression von hCB-iPSC während der Langzeitkultivierung über fünf Monate.	58
4.4	Histologische Färbungen der direkt adipogen und osteogen differenzierten hCB-iPSC.	60
4.5	RT-PCR-Ergebnisse adipogen differenzierter hCB-iPSC.	62
4.6	qRT-PCR-Ergebnisse osteogen und chondrogen differenzierter hCB-iPSC.	63
4.7	Analyse der Pluripotenzmarker nach vierwöchiger adipogener, osteogener und chondrogener Induktion von hCB-iPSC.	65
4.8	Schematische Darstellung der durchgeführten Monolayer- und Embryoid Body-Methoden inklusive Zellkulturfotos	69
4.9	Exemplarische Fotos der morphologischen Entwicklung von iPS-MSC nach längerer Kultivierung.	70
4.10	Dot Plot-Darstellung der Fluoreszenzintensitäten von CD24 und CD105 während der Differenzierung von iPSC zu MSC.	71
4.11	Exemplarische Histogramme typischer Pluripotenz- und MSC-Marker von iPSC, iPS-MSC(EB/ML) und hBMSC.	74
4.12	Darstellung der relativen mRNA-Expressionen typischer Pluripotenz- und MSC-Marker während der Monolayer- und EB-Differenzierung.	76
4.13	Vergleichende Darstellung der mittleren Genexpressionswerte von hCB-iPSC, hCB-iPS-MSC(ML,EB) und nativen hBMSC.	78
4.14	Darstellung der Ergebnisse der Microarray-Analysen als Heatmap.	79

4.15	Histologische Analysen der adipogen induzierten hCB- und hHSC-iPS- MSC im Vergleich zu nativen hBMSC.	84
4.16	Histologische Analysen der osteogen induzierten hCB- und hHSC-iPS- MSC im Vergleich zu nativen hBMSC.	86
4.17	Histologische Analysen der chondrogen induzierten hCB- und hHSC-iPS- MSC im Vergleich zu nativen hBMSC.	88
4.18	Histogramme der durchflusszytometrischen Analysen von CD34 auf der Oberfläche von iPS-MSC und hBMSC während der Kurzzeitadipogenese.	90
4.19	Genexpressionsdaten der Kurzzeitadipogenese.	91
4.20	Vergleich von sortierten und unsortierten iPS-MSC einen Tag sowie eine und vier Passagen nach dem FACS.	95
4.21	Mittels EB-Methode und ohne Wachstumsfaktoren generierte (iPS-MSC-)Kulturen in Passage 1.	97
4.22	Mit und ohne TGF- β 1-Zugabe generierte hCB-iPS-MSC(EB)-Kulturen in verschiedenen Passagen.	98
4.23	Ergebnisse der histologischen Färbungen nach adipogener, osteogener und chondrogener Induktion.	99
4.24	Ergebnisse der qRT-PCR-Analysen nach mesodermaler Differenzierung der mit 5 ng/mL TGF- β 1 generierten iPS-MSC.	100
4.25	Mittels EB-Methode und 17 β -Estradiol-Zugabe generierte (iPS-MSC-)Kultur in Passage 61.2 und 61.3.	101
4.26	Ergebnisse des CD24-Knockdown.	103
4.27	Western Blot-Analyse der Testinfektion von hBMSC mit CD105-Lentivirus.	105
4.28	Genexpression von CD24 und CD105 zu verschiedenen Zeitpunkten während der Differenzierung mittels lentiviraler CD105-Überexpression.	106
4.29	Zellkulturfotos der iPSC mit überexprimiertem CD105 und trunkiertem CD34.	107
4.30	Relative mRNA-Expression von nicht infizierten iPSC, iPSC mit über- exprimiertem CD105 oder trunkiertem CD34.	108
5.1	Postuliertes Modell zur Differenzierung von iPSC zu MSC.	115
B.1	Schematische Darstellung eines Boxplot-Diagramms.	164

Tabellenverzeichnis

1.1	Hoch- und herunterregulierte Marker für EMT.	15
3.1	Auswahl der Zellkulturflasche zur Aussaat der ausgereinigten mononukleären Zellen.	20
3.2	Verwendete Volumina beim Passagieren.	21
3.3	Informationen zu den verwendeten iPSC-Zelllinien.	21
3.4	Ausgesäte Zelldichten und verwendete ROCK-Inhibitor-Konzentrationen in Abhängigkeit der Passage bei ML-Methode.	23
3.5	Primer-Sequenzen für die Amplifizierung von humanem CD105	43
4.1	Durchschnittswerte und Standardabweichungen der FCM-Analysen von hCB-, hHSC- und hFF-iPSC von Matrigel und Feeder-Zellen.	53
4.2	Übersicht der durchgeführten Experimente zur Generierung von hCB-iPS-MSK.	67
4.3	Übersicht der durchgeführten Experimente zur Generierung von iPSC-MSK 81	81
4.4	Übersicht der durchgeführten Experimente zur Optimierung des Generierungsprozesses von iPSC-MSK.	92
4.5	Übersicht der durchgeführten Experimente zur Optimierung des Generierungsprozesses von iPSC-MSK unter Einsatz von Lentiviren.	93
5.1	Zusammenfassung der FCM-Daten typischer positiver MSK-Marker von iPSC, hCB-iPS-MSK(ML/EB), hHSC-iPS-MSK(EB) und hBMSK.	117
5.2	Ergebnis der mesenchymalen <i>in vitro</i> -Differenzierung von iPSC-MSK und hBMSK.	119
A.1	Verwendete Geräte	149
A.2	Verwendete Verbrauchsmaterialien	151
A.3	Verwendete Kits.	152
A.4	Verwendete Chemikalien.	153
A.5	Verwendete Antikörper für FCM und FACS.	156
A.6	Verwendete Isotypkontroll-Antikörper für FCM.	156
A.7	Verwendete Antikörper für Western Blot.	157
A.8	Verwendete Enzyme.	157
A.9	Verwendete Primer für die semiquantitative RT-PCR.	158
A.10	Verwendete Primer für die quantitative RT-PCR.	159
A.11	Zusammensetzung der Zellkultur-Medien	160
A.12	Zusammensetzung verwendeter Puffer und Lösungen	161
C.1	Ergebnisse der FCM-Analysen aller hCB-iPSC-Populationen von Matrigel. 165	165
C.2	Ergebnisse der FCM-Analysen aller hCB-iPSC-Populationen von Feeder-Zellen.	166
C.3	Ergebnisse der FCM-Analysen aller hHSC-iPSC-Populationen von Matrigel.	167

C.4	Ergebnisse der FCM-Analysen aller hHSC-iPSC-Populationen von Feeder-Zellen.	168
C.5	Ergebnisse der FCM-Analysen aller hFF-iPSC-Populationen von Matrigel.	169
C.6	Ergebnisse der FCM-Analysen aller hFF-iPSC-Populationen von Feeder-Zellen.	170

1 Einleitung

1.1 Stammzellen

Stammzellen sind sogenannte Ursprungs- oder Vorläuferzellen, die keine eigene Spezialisierung, dafür aber ein großes Differenzierungspotential besitzen. Aus ihnen gehen die verschiedenen Zelltypen eines Organismus hervor. Im Gegensatz zu ausdifferenzierten (spezialisierten) somatischen Zellen können sich Stammzellen zudem unbegrenzt vermehren und sind damit „potentiell unsterblich“.

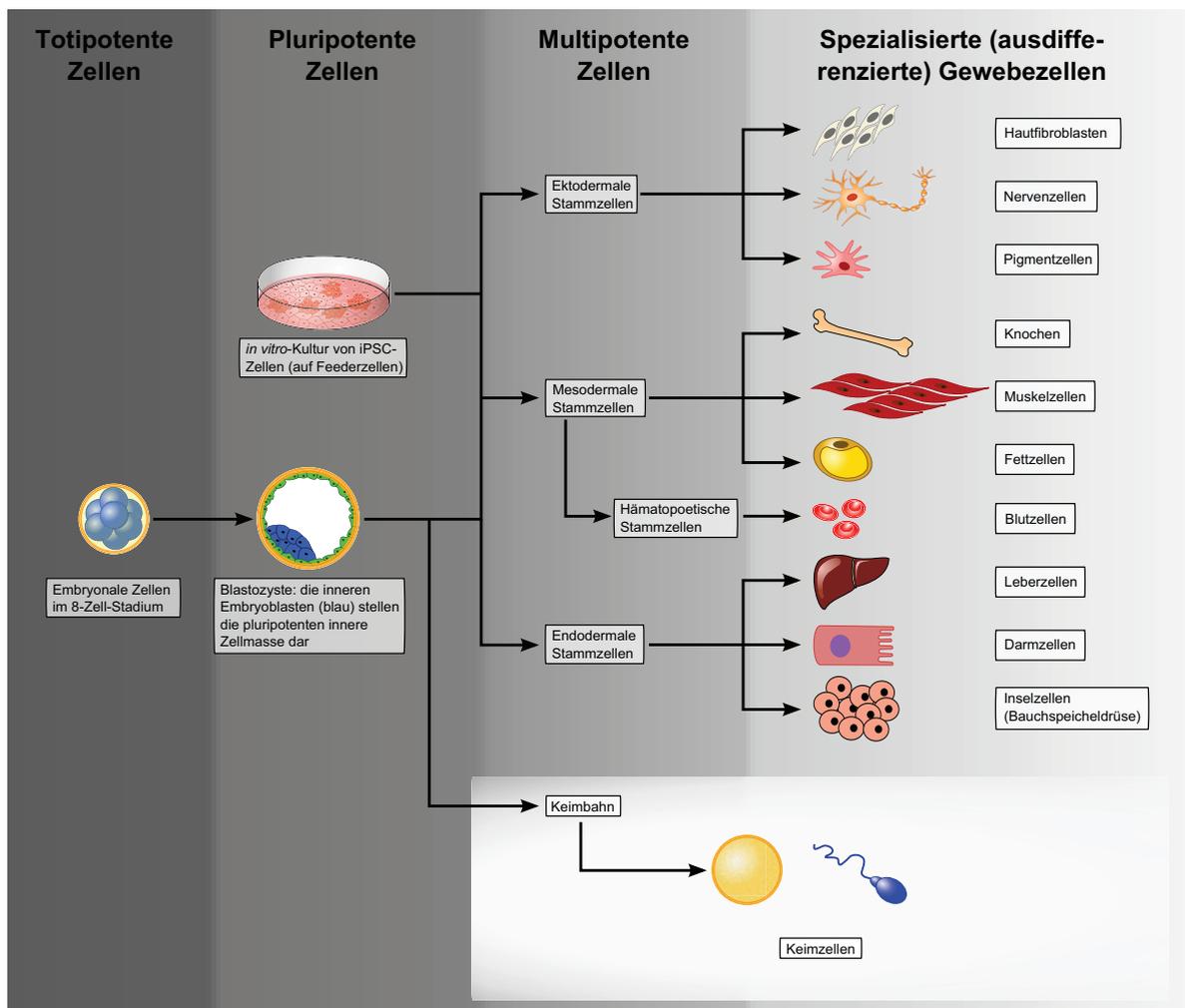


Abbildung 1.1: Schematische Übersicht der verschiedenen Stammzellgruppen mit Einteilung nach ihrem Differenzierungspotential und Beispielen für mögliche Zielzellen. Von links nach rechts – in etwa korrelierend mit der Entwicklung eines Organismus – nimmt das Differenzierungspotential ab. Induzierte pluripotente Stammzellen (iPSC) werden *in vitro* aus verschiedensten somatischen Zellen generiert und besitzen vergleichbare Eigenschaften wie embryonale Stammzellen, können sich aber nicht entlang der Keimbahn entwickeln.

Je nach Ursprung der Stammzellen wird zwischen embryonalen (ESC), fetalen und adulten (ASC) Stammzellen unterschieden. Allerdings sind ESC nur *in vitro* und unter

geeigneten Kulturbedingungen stabil. *In vivo* differenzieren sie als Zellen der inneren Zellmasse sofort weiter, mit der Intention, einen lebensfähigen Organismus auszubilden. Je weiter die Entwicklung eines Organismus fortgeschritten ist, um so geringer ist das Differenzierungspotential seiner (Stamm)Zellen (vgl. Abbildung 1.1). Stammzellen der frühen embryonalen Entwicklung (Zygote bis 8-Zell-Stadium) werden als totipotent bezeichnet. Auf den Menschen bezogen bedeutet dies, sie können in alle Zelltypen des Körpers einschließlich des extraembryonalen Gewebes differenzieren, so dass eine dieser Zellen ausreicht, um einen eigenständigen und lebensfähigen Organismus zu entwickeln. Danach können die Stammzellen des Embryos bzw. Fötus nur noch entlang der drei Keimblätter (Ektoderm, Mesoderm, Endoderm) und der Keimbahn differenzieren, aber keinen vollständigen Organismus mehr hervorbringen [1], sie sind pluripotent. Adulte Stammzellen sind multipotent oder unipotent und befinden sich bei jedem Menschen zu einem sehr geringen Prozentsatz in ausdifferenziertem Gewebe sowie im Blut. Dort gewährleisten sie die Nachbildung derjenigen Zellen, die altersbedingt oder aufgrund einer Verletzung ersetzt werden müssen. Multipotente Stammzellen lassen sich in endodermale, ektodermale, hämatopoetische und mesenchymale Stammzellen untergliedern. Diese können sich meist nur entlang ihres jeweiligen Keimblattes entwickeln.

Adulte Stammzellen sind von einer sogenannten Nische umgeben. Diese Mikroumgebung besteht sowohl aus zellulären als auch nicht-zellulären Komponenten und umfasst spezielle molekulare, zelluläre und physiologische Einflüsse sowie physikalische und mechanische Stimulation [2, 3]. Anders herum können Stammzellen auch Teil einer Nischenumgebung sein. So sind mesenchymale Stammzellen (MSC, engl. *mesenchymal stem cells*) beispielsweise Teil der hämatopoetischen Stammzellnische im Knochenmark [4, 5]. Die Anforderungen an eine Nische und deren Eigenschaften sind von Stammzelle zu Stammzelle verschieden, sehr komplex und größtenteils noch nicht genau bekannt. Heute weiß man allerdings, dass deren Aufbau und eventuelle chemische und mechanische Signale innerhalb der Nische dafür sorgen, dass eine Stammzelle ihren undifferenzierten Zustand beibehält oder aber Zellen für die Neubildung und Regeneration des jeweiligen Gewebes generiert [6].

Werden die Stammzellen *ex vivo* kultiviert und expandiert, wird die Nischenumgebung – soweit bekannt und umsetzbar – imitiert. Für eine Erhaltungskultur werden meist definierte Nährmedien verwendet, denen z.B. Salze in physiologischer Konzentration, Proteine, Zytokine und essentielle Aminosäuren zugesetzt werden. Daneben müssen die entsprechenden stimulierenden Signale ebenfalls von außen initiiert werden. In welche Richtung sich eine Stammzelle differenziert, hängt von vielen intra- und extrazellulären Faktoren ab. Dazu zählen vor allem die Aktivität spezifischer Transkriptionsfaktoren, das Auftreten von Wachstumsfaktoren und Hormonen sowie Interaktionen mit benachbarten Zellen. Wie diese Faktoren *in vivo* agieren, muss bekannt sein, um die entsprechenden Signale *in vitro* nachahmen zu können und so eine Differenzierung in einen gewünschten Zelltyp zu „erzwingen“. Im Labor werden der Kultur daher die entsprechenden Signalstoffe (z.B. Hormone, Zytokine) zugegeben, die Stammzellen mechanisch stimuliert und/oder mit somatischen Zellen co-kultiviert. Sind die nötigen Faktoren nicht genau bekannt, wird meist kein zufriedenstellendes Differenzierungsergebnis erzielt.

Wie oben beschrieben können embryonale, fetale und adulte Stammzellen isoliert und *in vitro* kultiviert werden. Daneben ist es dem japanischen Wissenschaftler Shinya

Yamanaka zusammen mit Kazutoshi Takahashi im Jahr 2006 erstmals gelungen, durch virale Infektion von somatischen Zellen *ex vivo* pluripotente Stammzellen „künstlich“ zu generieren [7]. Sie haben diese Zellen „induzierte pluripotente Stammzellen“, kurz iPSC (*engl. induced pluripotent stem cells*), genannt, weil sie (viral) induziert wurden und pluripotente Eigenschaften besitzen. In ihrer Gesamtheit sind iPSC den embryonalen Stammzellen sehr ähnlich. Für die Wissenschaft sind iPSC von größter Bedeutung, da sie sich unter vergleichbaren Kulturbedingungen wie ESC verhalten und hierbei keine ethischen Bedenken bestehen (siehe Abschnitt 1.1.2). Somit kann die embryonale Entwicklung eines Gewebes oder Organs auf zellulärer Ebene untersucht werden, ohne dafür einen Embryo zu zerstören.

Diese Arbeit befasst sich in erster Linie mit mesenchymalen und induzierten pluripotenten Stammzellen. Daher wird in den folgenden Abschnitten näher auf diese Zellen und ihren Einsatz eingegangen.

1.1.1 Mesenchymale Stammzellen

Mitte der 1960er Jahre konnten Friedenstein *et al.* zum ersten Mal zeigen, dass aus Knochenmark isolierte Zellen die Fähigkeit besitzen, osteogen zu differenzieren [8]. Aber erst 1991 betitelte Arnold I. Caplan diese Zellen als mesenchymale Stammzellen [9]. Heutzutage werden MSC auch als mesenchymale Stromazellen bezeichnet. *In vitro* stellen sie eine multipotente Zellpopulation mit fibroblasten-ähnlicher spindelförmiger Morphologie dar. MSC konnten bereits aus vielen Teilen des menschlichen Organismus isoliert werden, der größte Anteil an Stammzellen ist allerdings im Knochenmark zu finden (0.001 - 0.01 %) [10]. Die Isolierung von humanen MSC aus dem Knochenmark (hBMSC, *engl. human bone marrow derived stroma cells*) zählt daher mittlerweile zu den Standardmethoden und wird häufig angewandt, auch wenn der Eingriff invasiv ist. Darüber hinaus können MSC auch aus dem Fettgewebe [11], der Haut [12], dem Blut [13, 14], dem Zahngewebe [5] und den geburtsassoziierten Geweben, wie z.B. der Plazenta, dem Amnion oder der Nabelschnur [15–17], isoliert werden.

2006 wurden von der International Society for Cellular Therapy Minimalkriterien für *in vitro* kultivierte MSC definiert, um die internationalen Forschungsergebnisse verschiedener Zellpopulationen besser miteinander vergleichen zu können [18]. Diese legen fest, dass MSC plastik-adhärenent wachsen (z.B. in Zellkulturflaschen), sowie positiv für die spezifischen Oberflächenantigene CD105, CD73 und CD90 und negativ für CD45, CD34, CD14 oder CD11b, CD79 α oder CD19 und HLA II sein müssen. Als Nachweis der Multipotenz müssen sie außerdem *in vitro* zu Osteoblasten, Adipozyten und Chondrozyten differenziert werden können. Darüber hinaus gilt eine fibroblasten-ähnliche Morphologie gemeinhin als weiteres Kriterium. Neueste Erkenntnisse zeigen jedoch, dass mittels üblicher Plastikadhärenz isolierte adulte MSC-Kulturen heterogen sind und darin Zellen mit unterschiedlichen Stammzeleigenschaften vorliegen [19]. Vor allem Oberflächenmarker, die mit der Multipotenz von MSC in Verbindung gebracht werden, werden je nach Ursprungsgewebe zum Teil sehr unterschiedlich exprimiert. Aus diesem Grund werden die Minimalkriterien der International Society for Cellular Therapy in den letzten Jahren immer häufiger als nicht spezifisch genug kritisiert [19–22]. Auf einen einheitlichen und allgemeingültigen MSC-Phänotyp konnte sich bisher aber nicht geeinigt werden.

1.1.2 Induzierte pluripotente Stammzellen

Pluripotente Stammzellen sind aufgrund ihres breiten Differenzierungspotentials besonders für die Forschung im Bereich der Evolutionsbiologie sowie der Medizin und Pharmazie von großer Bedeutung. 1981 wurde die erste murine embryonale Stammzelllinie von Evans *et al.* etabliert [23]. Seitdem wurde an und mit diesen Zellen viel geforscht, doch die Übertragung der Forschungsergebnisse auf den humanen Organismus sind nur teilweise möglich [24]. Der Einsatz humaner embryonaler Stammzellen ist ethisch jedoch problematisch. Humane ESC werden aus der Blastozyste isoliert, wodurch gleichzeitig die Entwicklung eines lebensfähigen Menschen verhindert wird. In Deutschland ist gesetzlich festgelegt, dass jeder Mensch das Recht auf Leben hat. Bis heute wird eifrig diskutiert, wann das menschliche Leben beginnt: mit der Befruchtung der Eizelle, dem ersten Herzschlag des Fötus oder der Geburt. Aus diesem Grund ist die Isolierung von humanen ESC aus der Blastozyste ethisch äußerst umstritten und die Forschung an und mit diesen Zellen stark reglementiert. In Deutschland wird deren Verwendung im Embryonenschutzgesetz sowie im Stammzellgesetz geregelt.

Mit der ersten Generierung der in Abschnitt 1.1 bereits angesprochenen induzierten pluripotenten Stammzellen scheint ein adäquater Ersatz für embryonale Stammzellen gefunden zu sein. Die japanischen Wissenschaftler Takahashi und Yamanaka zeigten, dass durch Überexpression bestimmter Transkriptionsfaktoren eine Pluripotenz in somatischen Zellen induziert werden kann [7]. Vor der ersten Generierung von iPSC wurden in Yamanakas Forschergruppe durch den Vergleich von ESC mit ausdifferenzierten somatischen Zelltypen signifikante Unterschiede der jeweiligen Genexpressionen festgestellt [7]. Einige der identifizierten regulatorischen Proteine sind essentiell für die Erhaltung der Pluripotenz, andere sind unabdingbar für die Erhaltung des Phänotyps und die hohe Proliferationsrate. Um die Induzierbarkeit der Pluripotenz zu beweisen, wurden DNA-Expressionskonstrukte ausgewählter Transkriptionsfaktoren mittels retroviraler Transduktion in murine Fibroblasten eingebracht (siehe Abbildung 1.2). Durch die Kombination verschiedener Faktoren stellte sich heraus, dass OCT4 (engl. *octamer-binding transcription factor 4*), SOX2 (engl. *sex determining region Y-box 2*), c-MYC (engl. *v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog*) und KLF4 (engl. *Kruppel-like factor 4*) zusammen eine Reprogrammierung bewirken. Die transgenen Zellen wiesen daraufhin einen pluripotenten Charakter auf. 2007 gelang die Induktion mit den gleichen Faktoren auch bei humanen Fibroblasten [25]. Diese iPSC besaßen vergleichbare Morphologien und Eigenschaften wie ESC und konnten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in Zelltypen aller drei Keimblätter differenziert werden [7, 25, 26]. Zudem wiesen sie eine hohe Proliferations- und Telomerase-Aktivität auf. Expressionsmuster und pluripotenz-assoziierte Oberflächenantigene entsprachen ebenfalls den von ESC bekannten Eigenschaften. Dazu gehörten vor allem der positive Nachweis von NANOG, E-Cadherin, ALPL, SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, LIN28, REX1, GDF3, sowie den überexprimierten Transkriptionsfaktoren OCT4, SOX2, KLF4 und c-MYC [7, 25, 27]. Diese Marker sind heute allgemein hin als Kriterien für pluripotente Stammzellen anerkannt. Die Forschungen von Yamanaka und seiner Gruppe gelten als Beginn der induzierten pluripotenten Stammzellen. Für seine fortschrittliche Arbeit erhielt er 2012 zusammen mit John B. Gurdon (Pionier auf dem Gebiet der Reprogrammierung [28, 29]) den Nobelpreis für Medizin oder Physiologie.

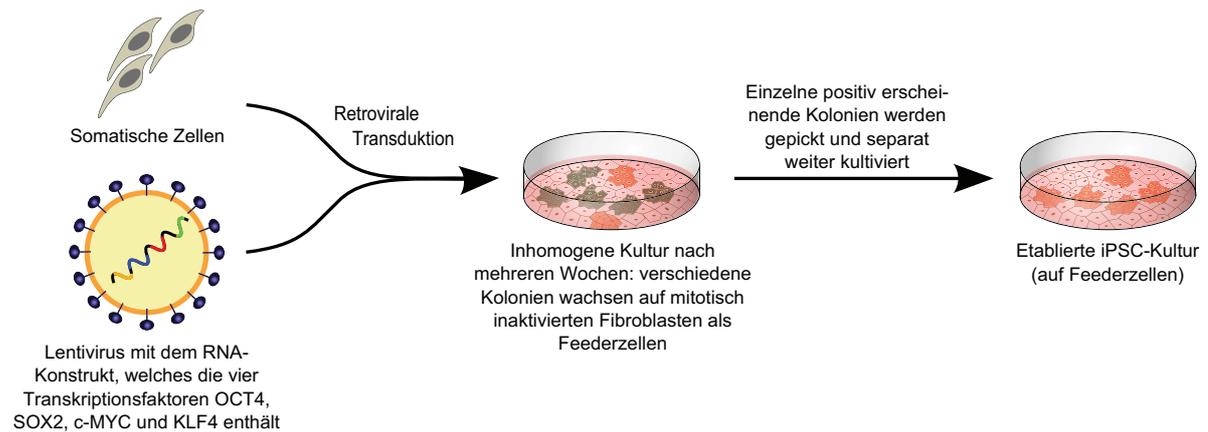


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der retroviralen Reprogrammierung von somatischen Zellen zu induzierten pluripotenten Stammzellen nach dem Protokoll von Takahashi *et al.* [7, 25].

Aufgrund ihrer großen Ähnlichkeit zu ESC spielen humane iPSC vor allem in der Grundlagenforschung, in der Pharmazie und in der Regenerativen Medizin eine große Rolle. Mit ihrer Hilfe kann beispielsweise die Entwicklung eines vollständigen Gewebes oder Organs erforscht werden, ohne dass ethische Bedenken die Arbeit limitieren. Dies kann Aufschluss über zahlreiche Krankheiten und Wirkmechanismen geben, wodurch wiederum neue Medikamente entwickelt und getestet oder bestehende Medikamente verbessert werden können. Auch der Einsatz in regenerativen Therapien ist denkbar und gerade dann von besonderem Interesse, wenn große Zellmengen zur Regeneration von geschädigtem Gewebe notwendig sind. Zudem ermöglicht die Entdeckung der iPSC einen breiteren Einsatz autologer, d.h. patienten-eigener Spenderzellen. Das Potential der iPSC für den Einsatz in der Regenerativen Medizin wird in Abschnitt 1.2 näher erläutert.

Aufbauend auf der Induktionsmethode mit den „Yamanaka-Faktoren“ OCT4, SOX2, c-MYC und KLF4 wurden weitere zahlreiche Methoden zur Generierung von induzierten pluripotenten Stammzellen entwickelt. So konnten Wissenschaftler aus der Gruppe von James Thomson zeigen, dass eine Induktion mit OCT4, SOX2, NANOG und LIN28, den sogenannten „Thomson-Faktoren“, ebenfalls erfolgreich ist [30]. Diese Reprogrammierung bietet gegenüber der Methode von Yamanakas Forschergruppe den Vorteil, dass auf c-MYC verzichtet werden kann. C-MYC ist ein starkes Onkogen und durch dessen Überexpression wird eine klinische Anwendung der mit diesem Faktor generierten iPSC unmöglich [31]. In den folgenden Jahren konnten zudem pluripotente Zellen durch Überexpression von nur drei, zwei oder sogar von nur einem Transkriptionsfaktor generiert werden [32–36]. 2008 zeigten Wernig *et al.* sowie Nakagawa *et al.* aus der Yamanaka-Gruppe unabhängig voneinander, dass bei Verwendung der Yamanaka-Faktoren das Onkogen c-MYC für eine virale Reprogrammierung muriner und humaner Fibroblasten ebenfalls nicht notwendig ist [32, 33]. Letztere konnten zudem an chimären Mäusen, die von solchen 3-Faktoren-iPSC abgeleitet wurden, zeigen, dass die Tiere keine Tumore entwickelten, im Gegensatz zu denjenigen mit den ursprünglichen vier Yamanaka-Faktoren. Noch im gleichen Jahr konnten murine iPSC mit OCT4 und SOX2 und ein Jahr später humane iPSC mit den Faktoren OCT4 und KLF4 generiert werden [34, 35]. Ebenfalls 2009 zeigten Kim *et al.* schließlich die Re-

programmierung von humanen neuronalen Stammzellen ausschließlich mit OCT4 [36]. Letzterer Transkriptionsfaktor wird bei allen Methoden verwendet und scheint für die virale Reprogrammierung von außerordentlicher Bedeutung zu sein. OCT4 agiert für viele pluripotenz-assoziierte Gene als Transkriptionsfaktor und ist vermutlich deshalb unerlässlich [37].

Neben der retroviral induzierten Reprogrammierung somatischer Zellen konnten mittlerweile auch adenovirale [38, 39] sowie miRNA- [40, 41] und Protein-vermittelte [42, 43] Induktionsmethoden entwickelt werden. Auch mit dem PiggyBac Transposon System konnten positive Ergebnisse erzielt werden [44, 45]. Allgemein sind die virus-freien Methoden den retroviralen vorzuziehen, da mit ihnen das Risiko einer Insertionsmutagenese minimiert werden kann. Die damit verbundene geringere Karzinogenität der generierten iPSC ermöglicht eine potentielle klinische Anwendbarkeit. Doch häufig ist deren Induktions-Effizienz geringer als bei klassischen viral induzierten Reprogrammierungen. Die Yamanaka-Methode konnte Effizienzen von 0,001 bis 2 % erreichen [46, 47]. Lediglich durch Proteintransduktion und den Einsatz von microRNA konnten ähnlich gute Ergebnisse erzielt werden [40, 41, 43].

1.2 Einsatz von Stammzellen in der Regenerativen Medizin

Die Regenerative Medizin befasst sich mit der Reparatur und dem Ersatz von beschädigtem Gewebe durch Einsatz geeigneter Zellen und künstlich hergestellter Zellverbände. Ziel ist es, die Funktionalität von beschädigten Organen oder Geweben wieder herzustellen und damit die Lebenszeit sowie die Lebensqualität des Patienten zu verlängern bzw. zu verbessern. Als Teilgebiet der Regenerativen Medizin gilt das *Tissue Engineering*, bei dem *ex vivo* gezielt dreidimensionale Gewebe gezüchtet werden, um sie anschließend einem Patienten zu implantieren. Häufig kommen dabei Stammzellen und Biomaterialien zum Einsatz und werden beispielsweise für die Regeneration von Knochen, Leber, Haut, Nerven, Blutgefäßen, Knorpel und Sehnen verwendet [48–51]. Die in der Regenerativen Medizin verwendeten (Stamm-)Zellen können sowohl vom Patienten selbst (autolog) als auch von Patienten-fremden Spendern (allogen) stammen. Die Verwendung autologer Quellen ist dabei grundsätzlich erstrebenswert, häufig jedoch nicht möglich. Der Auslöser für regenerative medizinische Eingriffe ist nicht selten ein Defekt des jeweiligen Gewebes (z.B. bei Arthrose, Herzinfarkt) oder einer eventuell genetisch bedingten (Autoimmun-)Krankheit (Diabetes mellitus, Muskelschwund). Die Transplantation autologer Zellen ist in diesen Fällen nicht möglich oder würde zumindest keine gesundheitliche Verbesserung bewirken. Da zudem *in vitro* noch keine funktionalen Organe aus menschlichen Zellen generiert werden können, sind Medizin und Patient immer wieder auf allogene Spenden angewiesen.

Diese haben allerdings drei entscheidende Nachteile:

1. Meist ist für eine Zell- oder Gewebespende ein invasiver Eingriff notwendig, von dem sich der sonst gesunde Spender über einen zum Teil langwierigen Heilungsprozess erholen muss. Abhängig vom gespendeten Material können Narben bleiben oder es fehlen ihm die entsprechenden Zellen/Organe zu einem späteren Zeitpunkt in seinem Leben (z.B. nach einer Nierentransplantation).

2. Der Organismus des Empfängers erkennt die allogenen Spenderzellen als körperfremd. In Folge dessen stößt er die Zellen ab. Diese Immunantwort wird auch als Host-versus-Graft-Reaktion bezeichnet. Anders herum ist auch eine Graft-versus-Host-Reaktion möglich, bei dem sich immunkompetente Transplantatzellen gegen den Empfängerorganismus richten. Mit immunsuppressiven Mitteln können derartige Immunreaktionen zwar vermindert oder unterdrückt werden. Dies bringt jedoch unangenehme Nebenwirkungen mit sich. Das Immunsystem wird insgesamt geschwächt, so dass eine erhöhte Infektanfälligkeit durch Viren, Bakterien und andere Krankheitserreger besteht. Zudem nimmt das Risiko bestimmter Krebserkrankungen zu. Daneben wirken sich die Medikamente negativ auf die Blutwerte und einige innere Organe des Patienten aus.
3. Ausdifferenzierte somatische Zellen weisen nur noch eine sehr geringe Proliferationskapazität auf, so dass entnommene Gewebe und Zellen möglichst direkt transplantiert werden müssen. Sollte das gespendete Material nicht ausreichen, kann es, wenn überhaupt, nur minimal und unter hohem Zeitaufwand *in vitro* expandiert werden. Damit sind die Zellmengen stark limitiert.

Letzteres kann durch den Einsatz geeigneter adulter Stammzellen ausgeglichen werden. Aufgrund ihrer hohen Proliferations- und Differenzierungspotentiale können sie vergleichsweise einfach im Labor expandiert und, falls erwünscht, anschließend in das Zielgewebe differenziert werden. So konnten schon einige klinische Therapieansätze erfolgreich umgesetzt werden (einen guten und umfangreichen Überblick geben M. Mimeault und S. K. Batra in ihrem Review [52]). Es konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass Stammzellen des Ektoderms für die Hautregeneration bei Verbrennungen, chronischen Wunden und Geschwüren einsetzbar sind [53]. Schädigungen der Hornhaut konnten bereits durch den Einsatz epithelialer Stammzellen behandelt werden [54]. Zudem konnte durch transplantierte neuronale Stammzellen eine axonale Regeneration herbeigeführt werden [55]. Die Stammzellen des Endoderms konnten in den letzten Jahren erfolgreich für die Behandlung von Lebererkrankungen [56] oder Diabetes mellitus [52] eingesetzt werden.

Von besonderer Bedeutung aber sind die humanen mesenchymalen Stammzellen. Sie besitzen im Vergleich zu anderen gut isolierbaren Stammzellen ein sehr breites Differenzierungsspektrum und eine große therapeutische Einsetzbarkeit [20]. Zusätzlich hat sich herausgestellt, dass diese Zellen von Natur aus eine immunsuppressive Wirkung auf den Empfängerorganismus ausüben können. Es ist gelungen, nach einer (allogenen) Organtransplantation die Graft-versus-Host-Reaktion signifikant zu verringern, indem MSC co-transplantiert oder in den Blutkreislauf des Patienten injiziert wurden [57–59]. Im Vergleich zu immunsuppressiven Medikamenten wirken MSC, ohne dabei das gesamte Immunsystem des Patienten zu schwächen. Dies stellt einen sehr großen Vorteil gegenüber den kommerziellen Immunsuppressiva dar.

MSC verfügen außerdem über die außergewöhnliche Eigenschaft des Homings [60,61]. Dies bedeutet, dass die Zellen über die Blutbahn durch den Organismus migrieren können. Im Falle einer Verletzung werden die Stammzellen z.B. durch extrinsische Signale aus ihrer Nische heraus mobilisiert. Alternativ können dem Patienten allogene gespendete MSC als Zelltherapie intravenös injiziert werden wie bei der oben angesprochenen co-Transplantation. Jedoch steht hierbei nicht die Unterdrückung der Immunantwort im Vordergrund, sondern der Ersatz von beschädigten oder abgestorbenen

Gewebezellen. Die MSC migrieren zu dem Bereich des geschädigten Gewebes, dort interagieren sie mit den Endothelzellen, welche die Blutbahn umgeben, passieren diese und wandern in das Zielgewebe ein. Im Zielgewebe tragen sie schließlich entscheidend zu dessen Regeneration bei. Anwendung findet diese Methode beispielsweise nach einem Herzinfarkt, um so die Bildung neuer Herzmuskelzellen zu unterstützen und die Funktion des Organs zu verbessern. Dabei wird vermutet, dass der positive Effekt der MSC vor allem auf einer anti-apoptotischen Wirkung auf die Kardiomyozyten sowie die Abgabe von Wachstumsfaktoren und Zytokinen beruht [62]. Das beschädigte Gewebe regeneriert somit schneller und besser.

Obwohl es noch weitere potentielle Einsatzgebiete für mesenchymale Stammzellen gibt, sind die Forschungsergebnisse zu einem großen Teil noch nicht zufriedenstellend. Als problematisch haben sich neben den nur teilweise erforschten Differenzierungsmechanismen vor allem die abnehmende Vitalität und Differenzierbarkeit der Stammzellen mit zunehmendem Alter des Spenders herausgestellt. Trotz ihres potentiell unbegrenzten Expansionspotentials *in vivo* können MSC *in vitro* nur über einen begrenzten Zeitraum kultiviert und je nach Spender auch nur eingeschränkt differenziert werden. Aus diesem Grund sind besonders junge MSC, beispielsweise solche mit neonatalem Ursprung (Plazenta, Nabelschnurgewebe oder -blut), in der Regenerativen Medizin von großem Interesse. Junge Zellen lassen sich *ex vivo* meist schneller und länger expandieren als die MSC eines 40- oder gar 80-jährigen Menschen [15]. Die maximale Expansionskapazität ist aber auch bei jungen Spenderzellen limitiert.

Im Gegensatz zu mesenchymalen Stammzellen bieten pluripotente Stammzellen den Vorteil einer extrem großen Proliferationskapazität auch im Labor. Es gibt embryonale Zelllinien, die über mehr als 100 Passagen kultiviert wurden, ohne ihre pluripotenten Eigenschaften zu verlieren [63]. ESC lassen sich in alle Zelltypen des menschlichen Körpers differenzieren, stellen allerdings unter normalen Umständen genauso wie die meisten gespendeten adulten Stammzellen allogene Zellen dar. Demnach würde bei einer Transplantation dieser Zellen ebenfalls eine Immunantwort auftreten. Hinzu kommen die bereits angesprochenen ethischen Bedenken (siehe Abschnitt 1.1.2).

Die ideale Lösung für all die genannten Probleme und Einschränkungen wäre also eine nicht-invasiv zugängliche autologe Zellquelle. Diese sollte eine möglichst hohe *in vitro*-Proliferations- und Differenzierungskapazität aufweisen und dabei nicht aus ethischen oder gesetzlichen Gründen reglementiert sein. In den letzten Jahren haben sich die induzierten pluripotenten Stammzellen als einen äußerst vielversprechenden Kandidaten hierfür herausgestellt. Autologe Zell- und Gewebespenden können gewonnen werden, indem dem Patienten somatische Zellen entnommen und aus diesen pluripotente Stammzellen generiert werden. Neben den gängigen Hautfibroblasten eignen sich dafür sogar Haarzellen, womit ein invasiver Eingriff nicht mehr notwendig ist [64]. iPSC können *in vitro* vergleichbar schnell und lange wie ESC expandiert werden. Anschließend ist eine gezielte Differenzierung in jeden gewünschten Zelltyp der drei Keimblätter möglich, sofern ein geeignetes Protokoll dafür bekannt ist. Die ausdifferenzierten Ziel- oder geeignete Vorläuferzellen können dem Patienten anschließend reimplantiert werden (siehe Abbildung 1.3). Das Risiko einer Immunantwort (wie bei allogenen Zellen) ist hierbei sehr gering, kann allerdings nicht vollständig ausgeschlossen werden [65,66].

Ein Einsatz humaner iPSC in der Regenerativen Medizin ist aufgrund geringer Forschungserkenntnisse noch stark eingeschränkt und bisher nicht bekannt. Die Forschung

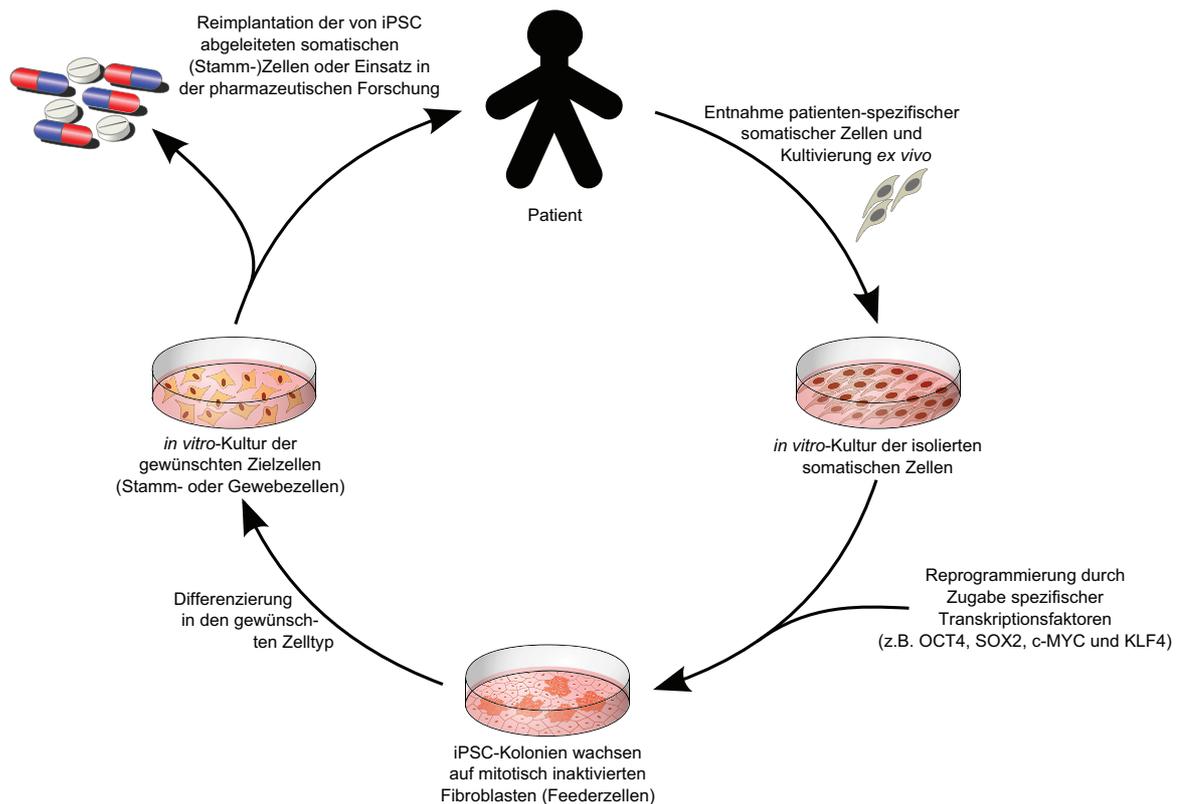


Abbildung 1.3: Autologe iPSC können in der Regenerativen Medizin Anwendung finden, indem dem Patienten zunächst somatische Zellen entnommen werden, diese dann reprogrammiert, in die Zielzellen differenziert und anschließend dem Patienten reimplantiert werden.

auf diesem Gebiet macht jedoch rasante Fortschritte und es laufen erste klinische Studien [67, 68]. In Tier- und *ex vivo*-Modellen konnten beispielsweise bereits induzierte pluripotente Stammzellen zu Kardiomyozyten differenziert werden [69]. Ziel dabei ist es, zerstörtes Gewebe z.B. nach einem Herzinfarkt ersetzen zu können. Außerdem konnte gezeigt werden, dass spezifische iPSC eines Diabetes-Patienten zur Erzeugung Insulin-produzierender Zellen geeignet sind [70]. Weitere große Fortschritte konnten auf dem Weg zu einer Behandlung von Parkinson [71, 72] oder Hämophilie A (Bluterkrankheit) [73], sowie zur Knochenregeneration [74, 75] gemacht werden.

Für eine klinische Anwendbarkeit muss neben der erfolgreichen Differenzierung sichergestellt sein, dass sich keine iPSC mehr in den reimplantierten Zellen/Geweben befinden. Diese sind (wie auch ESC) in der Lage, *in vivo* Teratome zu bilden. Ein weiteres Problem, das es zu lösen gilt, ist der große Zeitaufwand transplantierbare Zellen zu erzeugen. Die Generierung von humanen iPSC dauert bereits mehr als vier Wochen [27]. Diese müssen anschließend expandiert und differenziert werden, was wiederum mehrere Wochen in Anspruch nehmen kann. Wenn es um eine akute Erkrankung geht, hat der Patient diese Zeit allerdings meist nicht. Daher gilt es aktuell, die Reprogrammierung sowie die Generierung implantierfähiger Zellen zu beschleunigen. Neben der potentiellen klinischen Anwendung von iPSC-abgeleiteten Zellen, finden krankheitsspezifische iPSC schon heute Anwendung in der Pharmabranche. Derartige iPSC werden aus Zellen von Patienten mit genetisch bedingten Krankheiten generiert und dienen der Entwicklung neuer Medikamente und toxikologischer Tests (Abbildung 1.3) [76, 77].

Wie oben erläutert, sind humane mesenchymale Stammzellen sehr vielversprechende und bereits klinisch erprobte Zellen in der Regenerativen Medizin. Ihrer Proliferationskapazität ist *ex vivo* jedoch stark eingeschränkt. Es hat sich herausgestellt, dass induzierte pluripotente Stammzellen auch als alternative Zellquelle für MSC geeignet sind [78]. Dadurch, dass iPSC eine außerordentlich hohe bzw. potentiell unendliche Proliferationskapazität aufweisen, besteht die Möglichkeit, zunächst die Kultur der pluripotenten Zellen auf die gewünschte Menge zu expandieren und diese Zellen anschließend zu MSC zu differenzieren. Damit könnten deutlich größere MSC-Populationen generiert werden, auch wenn der Spender z.B. schon sehr alt ist. In den letzten Jahren wurden einige Methoden entwickelt, um pluripotente Stammzellen *in vitro* zu mesenchymalen Stammzellen zu differenzieren (siehe Abschnitt 1.3). Zudem konnte gezeigt werden, dass die generierten ebenso wie die nativen MSC ein hohes Differenzierungspotential und die charakteristischen Eigenschaften des Homings sowie der Immunsuppression aufweisen [79]. Dabei bietet die Differenzierung von pluripotenten zu mesenchymalen Stammzellen gegenüber der direkten Generierung von Gewebe einen großen Vorteil: MSC liegen in Kultur überwiegend als Einzelzellen vor. Daher können nach erfolgreicher Generierung vergleichsweise einfach eine Suspension erzeugt und die Zellen anschließend aufgereinigt werden. Dieser Schritt stellt sicher, dass keine undifferenzierten pluripotenten Zellen in der Kultur verbleiben und so das Risiko einer Teratombildung minimiert wird. Für eine Separation der gewünschten Zellen ist die Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS, engl. *Fluorescence activated cell sorting*) eine herausragende Methode [79–81]. Ebenso bietet sich die magnetische Zellsortierung (MACS, engl. *magnetic cell sorting*) an [82, 83]. Bei beiden Methoden können die kultivierten und differenzierten Zellen anhand MSC-spezifischer Oberflächenmarker (z.B. CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD14⁻, CD45⁻) lebend sortiert werden. Nur die Zellen, die dem MSC-Phänotyp entsprechen, werden separiert und können anschließend *in vitro* weiter expandiert, differenziert oder auch direkt implantiert werden.

1.3 Differenzierung von (induzierten) pluripotenten zu mesenchymalen Stammzellen

MSC, die aus iPSC generiert wurden, werden in der Literatur häufig als iPS-MSC, iPSC-MSC oder iMSC bezeichnet. Im Folgenden wird ausschließlich die erste Abkürzung verwendet. Da es durch den zeitlichen Vorsprung der ESC- gegenüber der iPSC-Forschung auf dem Gebiet der Stammzellendifferenzierung deutlich mehr Erkenntnisse gibt und nachweislich eine große Ähnlichkeit zwischen beiden pluripotenten Zelltypen besteht, werden an dieser Stelle die Forschungsergebnisse aus beiden Bereichen berücksichtigt.

Die Differenzierung pluripotenter Stammzellen zu multipotenten MSC war schon sehr früh ein attraktives Forschungsthema. Mittlerweile sind viele verschiedene Methoden für diese Differenzierung bekannt, doch die meisten beruhen auf einer von zwei grundlegenden Durchführungen: der Differenzierung in Monolayer-Kultur oder über einen Embryoid Body-Schritt. Beide Methoden sind schematisch in Abbildung 1.4 dargestellt.

Bei den Monolayer (ML)-Methoden findet die Differenzierung ausschließlich in zweidimensionaler Zellkultur statt, wobei die Zellen am Boden der jeweiligen Zellkulturfla-

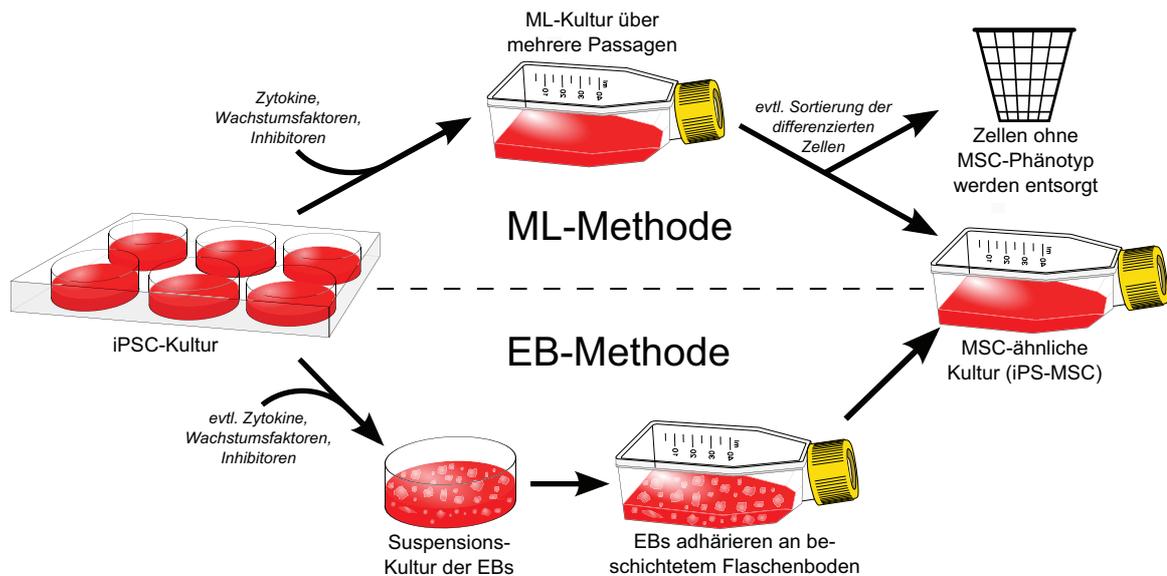


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der beiden häufigsten Methoden zur Differenzierung von iPSC zu iPS-MSC. Unterschiede zwischen einzelnen Arbeitsgruppen bestehen überwiegend in den Zusätzen, die dem Medium zugefügt werden. Oben: Monolayer (ML)-Methode; Unten: Embryoid Body (EB)-Methode.

sche oder -platte adhärirt wachsen. Die Zellen werden meist über mehrere Passagen kultiviert bzw. differenziert. Da bei dieser Methode meist heterogene Kulturen entstehen, müssen die gewünschten iPS-MSC anhand MSC-typischer Eigenschaften sortiert werden. Besonders für den Einsatz in der Regenerativen Medizin ist dies wichtig, da sonst verbliebene undifferenzierte pluripotente Stammzellen im Empfängerorganismus Teratome erzeugen können. Aber auch für weitere *in vitro*-Analysen ist eine heterogene Kultur kontraproduktiv. Die Zellen, die unvollständig, nicht oder in eine falsche Richtung differenziert sind, können die Forschungsergebnisse erheblich beeinträchtigen oder gar verfälschen. Wie oben beschrieben eignen sich für die Aufreinigung solch heterogener Kulturen besonders die Fluoreszenz-aktivierte und die magnetische Zellsortierung.

Neben den ML-Methoden sind die dreidimensionalen Embryoid Body (EB)-Methoden die zweite häufig angewandte Generierungsmethode von iPS-MSC. Hierbei wird zunächst eine Klümpchen-Bildung der pluripotenten Stammzellen forciert, indem die Zellen von der Kulturschale abgeschabt oder mit Hilfe von Enzymen abgelöst und anschließend mehrere Tage in Suspension weiter kultiviert werden. Die Zellklümpchen werden im Englischen als *embryoid bodies* bezeichnet und bilden sich während der ersten Stunden in Suspension ohne weitere Einwirkungen von außen, indem sie sich abrunden. Größe und Zellzahl eines EB können dabei stark variieren. Die pluripotenten Stammzellen differenzieren in dieser Phase spontan in Zelltypen aller drei Keimblätter. Auslöser dafür sind ausschließlich die Zell-Zell-Interaktionen sowie die veränderten (meist hypoxischen) Bedingungen im Inneren der Zellklumpen [84,85]. Dieser Vorgang erinnert stark an die embryonale Entwicklung nach dem Blastozysten-Stadium. Im Anschluss an die EB-Phase werden die Zellhaufen in beschichtete (meist gelatinierte) Zellkulturgefäße überführt. Zellen der äußeren EB-Schicht adhären am Kulturboden und es wachsen Zellen mit einer fibroblasten-ähnlicher Morphologie heraus. Diese Zellen werden im nächsten Schritt separiert und in Monolayer-Kultur weiter expandiert. Analysen ha-

ben gezeigt, dass die herausgewachsenen Zellen neben der spindelförmigen Morphologie auch ein typisches Genexpressionsmuster aufweisen, welches dem der mesenchymalen Stammzellen entspricht [86,87].

Für die Differenzierung von iPSC zu MSC werden dem Kulturmedium beider Methoden häufig Signalstoffe zugegeben. Dies können beispielsweise Wachstumshormone, Zytokine oder Transkriptionsfaktoren sein, welche spezifische Signalwege stimulieren und dadurch die gewünschte Differenzierung initiieren. Daneben können aber auch Moleküle verwendet werden, die spezifische Signalwege, welche essentiell für die Erhaltung der Pluripotenz sind, inhibieren. Ein Beispiel dafür ist der TGF- β -Signalweg. Durch dessen Inhibierung wird eine Differenzierung zu MSC ausgelöst, wie Mahmood *et al.* durch Zugabe des Moleküls SB431542 zeigen konnten [88]. Bei einer Variante der Monolayer-Methode konnten Liu *et al.* 2012 erfolgreich humane ESC und iPSC zu MSC-ähnlichen Zellen differenzieren, indem sie die pluripotenten Stammzellen auf einer dünnen, feinfaserigen Kollagen I-Beschichtung aussäten [89]. Nur wenige Zellen adhärten stabil auf dieser Oberfläche. Doch die wenigen nach 10 Tagen noch auf der Matrix adhärten Zellen wiesen eine spindelförmige Morphologie sowie typische mesenchymale Oberflächenproteine auf. Eine weitere Monolayer-Variante ist die Co-Kultur der pluripotenten Stammzellen auf einer Schicht muriner OP9-Zellen [90,91]. Auch hierbei konnten erfolgreich MSC-ähnliche Kulturen generiert werden. Dem gegenüber stehen die EB-Methoden, welche allerdings meist nur in den Medienzusätzen und den Zeitspannen der einzelnen Differenzierungsschritte variieren. Im Gegensatz zu der ML-Methode kann diese auch ohne jegliche Zusätze, Beschichtungen oder Co-Kulturen durchgeführt werden [92–94]. Hierbei ist die spontan auftretende Differenzierung in Kombination mit der anschließenden Selektion der Plastik-adhären Zellen scheinbar ausreichend.

Für die Untersuchungen und den Vergleich dieser beiden grundlegenden Methoden zur Generierung von iPS-MSC wurden im Rahmen dieser Arbeit eine einfache ML-Differenzierung sowie eine EB-Differenzierung gewählt. Bei letzterer wurden die iPSC nach sieben-tägiger EB-Phase mittels Plastikadhärenz innerhalb der folgenden sieben Tage selektiert und anschließend in einer Monolayer-Kultur expandiert. In beiden Fällen wurde das gleiche Differenzierungsmedium verwendet, so dass eventuelle Unterschiede im Differenzierungsverhalten direkte Rückschlüsse auf die Methode zuließen. Zur Induzierung der mesenchymalen Differenzierung wurden die Wachstumsfaktoren *basic fibroblast growth factor* (bFGF), *epidermal growth factor* (EGF) und *platelet-derived growth factor* (PDGF) als Signalstoffe ausgewählt. Diese Signalstoffe wurden zum Zeitpunkt des Projektbeginns (2011) von anderen Forschergruppen erfolgreich für die Herstellung von iPS-MSC verwendet [80,95].

1.4 Epithelial-mesenchymale Transition

Die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) ist allgemein ein Prozess, bei dem sich epitheliale Zellen in mesenchymale Zellen umwandeln. Dieser Prozess besteht aus einer Abfolge von Ereignissen, bei der die Epithelzellen zunächst ihre typische Polarisierung aufgeben. Charakteristische interzelluläre Adhäsions-Komplexe (*Gap/Tight/Adherens Junctions* und Desmosomen) werden abgebaut, woraufhin die Zell-Zell-Kontakte deut-

lich abnehmen und sich die Zellmorphologie von klein und gedrungen zu flach und langgestreckt entwickelt. Einhergehend mit dieser Strukturänderung ergibt sich auch eine neue Funktion des Gewebes. Der umgekehrte Prozess, also die Umwandlung von mesenchymalen zu epithelialen Zellen, wird entsprechend als mesenchymal-epitheliale Transition (MET) bezeichnet. Da sowohl die EMT als auch die MET unter anderem bei ausdifferenzierten somatischen Zellen auftreten, musste die frühere Annahme, dass Zellen ihren Phänotyp und ihre spezialisierte Funktion für immer behalten, revidiert werden [96].

Elizabeth Hay gilt als Vorreiterin auf diesem Gebiet und beschrieb zunächst eine „epithelial-mesenchymale Transformation“ [97,98]. Aufgrund der Reversibilität des Prozesses und zur Abgrenzung von einer neoplastischen Transformation, das heißt der Entwicklung eines bösartigen Tumors aus gesundem Gewebe, wurde „Transformation“ durch „Transition“ ersetzt, wodurch sich die heutige Bezeichnung ergab [96].

Es ist bekannt, dass die EMT in den verschiedensten Bereichen der Zellentwicklung eine Rolle spielt, ihr komplexer Vorgang ist allerdings noch nicht vollständig geklärt. Mit dem Ziel der Abgrenzung verschiedener EMT-Subtypen und deren differenziertere Analyse konnten in den Jahren 2007 und 2008 bei EMT-Tagungen in Polen und den USA drei verschiedene Untergruppen klassifiziert werden.

Typ 1 EMT

Die Typ 1 EMT ist in der Organentwicklung sowie in einem frühen Stadium der Embryogenese von Bedeutung und betrifft z.B. die Ausbildung der Keimblätter (Gastrulation) und der Neuralleiste [96,99]. Letzteres ist entscheidend für die Entstehung des peripheren Nervensystems. Sowohl in der Embryogenese als auch der Organentwicklung entstehen dabei aus primitiven Epithelzellen mesenchymale Zelltypen [100]. Diese besitzen die Eigenschaft zu migrieren und sind somit essentiell für die fortschreitende Entwicklung eines Embryos. Sind die migrierenden Zellen am Zielort angelangt, können sie sich über eine MET wieder in epitheliale Zellen umwandeln und entsprechend neues Epithelgewebe ausbilden. Dieser Vorgang wiederholt sich während der gesamten Entwicklung eines Embryos mehrfach.

Typ 2 EMT

Die Typ 2 EMT wird mit der Wundheilung, der Organfibrose¹ und der Regeneration von Gewebe assoziiert. Er wird auch als „epithelial-fibroblastoide Transition“ bezeichnet, da hierbei Fibroblasten die Zielzellen darstellen [100]. Ausgelöst wird dieser Prozess von Entzündungszellen oder -signalen. Neben Epithelzellen der verschiedenen Organgewebe können sich auch Endothelzellen in Fibroblasten entwickeln. Zunächst bilden sich Zellen, die sowohl epitheliale als auch mesenchymale/fibroblastoide Marker aufweisen. Diese, durch partielle EMT entstandenen Zellen, können durch das Epithelgewebe und die darunterliegende Basalmembran in das defekte Gewebe einwandern, wo sie schließlich einen ganzheitlich fibroblastoiden Phänotyp annehmen [96]. Im Gegensatz zum ersten Typ hält dieser Prozess nur so lange an, bis die auslösende Entzündung geheilt oder das beschädigte bzw. abgestorbene Gewebe ersetzt wurde [96]. Im Falle einer Fibrose kann es jedoch auch zu einer dauerhaften EMT und somit zu Organschäden kommen [101].

¹Organfibrose ist die krankhafte Vernarbung von Organen

Typ 3 EMT

Die dritte Untergruppe der epithelial-mesenchymalen Transition ist Teil der Krebsbildung in epithelialen Geweben. Durch das Auftreten einer Typ 3 EMT entstehen bösartige Tumore, welche zudem Metastasen im gesamten Körper bilden können. Voraussetzung für den kanzerogenen Übergang von epithelialen zu mesenchymalen Zellen ist eine genomische Veränderung, wie sie bei Krebszellen auftritt. Typischerweise werden Zellen mit fibroblastoidem/mesenchyalem Phänotyp am Rand von bösartigen, primären Tumoren beobachtet. Diese Zellen exprimieren mesenchymale Marker wie Vimentin, ACTA2 (α -smooth muscle actin) und FSP1 (*Fibroblast-specific protein 1*). Die Expression von typischen epithelialen Markern wie E-Cadherin geht hingegen zurück [96]. Indem die mesenchymalen Krebszellen zusätzlich verschiedene Wachstumsfaktoren, wie z.B. TGF- β , PDGF und bFGF, sekretieren, dienen sie den epithelialen Krebszellen auch als Feeder-Zellen [102]. Die Krebszellen mit mesenchyalem Charakter besitzen ebenfalls die Eigenschaft zu migrieren. Über die Blutbahn gelangen sie so in andere Bereiche des Körpers und können dort mittels MET Metastasen, sogenannte sekundäre Tumore, bilden.

Zwar konnten somit erfolgreich drei Untergruppen der EMT anhand ihres Auftretens und der resultierenden Zellen bestimmt werden, eine Einteilung anhand von Genexpressionsdaten ist hingegen sehr schwer. Die meisten beteiligten Gene werden bei allen Subtypen hoch- bzw. herunterreguliert. So spiegelt sich der Abbau der interzellulären Adhäsions-Komplexe als zentraler Bestandteil der EMT auf molekularer Ebene in der Reduktion des Zelladhäsionsproteins E-Cadherin, den Proteinen der Extrazellulärmatrix Laminin 1 und Kollagen IV α 1 sowie Zytokeratinen und ZO-1 wider. Mesenchymale Marker, wie z.B. Vimentin, Fibronectin, ACTA2 und FSP1 werden dagegen generell hochreguliert. Ebenso nimmt die Expression der EMT-Mediatoren Slug, Snail, Twist und ZEB1 zu.

Derzeit können nur wenige Typ-spezifische Gene bzw. Gene, die einen EMT-Subtyp ausschließen lassen, genannt werden. Da dies ein sehr breit gefächertes Forschungsgebiet darstellt und die Unterteilung in drei Subtypen nur wenige Jahre zurück liegt, kann es gut möglich sein, dass einige Korrelationen zwischen Genen und EMT-Untergruppe noch nicht bekannt sind. Tabelle 1.1 gibt Aufschluss über einige häufig genannte und nachweislich bei der EMT hoch- oder herunterregulierte Gene. Soweit bekannt, wurden diese den EMT-Subtypen zugeordnet.

1.4.1 Generierung von iPS-MSK ist eine EMT

Induzierte pluripotente Stammzellen gehören ebenso wie die embryonalen Stammzellen zu der Gruppe der Epithelzellen. Aufgrund dessen sowie der Tatsache, dass sich pluripotente Stammzellen in alle Zelltypen des jeweiligen Organismus differenzieren lassen, ist es naheliegend, dass es sich bei der *in vitro*-Differenzierung von iPSC zu MSC um eine Typ 1 EMT handelt. Bei diesem Subtyp werden ausgehend von pluripotenten (epithelialen) Zellen mesenchymale Zelltypen „produziert“, vergleichbar mit der embryonalen Entwicklung. Gegen eine Typ 2 EMT spricht, dass bei dieser normalerweise gewebespezifische Epithelien und keine Stammzellen als Ausgangszellen dienen. Ebenso

Tabelle 1.1: Liste der hoch- und herunterregulierten Markergene, welche mit dem Vorgang der EMT assoziiert werden. Wenn eine Zuordnung zu einem der drei EMT-Subtypen bekannt ist, wurde diese aufgelistet. ACTA2: α -smooth muscle actin, CDH1: E-Cadherin, CDH11: OB-Cadherin, CDH2: N-Cadherin, CLDN3/7: Claudin 3 bzw. 7, COL1A1: Kollagen I α 1, COL3A1: Kollagen III α 1, COL4A1: Kollagen IV α 1, FOXC2: Forkhead box protein C2, FN1: Fibronektin, FSP1: Fibroblast-specific protein 1, GSC: Goosecoid, LEF-1: Lymphoid enhancer-binding factor 1, MMP2/9: Matrix metallo-peptidase 2 bzw. 9, OCLN: Occludin, PDGFRA: platelet-derived growth factor receptor α , SNAI1: Snail, SNAI2: Slug, TWIST1: Twist, VIM: Vimentin, ZEB2: Zinc finger E-box binding homeobox 2, ZO-1/TJP1: Zonula Occludens Protein 1/Tight Junction Protein 1.

Markergen	EMT-Typ	Quelle
<i>hochregulierte Gene</i>		
ACTA2	2, 3	[96, 100]
CDH11	3	[100]
CDH2	1, 2, 3	[100, 103, 104]
COL1A1	1, 2, 3	[96]
COL3A1	1, 2, 3	[96]
FN1	1, 2, 3	[100, 103]
FOXC2	1, 2, 3	[96, 100, 103]
FSP1	1, 2, 3	[96, 100]
GSC	1, 2, 3	[96, 100]
LEF-1	1, 2, 3	[100]
MMP2		[105–107]
MMP9		[106, 107]
PDGFRA		[105]
SNAI1	1, 2, 3	[96, 100, 103, 108]
SNAI2	1, 2, 3	[96, 100, 103, 108]
TWIST1	1, 2, 3	[96, 100, 103, 108]
VIM	1, 2, 3	[96, 100, 103]
ZEB2	3	[103, 106]
<i>herunterregulierte Gene</i>		
CDH1	1, 2, 3	[96, 100, 103]
CLDN3		[105]
CLDN7		[105]
COL4A1	1, 2, 3	[100]
Laminin 1	1, 2, 3	[100]
OCLN		[105] [109]
ZO-1/TJP1	1, 2, 3	[100]
Zytokeratin	1, 2, 3	[100]

ist eine Typ 3 EMT unwahrscheinlich. Bei diesem Subtyp würden maligne Karzinome anstatt der gewünschten iPS-MSC generiert werden. Sowohl der Generierungsmechanismus von iPS-MSC als auch die drei EMT-Untergruppen sind sehr komplex und bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt. Die Tatsache, dass es sich bei der *in vitro*-Differenzierung von ESC und iPSC zu MSC um eine epithelial-mesenchymale Transition handelt, scheint allgemein anerkannt zu sein [110]. 2007 konnten Ullmann *et al.* zeigen, dass sich in Feeder-freien ESC-Kulturen am Rand der Kolonien über eine spontane EMT

Zellen mit mesenchymalem Charakter bilden [111]. Weitere Experimente unterschiedlicher Forschergruppen konnten zeigen, dass während der Differenzierung pluripotenter Stammzellen in mesenchymale Richtung eine Expressionsabnahme typischer epithelialer und pluripotenter Marker (z.B. OCT4, SOX2, NANOG, E-Cadherin, Claudin, Occludin) und eine Expressionssteigerung typischer EMT-Marker (SNAI1 (Snail) und 2 (Slug), TWIST, ZEB1 und 2, CDH2, MMP2 und 9) auftraten [89, 104, 105, 112]. Zudem wiesen die generierten iPS-MSC klassische MSC-assoziierte Marker (CD44, CD73, CD90 und CD105) auf. Schließlich beschrieben Chen *et al.* die Differenzierung von ESC zu mesenchymalen oder Fibroblasten-ähnlichen Zellen als einen Prozess, der dem EMT Typ 1 während der Embryogenese ähnelt [104].

Als allgemeine Auslöser einer epithelial-mesenchymalen Transition gelten vor allem Expressions- und Verteilungsänderungen verschiedener Wachstumsfaktoren (bFGF, PDGF, EGF und TGF- β) und Transkriptionsfaktoren (Snail, Twist). Wie in Abschnitt 1.3 beschrieben, werden insbesondere diese Wachstumsfaktoren häufig verwendet, um eine Differenzierung von induzierten pluripotenten zu mesenchymalen Stammzellen einzuleiten.

2 Zielsetzung der Arbeit

Wie in Kapitel 1 erläutert wird den induzierten pluripotenten Stammzellen ein großes Potential zur Anwendung in der Regenerativen Medizin zugesprochen. Insbesondere bieten sie eine potentiell unendliche Proliferations- und Differenzierungskapazität sowie die Möglichkeit, als autologe Zellen für die Regeneration verschiedenster Gewebe eingesetzt zu werden. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation soll daher untersucht werden, inwieweit iPSC als alternative Zellquelle für MSC und zur Erzeugung mesenchymaler Zelltypen geeignet sind. Zudem soll der Differenzierungsprozess vom pluripotenten zum multipotenten Stadium genauer untersucht werden.

Wichtig für die Verwendung induziert pluripotenter Stammzellen verschiedenen Ursprungs und Alters ist, dass sie alle die gleichen Eigenschaften sowie einheitliche Differenzierungspotentiale besitzen. Im ersten Teil dieser Arbeit sollten daher geprüft werden, ob die verschiedenen uns zur Verfügung gestellten iPSC-Populationen eine gleichbleibende Qualität aufweisen. Dazu wurden charakteristische Pluripotenzmarker auf mRNA- und Protein-Ebene in iPSC unterschiedlichen Alters und Ursprungs analysiert. Verwendet wurden ausschließlich humane iPSC, welche aus Endothelzellen aus dem Nabelschnurblut, aus hämatopoetischen Stammzellen oder Vorhautfibroblasten mit Hilfe der Thomson-Faktoren (OCT4, SOX2, NANOG und LIN28) lentiviral reprogrammiert wurden.

Da iPSC jedoch onkogen sind, können sie nicht direkt transplantiert werden. Werden sie jedoch zu mesenchymalen Stammzellen differenziert, bieten sie ein breites Spektrum an Einsatzmöglichkeiten. In den letzten Jahren haben sich insbesondere zwei Methoden für die Generierung dieser iPS-MSC herauskristalliert: Die Monolayer- und die Embryoid Body-Methode. Der zweite Teil dieser Arbeit befasst sich daher mit der Differenzierung von iPSC zu MSC mittels ML- und EB-Methode. Beide Methoden sollten in Bezug auf deren Handhabung und Kosten der Durchführung sowie die Qualität und Homogenität der resultierenden Zellen bewertet werden. Um letzteres bewerten zu können, wurden die generierten iPS-MSC mit nativen MSC des Knochenmarks verglichen. Hierfür wurden typische MSC-Marker auf mRNA- und Protein-Ebene analysiert sowie die adipogenen, osteogenen und chondrogenen Differenzierungskapazitäten mit denen der hBMSC verglichen.

Neben dem Vergleich der Generierungsmethoden von iPS-MSC ist auch der Differenzierungsprozess selbst von großem Interesse. Durch dessen nähere Analyse sollten Optimierungsmöglichkeiten entwickelt und getestet werden. Der dritte und letzte Teil dieser Arbeit befasst sich daher mit verschiedenen Modifizierungen beider Differenzierungsmethoden. Im Hinblick auf eine klinische und vor allem autologe Anwendung der iPS-MSC standen hierbei die Verkürzung der benötigten Generierungszeit sowie die Qualitätssteigerung der resultierenden iPS-MSC im Mittelpunkt.

3 Methoden

In den folgenden Abschnitten werden die angewandten Methoden erläutert und deren Durchführungen beschrieben. Listen aller verwendeten Geräte, Materialien und Hilfsmittel sowie die Zusammensetzungen von selbst angesetzten Puffern, Lösungen und Medien sind im Anhang aufgeführt (Abschnitte A.1 bis A.3).

3.1 Ethikerklärung

Für diese Arbeit wurden hBMSC aus Knochenmarkproben von Spendern verwendet, die eine Erkrankung des Bewegungsapparates aufwiesen. Das Knochenmark war von der Erkrankung jedoch nicht betroffen und wurde an der Medizinischen Hochschule Hannover mittels Beckenkammpunktion im Zuge des geplanten chirurgischen Eingriffes gewonnen. Das Ethische Komitee der Medizinischen Hochschule Hannover hat die Verwendung der Proben zu Forschungszwecken genehmigt (Antrag 2562 und 565). Von allen Spendern liegt eine schriftliche Einwilligung vor. Zudem wurden alle personengebundenen Daten anonymisiert.

3.2 Zellkultur

Die humanen Zellen aller im Folgenden beschriebenen Kultivierungs- und Differenzierungsexperimente wurden in einem Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 85 % kultiviert. Alle Arbeiten mit den Zellkulturen wurden an einer Reinraumwerkbank und mit sterilen Materialien durchgeführt. Konfluenz und Morphologien der Kulturen wurden regelmäßig am Phasenkontrastmikroskop untersucht.

3.2.1 Aufreinigung und Kultivierung von humanen MSC aus Knochenmark

Die mesenchymalen Stammzellen wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation und anschließender Plastikadhäsion aus Knochenmarkaspiraten isoliert. Dazu wurden die frisch entnommenen und mit Heparin versetzten Proben mit dem dreifachen Volumen an Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) vermischt. Um eventuell enthaltene Gewebereste zu entfernen, wurde die Lösung über ein Zellsieb (100 µm Porendurchmesser) filtriert. In 50 mL-Zentrifugenröhrchen wurde anschließend Biocoll-Lösung vorgelegt und diese vorsichtig mit dem doppelten Volumen an Zellsuspension überschichtet. Diese wurden 30 Minuten (min) bei 500 x g und ohne Bremse zentrifugiert.

Die Biocoll-Lösung enthält das Polymer Polysucrose und weist mit 1,077 g/mL eine höhere Dichte als Wasser (ca. 0,998 g/mL bei 20 °C) oder wässrige Lösungen auf. Durch die Zentrifugation werden die Bestandteile der Zellsuspension nach ihrer Dichte aufgetrennt (siehe Abbildung 3.1). Die roten Blutzellen sinken nach unten, darüber bildet sich eine Schicht mit Granulozyten und zwischen der darauf folgenden Biocoll- und der abschließenden Plasma-Schicht befindet sich die Interphase. Diese Phase enthält die

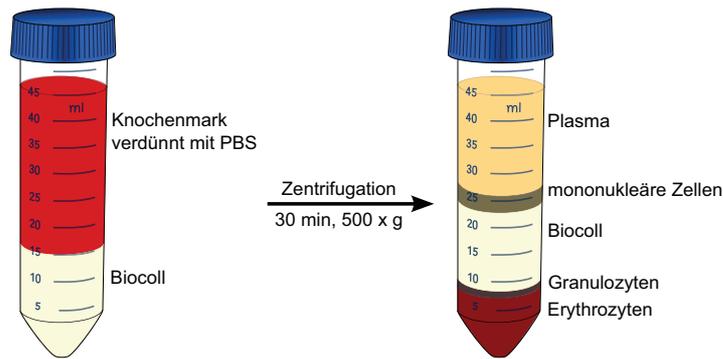


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Aufreinigung von MSC aus verdünnten Knochenmarkspiraten mittels Dichtegradientenzentrifugation und unter Verwendung der Trennlösung Biocoll.

mononukleären Zellen, darunter auch die mesenchymalen Stammzellen. Mit Hilfe einer langen Pasteurpipette wurde diese Schicht abgenommen und mit dem gleichen Volumen an PBS vermischt. Die Suspension wurde 5 min bei 500 x g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet in MSC-Wachstumsmedium (MSC-GM) resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde anschließend in eine passende Zellkulturflasche überführt (siehe Tabelle 3.1) und als Passage 0 definiert.

Tabelle 3.1: Auswahl der Zellkulturflasche zur Aussaat der mittels Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigten mononukleären Zellen (inkl. hBMSC) in Abhängigkeit von der Anzahl der Gradienten.

Anzahl der Gradienten	Wachstumsfläche der Zellkulturflasche / cm ²
1	75
2	175
4	300

Am darauffolgenden Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, danach alle drei bis vier Tage. Die hBMSC adhären am Flaschenboden, andere mononukleäre Zellen aus der Interphase wurden durch die Mediumwechsel entfernt. Erreichte eine Zellkultur eine Konfluenz von etwa 70 %, wurde diese passagiert. Dazu wurde das Kulturmedium abgenommen und die adhären Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA-Lösung überschichtet (Volumina entsprechend Tabelle 3.2) und etwa 5 min bei 37 °C inkubiert, bis sich die Zellen durch leichtes Klopfen gegen die Zellkulturflasche vom Boden lösten. Um das Trypsin zu neutralisieren, wurden die Zellen in MSC-GM suspendiert. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt. Danach wurden die Zellen mit 2.000 Zellen pro cm² wieder Wachstumsfläche ausgesät.

3.2.2 Gelatinieren von Zellkulturflaschen und -platten

Bei der Differenzierung von iPSC zu MSC und der Verwendung von iPS-MSC-Medium wurden die verwendeten Zellkulturflaschen und -platten zuvor mit Gelatine B beschichtet. Dazu wurde eine 2 %ige sterile Gelatine-Lösung bei 37 °C im Wasserbad verflüssigt. Die Kulturschalenoberfläche wurde anschließend mit 100 µL Gelatine-Lösung pro cm²

Tabelle 3.2: Volumina der zum Passagieren von hBMSC verwendeten Lösungen in Abhängigkeit von der ausgehenden Wachstumsfläche in den Zellkulturflaschen.

Wachstumsfläche / cm ²	PBS / mL	Trypsin/EDTA-Lösung / mL	MSC-GM / mL
300	20	5	15
175	10	3	12
75	5	2	8
25	2	1	4

Grundfläche bedeckt und mindestens 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die überschüssige Lösung abgenommen und die Kulturschalenoberfläche einmal mit 100 µL PBS pro cm² gewaschen. Um die Gelatine-Schicht vor dem Austrocknen zu schützen, wurde das PBS erst direkt vor der Aussaat der Zellen wieder entfernt.

3.2.3 Differenzierung von iPSC zu iPS-MSK und deren Kultivierung

Die humanen induzierten pluripotenten Stammzellen wurden in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Ulrich Martin und Dr. Robert Zweigerdt an der Medizinischen Hochschule Hannover aus Gewebezellen unterschiedlichen Ursprungs generiert (vergleiche Tabelle 3.3). Die Reprogrammierung wurde mittels lentiviraler Überexpression der „Thomson-Faktoren“ (OCT4, SOX2, NANOG und LIN28) induziert und die erhaltenen iPSC auf bestrahlten embryonalen Maus-Fibroblasten (im Folgenden auch als Feeder-Zellen bezeichnet) in 6-Loch-Platten kultiviert. Für alle Experimente, die die Differenzierung von iPSC zu MSC beinhalten, wurden die iPSC zuvor für zwei Passagen auf MatrigelTM (im Folgenden: Matrigel) kultiviert. Somit sollte ausgeschlossen werden, dass die Feeder-Zellen selbst oder die von ihnen sekretierten Faktoren die Differenzierung oder die parallel durchgeführten Analysen beeinflussen. Diese iPSC wurden in die eigenen Labore transportiert und dort weiter kultiviert. Die verwendeten iPSC-Populationen sind in Tabelle 3.3 aufgeführt.

Tabelle 3.3: Informationen zu den verwendeten iPS-Zelllinien. Die Abkürzungen geben die im Text genutzten Bezeichnungen an. Als Reprogrammierungs-Vektoren wurden die „Thomson-Faktoren“ (OCT4, SOX2, NANOG und LIN28) verwendet.

Zelllinie	Abkürzung	Ursprungsgewebe	Klon
hCBiPSC2	hCB-iPSC	Endothelzellen aus Nabelschnurblut	2
HSC_F1285_T-IPS2	hHSC-iPSC	Hämatopoetische Stammzellen	1285
hFF-1-iPS4	hFF-iPSC	Vorhaut-Fibroblasten	4

Zur Generierung von iPS-MSK wurden zwei verschiedene Methoden angewandt: die ML-Methode und die EB-Methode. Beide Methoden sind an die Differenzierungen von

Lai *et al.* und Lian *et al.* angelehnt [80, 95]. Abbildung 3.2 gibt einen schematischen Überblick über beide Methoden. Deren Durchführungen werden in den folgenden Abschnitten 3.2.3.1 und 3.2.3.2 näher erläutert.

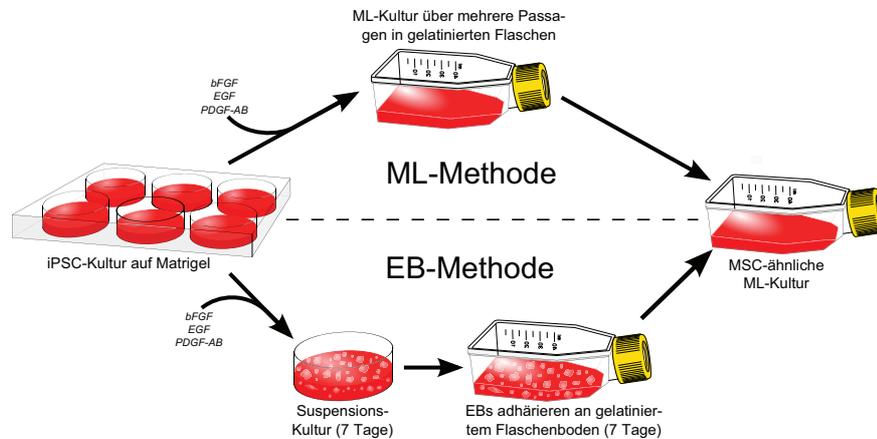


Abbildung 3.2: Schematische Gegenüberstellung der Monolayer- (oben) und der Embryoid Body-Methode (unten) zur Differenzierung von iPSC zu MSC.)

3.2.3.1 Monolayer-Methode

Für die ML-Methode wurden annähernd konfluent gewachsene iPSC mit 1 mL PBS pro Loch (einer 6-Loch-Platte) gewaschen und mit je 500 μL 0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA-Lösung bei Raumtemperatur (RT) inkubiert, bis sich die Zellen vom Kulturboden gelöst haben (2-3 Minuten). Anschließend wurden 500 μL iPS-MSC-Medium mit 10 μM Rho-Kinase-Inhibitor (ROCK-Inhibitor) zugegeben und die Zellen zwei- bis dreimal vorsichtig hoch und runter pipettiert, um eine Zellsuspension mit möglichst vielen Einzelzellen zu erzeugen. Diese Zellsuspension wurde in ein 15 mL-Zentrifugenröhrchen überführt und bei 200 x g 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, die Zellen vorsichtig in iPS-MSC-Medium mit ROCK-Inhibitor resuspendiert und anschließend mit 15.000 Zellen pro cm^2 in gelatinisierten Zellkulturflaschen ausgesät. Alle drei bis vier Tage wurde ein Mediumwechsel vorgenommen, wobei iPS-MSC-Medium ohne ROCK-Inhibitor-Zusatz verwendet wurde. Bei einer Konfluenz von 70 bis 80 % wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Medium abgesaugt, der Zellrasen einmal mit PBS gewaschen und mit 0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA-Lösung überschichtet (Volumina entsprechend Tabelle 3.2). Die Zellen wurden so lange bei 37 °C inkubiert, bis sich diese durch leichtes Klopfen an den Flaschenrand vom Boden lösten. Anschließend wurden sie wie zuvor beschrieben in Medium suspendiert, gezählt und wieder angesät. Sowohl die Verwendung von ROCK-Inhibitor im Medium als auch die Aussaatdichten waren abhängig von der Passage, in der sich die Zellen nach dem Passagieren befanden. Grund dafür ist die hohe Sensitivität der Einzelzellen in Suspension. Mit zunehmender Passage und der damit fortschreitenden Differenzierung werden die iPS-Zellen stabiler und benötigen weniger bzw. kein ROCK-Inhibitor mehr zur Stabilisierung. Zudem konnten die Zellen mit immer geringerer Zelldichte ausgesät werden. Im Rahmen der

Vorversuche hatten sich die in Tabelle 3.4 aufgeführten Zelldichten und dem Medium zugegebenen ROCK-Inhibitor-Konzentrationen als geeignet herausgestellt und wurden standardmäßig bei der Differenzierung mittels ML-Methode verwendet.

Tabelle 3.4: Ausgesäte Zelldichten und verwendete ROCK-Inhibitor-Konzentrationen während der Differenzierung von iPSC zu MSC mittels ML-Methode. Diese waren abhängig von der Passage der ausgesäten Zellen

Passage	Zelldichte / Zellen pro cm ²	ROCK-Inhibitor / μ M
1	15.000	10
2	10.000	10
3	8.000	10
4	7.000	5
5	5.000	5
6	3.000	5
≥ 7	2.000	-

3.2.3.2 Embryoid Body-Methode

Die annähernd konfluent gewachsenen iPSC-Zellen wurden mit je 1 mL PBS pro Loch (einer 6-Loch-Platte) gewaschen und anschließend mit je 1 mL iPSC-MSC-Medium überschichtet. Mit Hilfe eines Zellschabers wurde der Zellrasen abgekratzt, wodurch sich unregelmäßig große, lose im Medium schwimmende Embryoid Bodies bildeten. Diese wurden in Petrischalen für Suspensionskulturen überführt, wobei je Loch eine Petrischale verwendet wurde. In jede Schale wurden weitere 2 mL Medium zugegeben und die Zellen sieben Tage als Suspension kultiviert. An Tag 2 oder 3 und an Tag 5 wurde das Medium gewechselt. Dafür wurde jeweils die Suspension einer Petrischale vorsichtig in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und kurz (2 bis 3 min) bei 200 x g zentrifugiert. Das Medium wurde mit Hilfe einer Pipette abgenommen, ohne einzelne EBs mitzunehmen. Ein kleiner Rest, ca. 500 μ L, Medium verblieb im Röhrchen. Die EBs wurden anschließend mit 3 mL frischem iPSC-MSC-Medium wieder in Petrischalen überführt.

An Tag 7 der Differenzierung wurden die EBs wie oben beschrieben in Zentrifugenröhrchen überführt und das Medium abgenommen. Je Röhrchen wurden die Zellen mit 5 mL frischem Medium in eine gelatierte T25-Zellkulturflasche gegeben und für weitere sieben Tage kultiviert. Ein Mediumwechsel wurde an Tag 9 oder 10 und 12 durchgeführt. Das Medium wurde dabei mit einer 10 mL-Pipette vorsichtig abgenommen, so dass keine EBs aus der Flasche entfernt wurden, und neues Medium zugegeben.

An Tag 14 der Differenzierung wurden zunächst die schwimmenden und adhärennten EBs mit Hilfe einer Pasteurpipette entfernt. Die herausgewachsenen Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit 1 mL 0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA-Lösung pro T25-Flasche bei 37 °C inkubiert, bis sich die Zellen bei leichtem Klopfen gegen die Flasche abgelöst haben. Anschließend wurden die Zellen mit iPSC-MSC-Medium vorsichtig abgespült und in einem geeignetem Zentrifugenröhrchen gesammelt. Die Zellzahl wurde mittels Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt und die Zellsuspension bei 200 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in iPSC-MSC-Medium resuspendiert

und in geeigneten gelatinierten Zellkulturflaschen mit 5.000 Zellen pro cm^2 wieder ausgesät. Ein Mediumwechsel erfolgte alle drei bis vier Tage. Bei einer Konfluenz von 70 bis 80 % wurden die Zellen erneut passagiert. Ab dieser zweiten Passage wurden die Zellen mit 2.000 Zellen pro cm^2 ausgesät und ab der 3. Passage wurde MSC-Medium verwendet.

3.2.4 Einfrieren und Auftauen von MSC und iPS-MSC

Zum Einfrieren wurden MSC und iPS-MSC mit PBS gewaschen, mit Trypsin abgelöst und die Zellzahl bestimmt (siehe oben). Danach wurde die Zellsuspension 5 min bei 200 x g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen in 1 mL Kryokonservierungsmedium je 10^6 Zellen resuspendiert. Für MSC und iPS-MSC, die zuvor mit MSC-Medium kultiviert wurden, setzte es sich aus 95 % FCS und 5 % Dimethylsulfoxid zusammen. Für iPS-MSC, die zuvor mit iPS-MSC-Medium kultiviert wurden, wurde anstelle des FCS Serum Replacement verwendet. Anschließend wurden je 500 oder 1000 μL der Zellsuspension in geeignete Kryogefäße pipettiert und über Nacht bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren. Ab dem darauffolgenden Tag wurden die Zellen bei $-150\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Zum Auftauen wurden die Zellen im $37\text{ }^\circ\text{C}$ warmen Wasserbad zügig aufgetaut und sofort in mit Medium vorbereitete Zellkulturflaschen überführt. Am darauffolgenden Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, danach alle 3 bis 4 Tage.

3.2.5 Mesodermale in vitro-Differenzierung

Für die adipogene, osteogene und chondrogene Differenzierung wurden hBMSC und iPS-MSC wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben und iPSC wie für die ML-Methode (Abschnitt 3.2.3.1) abgelöst.

3.2.5.1 Adipogenese und Osteogenese

Die Adipogenese und die Osteogenese wurden als Monolayer-Methode durchgeführt. Dafür wurden hBMSC und iPS-MSC mit 5.000 Zellen pro cm^2 , iPSC mit 30.000 Zellen pro cm^2 in 6-Loch-Platten ausgesät. Für letztere wurden die Platten grundsätzlich gelatiniert. Sobald die jeweilige Kultur konfluent gewachsen war, fand ein Mediumwechsel zum entsprechenden Differenzierungsmedium (adipogenes bzw. osteogenes Medium) statt. Wenn nicht anders beschrieben, wurden die Kontrollen ab diesem Zeitpunkt in MSC-GM ohne bFGF (Kontrollmedium) kultiviert. Alle Kulturen wurden über vier Wochen mit Differenzierungs- bzw. Kontrollmedium kultiviert, wobei das Medium alle drei bis vier Tage gewechselt wurde.

3.2.5.2 Chondrogenese

Im Gegensatz zur Adipo- und Osteogenese wurde die Chondrogenese in einer 3D-Pelletkultur induziert. Dafür wurden 250.000 hBMSC bzw. iPS-MSC oder 500.000 iPSC pro Pellet verwendet. Zunächst wurden die abgelösten Zellen in ein 50 mL-Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei 200 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in 10 mL chondrogenem Grundmedium resuspendiert und für die Differenzierung und die Kontrollen in getrennte Zentrifugenröhrchen aufgeteilt. Die Zellen wurden

erneut 5 min bei 200 x g zentrifugiert und der Überstand wieder abgesaugt. Anschließend wurden die Kontrollzellen in chondrogenem Kontrollmedium und die Zellen für die Chondrogenese in chondrogenem Differenzierungsmedium resuspendiert. Je 250.000 (hBMSC, iPS-MSC) bzw. 500.000 (iPSC) Zellen wurden in 15 mL-Zentrifugenröhrchen vorgelegt. Zum Pelletieren der Zellen wurden diese noch einmal wie zuvor zentrifugiert und mit leicht aufgedrehten Röhrchen im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurde jedes Pellet durch leichtes schnipsen gegen das Röhrchen vom Boden gelöst und vorsichtig das Medium gewechselt. Danach wurde alle drei bis vier Tage ein Mediumwechsel durchgeführt.

3.3 Histologische Färbungen

Um differenzierungsspezifische histologische Färbungen durchzuführen, wurden die als Monolayer kultivierten Zellen zunächst mit *para*-Formaldehyd (PFA) fixiert und anschließend mit verschiedenen Färbelösungen inkubiert. Alle Ergebnisse wurden am Mikroskop fotografisch festgehalten.

3.3.1 PFA-Fixierung

Mit der PFA-Fixierung wird ein vorliegender Zustand von Zellen festgehalten sowie postmortale Verfallserscheinungen unterbunden. PFA vernetzt über Aminogruppen Oberflächenproteine miteinander und fixiert so die Zellstrukturen.

Für die Fixierung wurde das Medium über den Zellen abgesaugt. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und anschließend 30 min mit 4 %iger [w/v] PFA-Lösung bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Fixier-Lösung abgenommen und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit PBS bedeckt und bei 4 °C gelagert.

3.3.2 Histologischer Nachweis der osteogenen Differenzierung

Der Nachweis der osteogenen Differenzierung beruht auf der Tatsache, dass Osteoblasten Hydroxylapatit ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$), ein Calciumphosphat, in die extrazelluläre Matrix einlagern. Die darin gebundenen Phosphat- und Calciumionen können spezifisch mit der Von Kossa- und der Alizarin Rot-Färbung nachgewiesen werden

Von Kossa-Färbung

Die von Kossa-Färbung ist wohl die bekannteste histologische Färbung osteogen differenzierter Zellen [113]. Zur Färbung wird eine Silbernitrat (AgNO_3)-Lösung verwendet. Die Silberionen reagieren mit der phosphatreichen mineralisierten Extrazellulärmatrix, genauer mit dem Hydroxylapatit, und es entsteht gelbes Silberphosphat (Ag_3PO_4). Unter Lichteinfluss wird dieses allerdings schnell zersetzt und elementares Silber wird gebildet, wodurch die typisch braun-schwarze Färbung zustande kommt.

Vor der Färbung wurden die fixierten Zellen dreimal mit demineralisiertem Wasser gewaschen. Diese wurden für 10 min bei RT mit 5 %iger [w/v] Silbernitrat-Lösung inkubiert und anschließend erneut dreimal mit demineralisiertem Wasser gewaschen. Die Platten wurden so lange bei Tageslicht stehen gelassen, bis sich die Färbung nicht weiter veränderte.

Alizarin Rot-Färbung

Auch mit dieser Methode kann die Mineralisierung der Extrazellulärmatrix nachgewiesen werden. Das Färbemittel Alizarin S gehört zu den Anthrachinonen und bildet mit Metallionen stabile und farbintensive Komplexe. In diesem Fall bildet sich ein roter Komplex mit den Ca^{2+} -Ionen des Hydroxylapatits.

Für die Färbung wurde eine 2 %ige [w/v] Alizarin S-Lösung in Wasser hergestellt. Diese wurde mit 1 M Natronlauge auf einen pH-Wert von 9,5 eingestellt und anschließend filtriert. Die fixierten Zellen wurden dreimal mit demineralisiertem Wasser gewaschen und für 10 min bei RT mit der Färbelösung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden die Zellen mit demineralisiertem Wasser bedeckt und für mindestens eine Nacht bei 4 °C stehen gelassen, damit auch eingeschlossene Farbe wieder austreten konnte. Am nächsten Tag wurde erneut das Wasser gewechselt.

3.3.3 Histologischer Nachweis der adipogenen Differenzierung

Spezifisch für Fettzellen sind die Lipid Droplets (LDs) oder Fett-Vakuolen im Zellplasma. Diese enthalten überwiegend Triacylglyceride und können spezifisch angefärbt werden. Zum Nachweis der adipogenen Differenzierung wurden der Diazofarbstoff Oil Red O und der Fluoreszenzfarbstoff BODIPY 493/503 verwendet.

Oil Red O-Färbung

Oil Red O ist ein fettlöslicher roter Diazofarbstoff. Dieser bindet an Triacylglyceride und andere Fettsäuren, wodurch die LDs als rote Vakuolen sichtbar werden [114]. Die Färbelösung wurde aus 5 mg Oil Red O pro 1 mL 60 %igem [v/v] *iso*-Propanol hergestellt und anschließend filtriert. Die fixierten Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend 25 min bei RT mit der Färbelösung inkubiert. Danach wurde die Lösung abgenommen und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen.

BODIPY-Färbung

BODIPY ist abgeleitet von Bordipyrrromethen und steht für 4,4-difluoro-1,3,5,7,8-pentamethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene. Dies ist eine Gruppe von Fluoreszenzfarbstoffen, die allgemein eine hohe chemische sowie photochemische Stabilität aufweisen. Aufgrund ihrer sehr guten Fluoreszenzausbeute (bis 90 %) sind sie besonders als Biomarker geeignet [115,116]. Bei dem Nachweis einer adipogenen Differenzierung binden die BODIPY-Moleküle an die Fettmolekül der LDs. Dadurch wird ihr aromatische π -Elektronensystems erweitert und das Absorptionsverhalten des Farbstoffes verändert sich so, dass Licht im grünen Bereich (510 nm) des sichtbaren Spektrums emittiert wird. Der Farbstoff fluoresziert somit nur in gebundener Form und verursacht kaum Hintergrundrauschen. Gegenüber der zuvor beschriebenen Oil Red O-Färbung stellt dies einen deutlichen Vorteil dar. Zudem ist der höhere Kontrast von schwarz (Hintergrund) zu grün (LD) für das menschliche Auge besser zu erkennen als hellgelb/weiß (Hintergrund) zu hellrot (LD) wie bei der Oil Red O-Färbung. Mit BODIPY lassen sich daher auch sehr geringe Triacylglycerid-Mengen bzw. sehr kleine LDs nachweisen.

Um darzustellen, wie hoch der Anteil an differenzierten Zellen ist, wurde eine Gegenfärbung mit DAPI durchgeführt. DAPI steht für 4',6-Diamidin-2-phenylindol und ist

ebenfalls ein Fluoreszenzfarbstoff. Das Farbmolekül bindet an die DNA und fluoresziert nach Anregung im blauen Bereich (460 nm) des sichtbaren Lichtspektrums.

Im abgedunkelten Raum wurde die Färbelösung angesetzt, indem die BODIPY 493/503-Stammlösung 1:1000 (Endkonzentration = 10 μM) und DAPI 1:2000 (Endkonzentration = 1 μM) in PBS verdünnt wurden. Die differenzierten und fixierten Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend 5 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Färbelösung wurde abgenommen, die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und, falls nötig, bis zur Dokumentation lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahrt.

3.3.4 Histologischer Nachweis der chondrogenen Differenzierung

In der extrazellulären Matrix von chondrogen differenzierten Zellen sind Glycosaminoglykane eingelagert. Diese gehören zu den sauren sulfatreichen Proteoglykanen und lassen sich z.B. mit Alcianblau oder Safranin O nachweisen.

Da die chondrogene Differenzierung als Pelletkultur durchgeführt wurde, mussten die Pellets vor dem Färben in dünne Scheiben geschnitten werden. Dazu wurden diese zunächst zweimal mit PBS gewaschen, in Einbettmedium eingebettet und auf Trockeneis (ca. -80 °C) gelagert. Die Proben wurden im Kryostat eingespannt und auf ca. -20 °C erwärmt. Es wurden Kryoschnitte mit einer Dicke von 5 - 8 μm angefertigt und auf Adhäsions-Objektträger gezogen.

Alcianblau-Färbung

Alcianblau ist ein Kupferfarbstoff, der mit den Proteoglykanen in der Knorpelmatrix reagiert und entsprechende Bereiche abhängig vom pH-Wert spezifisch blau färbt [117, 118].

Zum Färben wurden 5 mg Alcianblau 8GX pro 1 mL 0,1 M HCl (Salzsäure, pH = 1) gelöst und diese mehrere Stunden bei RT gerührt. Ungelöste Bestandteile wurden durch Filtrieren entfernt und die Lösung in eine Färbeküvette gefüllt. Die Objektträger mit den anhaftenden Schnitten wurden zunächst durch mehrmaliges Tauchen in demineralisiertes Wasser gewaschen. Anschließend wurden sie in die Alcianblau-Lösung getaucht und darin 30 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Proben so lange gewaschen, bis die Proben keine blaue Farbe mehr an das Wasser abgaben.

Safranin O-Färbung

Safranin O ist ein kationischer Farbstoff, dessen Moleküle mit den Carboxyl- und Sulfonsäuregruppen der Glykosaminoglykane reagieren. Die Bereiche, in denen letztere in der Matrix eingelagert sind, werden mit Safranin O rot gefärbt.

Für die Färbung wurde eine 0,1 %ige [w/v] Safranin O-Lösung in demineralisiertem Wasser hergestellt, kurz gerührt und anschließend filtriert. Die Objektträger mit den anhaftenden geschnittenen Pellets wurden zunächst durch mehrmaliges Tauchen in demineralisiertes Wasser gewaschen. Danach wurden sie in die Safranin O-Lösung getaucht und darin 15 min bei RT inkubiert. Abschließend wurden die Proben so lange mit Wasser gewaschen, bis keine Färbung der Waschlösung mehr zu erkennen war.

3.4 Analytische Methoden

3.4.1 FCM und FACS

Bei der Durchflusszytometrie (FCM, engl. *flow cytometry*) handelt es sich um ein quantitatives Messverfahren, bei dem überwiegend Proteine auf der Zelloberfläche bestimmt werden. Daneben lassen sich aber auch intrazelluläre Proteine, Peptide oder DNA detektieren. Die Grundlage dieser Methode bildet eine Antigen-Antikörper-Reaktion. Es werden spezifische Antikörper eingesetzt, die mit unterschiedlichen Fluorochromen markiert sind (Abbildung 3.3 A). Diese binden an das Antigen auf oder auch in der Zelle. Mit dem Durchflusszytometer werden die Zellen anschließend einzeln analysiert. Dieser Vorgang ist schematisch in Abbildung 3.3 B dargestellt.

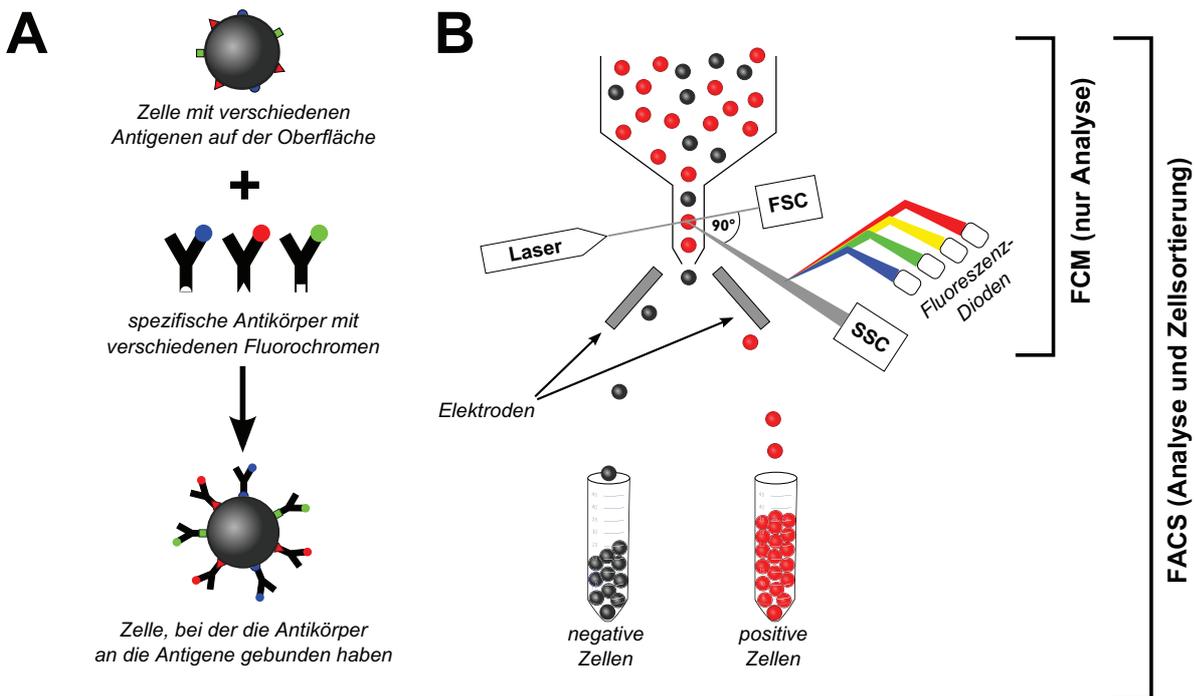


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung durchflusszytometrischer Messungen. Das Prinzip beruht auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion (A). Mit Hilfe durchflusszytometrischer Methoden können lebende Zellen entweder nur analysiert (FCM, B oben) oder auch zusätzlich sortiert werden (FACS, B gesamt). FSC: Vorwärtsstreuung, SSC: Seitwärtsstreuung.

Zunächst werden die Fluorochrome, die über den Antikörper an die Zelle gebunden sind, mit Hilfe eines Lasers bei einer spezifischen Wellenlänge angeregt. Anschließend wird die Streuung des Lichts in Laserrichtung (Vorwärtsstreuung, FSC, engl. *forward scatter*) und im 90°-Winkel dazu (Seitwärtsstreuung, SSC, engl. *side scatter*) detektiert. Diese Werte geben Auskunft über Größe (FSC) und Granularität (SSC) der analysierten Zellen und sind unabhängig von gebundenen oder nicht gebundenen Antikörpern. Die Daten werden meist in einem sogenannten Wolkendiagramm oder Dot Plot gegeneinander aufgetragen (Abbildung 3.4 A). Hierbei stellt jeder Punkt genau eine Zelle dar. Da jeder Zelltyp andere Eigenschaften bezüglich Größe und Granularität besitzt und sich diese bei der beschriebenen Auftragung räumlich voneinander separieren lassen, sind die Messungen der FSC- und SSC-Werte besonders in Mischpopulationen von großer Bedeutung. Ebenso können lebende und tote Zellen unterschieden werden.

Parallel zum SSC werden zusätzlich die Fluorochrom-spezifischen Emissionen analysiert. Im rechten Winkel zum Laserstrahl werden spezifische Wellenlängenbereiche mit Hilfe von Spiegeln und Wellenlängenfiltern detektiert (Abbildung 3.3 B). Alle Lichtsignale werden über mehrere Photomultiplier in elektronische Signale umgewandelt. Je mehr Fluorochrom-markierte Antikörper an einer Zelle gebunden sind, desto größer ist die jeweils gemessene Fluoreszenzintensität (FI). Dabei weist jedes Fluorochrom ein anderes Emissionsmaximum auf. Liegen diese ausreichend separiert voneinander, können Zellen auch auf mehrere Antigene gleichzeitig analysiert werden, sofern für die Antikörper unterschiedliche Fluorochrome gebunden sind. Je nach Laseranzahl und Gerät kann die Anzahl der (parallel) bestimmbarer Fluoreszenzen stark variieren.

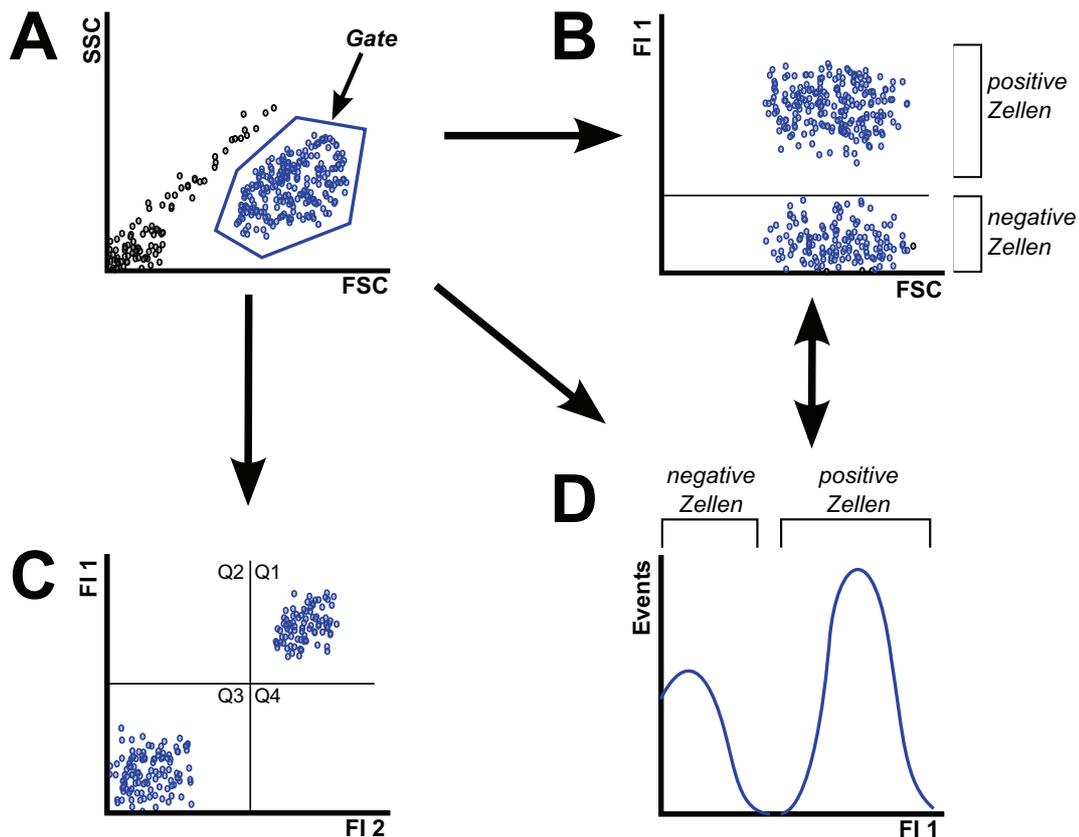


Abbildung 3.4: Mögliche Darstellungsformen durchflusszytometrischer Daten sind das Wolkendiagramm mit einer Auftragung des Seitwärtsstreulichts (A) oder einer Fluoreszenzintensität gegen das Vorwärtsstreulicht (B) sowie mit der Auftragung zweier Fluoreszenzintensitäten zueinander (C). Daneben eignet sich auch die Darstellung als Histogramm (D). In B-D sind nur die gegatete Population aus A dargestellt. FSC: Vorwärtsstreulicht, SSC: Seitwärtsstreulicht, FI: Fluoreszenzintensität.

Für die Datenauswertung finden überwiegend die Auftragung als Wolkendiagramm (Dot Plot) und als Histogramm Anwendung. Ersteres stellt wie bereits beschrieben jede detektierte Zelle als einzelnen Punkt dar. Dabei ist nicht nur die Auftragung von FSC zu SSC interessant (Abbildung 3.4 A). Auch die Auftragung der relativen Fluoreszenzintensität gegen das Vorwärtsstreulicht (Abbildung 3.4 B) oder gegen die Intensität einer zweiten Fluoreszenz (Abbildung 3.4 C) kann hilfreich sein, wenn mehrere Populationen vorliegen. Zusätzlich können durch geschicktes Setzen von sogenannten Gates einzelne Zellpopulationen separat weiter analysiert werden. Bei dem in Abbildung 3.4 A dargestellten Beispiel wird die Zellpopulation mit hohem FSC- aber kleinem SSC-Wert

(große glatte Zellen) markiert (gegatet). Mit der Auftragung einer Fluoreszenzintensität gegen die Zellgröße (FSC) lassen sich negative, schwach positive und stark positive Zellfraktionen bezüglich eines Fluoreszenzfarbstoffes und damit eines spezifischen Antigens darstellen. Werden zwei Fluoreszenzen gegeneinander aufgetragen (Abbildung 3.4 C), lassen sich auch doppelt positive (Q1), doppelt negative (Q3) oder einfach positive Zellen (Q2, Q4) sichtbar. Die jeweiligen prozentualen Anteile können ermittelt werden.

Im Gegensatz zu den verschiedenen Darstellungsarten eines Dot Plots ist in einem Histogramm immer die Zahl der Ereignisse gegen die relative Fluoreszenzintensität eines bestimmten Farbstoffes aufgetragen (Abbildung 3.4 D). Wie bei der Auftragung von FI gegen FSC werden hierbei negative, schwach und stark positive Populationen deutlich. Das Histogramm bietet allerdings den Vorteil, dass einfacher abgelesen werden kann, welche Population anteilig stärker vertreten ist. Oft ist auch eine Abgrenzung zweier Populationen an dem Tal zwischen den beiden Maxima besser erkennbar als in einem Dot Plot.

Wie bei jeder anderen Antikörper-Färbung sollte durch geeignete Kontrollen ein unspezifisches Binden des Antikörpers an die Zelle ausgeschlossen werden. Hierzu dienen die Isotypkontrollen. Dies sind Proben, die mit einem nicht bindenden Antikörper inkubiert werden. Zudem müssen die Kontrollantikörper vergleichbar zu den Testantikörpern hergestellt worden sein und sowohl in den schweren Ketten (inklusive Untergruppen, z.B. IgG und Untergruppe 1) als auch den leichten Ketten (α , κ) übereinstimmen. In der Darstellung der FCM-Ergebnisse als Histogramm werden meist die Emissionen von Testantikörper und zugehöriger Isotypkontrolle überlagert dargestellt. Somit würde ein falsch-positives Ergebnis aufgrund unspezifisch gebundener Antikörper direkt ersicht-lich werden.

Eine besondere Variante der Durchflusszytometrie ist die Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (engl. *fluorescence-activated cell sorting*), oder kurz FACS. Der Begriff FACS ist ursprünglich ein Markenname der Firma Becton Dickinson, mittlerweile ist dieser aber auch als Synonym für die Durchflusszytometrie weit verbreitet. Um beide Techniken voneinander abzugrenzen, wird die durchflusszytometrische Zellanalyse in dieser Arbeit als Durchflusszytometrie bzw. FCM und das Sortieren der Zellen als FACS bezeichnet.

Für die Verwendung von FACS werden lebende Zellen wie bei der FCM mit Fluorochrom-markierten Antikörpern spezifisch gefärbt. Anhand individuell bestimmbarer Parameter, wie z.B. FSC, SSC und verschiedener Fluoreszenzeigenschaften, können die Zellen anschließend sortiert werden. Wie bei der Durchflusszytometrie werden die Fluoreszenzfarbstoffe mit Hilfe eines oder mehrerer Laser angeregt und die Emission detektiert. Im Anschluss an die Analyse wird die Zellsuspension durch Vibration in kleine Tröpfchen zerteilt. Diese Tröpfchen sind so klein, dass sie genau eine Zelle enthalten. Entspricht nun eine detektierte Zelle den festgelegten Bedingungen, wird der Tropfen mit der entsprechende Zelle zunächst polarisiert. Mit Hilfe von Elektroden wird der fallende Tropfen schließlich so abgelenkt, dass er in dem vorgesehenen Sammelgefäß landet (Abbildung 3.3 B). Je nach FACS-Gerät können unterschiedlich viele Fraktionen separiert werden.

3.4.1.1 Kompensation

FCM

Für alle FCM-Analysen wurde der FACSCanto der Firma Becton Dickinson Biosciences verwendet. Dieser ist in der Lage, sechs unabhängige Fluorochrome parallel zu detektieren: APC, FITC, PE, PerCP-Cy5.5, APC-Cy7 und PE-Cy7¹. Die Maxima der jeweiligen Emissionsspektren unterscheiden sich distinkt voneinander. Da allerdings immer ein ganzer Wellenlängenbereich um das jeweilige Maximum detektiert wird, kann es vorkommen, dass sich die Emissionsspektren zweier oder mehrerer Fluoreszenzfarbstoffe stellenweise überschneiden. Dadurch kann es zu falsch positiven Ergebnissen kommen (vergleiche Abbildung 3.5, links Q1). Um dies zu verhindern, muss die spektrale Überlappung mit einer sogenannten Kompensation korrigiert werden. Ein Nachteil der

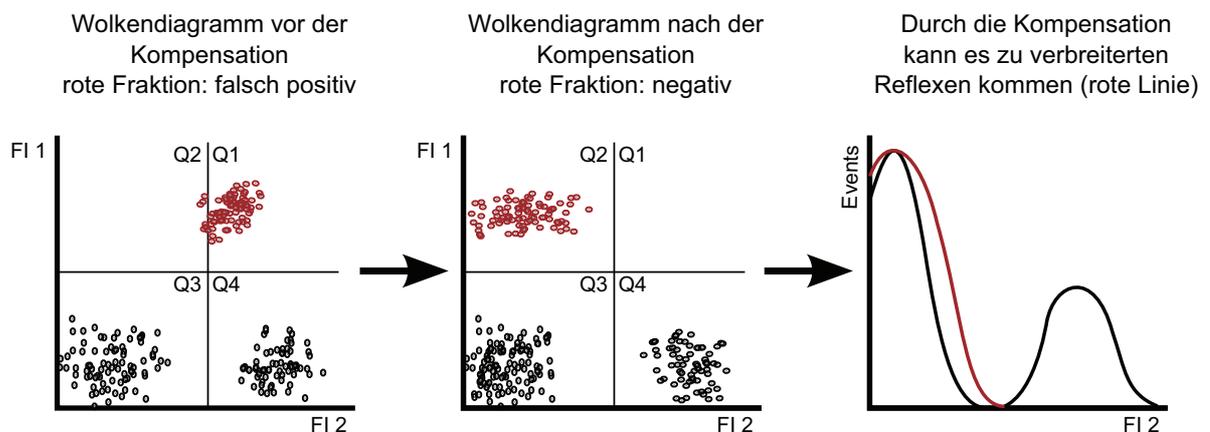


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung der Kompensation, die vor durchflusszytometrischen Messungen durchgeführt werden sollte.

Kompensation einzelner Fluoreszenzkanäle zueinander ist allerdings, dass es zu einer Verbreiterung der Signale kommen kann. In Abbildung 3.5 Mitte ist dies deutlich in Q2 erkennbar. Die Zellen sind bezüglich der Fluoreszenz 2 deutlich breiter gestreut, so dass das Histogramm ebenfalls verbreitert erscheint (vergleiche Abbildung 3.5 rechts). Auch eine leichte Verschiebung zu höheren Fluoreszenzintensitäten ist möglich. Dieser Effekt muss bei der Auswertung der Ergebnisse berücksichtigt werden.

Für die Kompensation wurde das CompBeads Set Anti-Mouse Ig, κ von BD Biosciences verwendet und die Probenvorbereitung nach Herstellerangaben durchgeführt.

FACS

Für die Sortierung der unvollständig differenzierten iPSC nach $CD24^-/CD105^+$ war keine Kompensation nötig. Als Referenz dienten ungefärbte sowie einfach gefärbte Zellen, die für das jeweilige Antigen positiv waren. Für die Positivkontrolle von CD24 wurden iPSC verwendet, die mit dem entsprechenden CD24-Antikörper gefärbt wurden. Als Positivkontrolle von CD105 wurden mit dem CD105-Antikörper gefärbte hBMSC genutzt. Durch geeignetes Gaten der unvollständig differenzierten iPSC/iPS-MS-Cell-Populationen

¹APC: Allophycocyanin; FITC: Fluoreszeinisothiocyanat; PE: Phycoerythrin; PerCP-Cy5.5: Peridinin-Chlorophyll Protein konjugiert mit dem Cyanin-5.5; APC-Cy7: Allophycocyanin konjugiert mit Cyanin-7; PE-Cy7: Phycoerythrin konjugiert mit Cyanin-7

konnte anschließend nach CD24 und CD105 sortiert werden. Die Bedienung der FACS-Geräte und damit die Durchführung des Sortiervorgangs wurde vom Personal der zentralen Forschungseinrichtung „Zellsortierung“ der Medizinischen Hochschule Hannover übernommen. Die eigene Vor- und Nachbereitung der Proben wird im kommenden Abschnitt erläutert.

3.4.1.2 Probenvorbereitung und Durchführung der Messung

Für die durchflusszytometrischen Analysen und die Sortierung mittels FACS wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von 70 - 80 % kultiviert. Eine Ausnahme bildeten die undifferenzierten iPSC, welche bis zu einer Konfluenz von ca. 95 % kultiviert wurden. Für beide Methoden waren Einzelzellsuspensionen nötig. Hierfür wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und anschließend wie zuvor beschrieben mit einer Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst. Hatten sich die Zellen gelöst, wurden sie mit FACS-Puffer (10 % FCS in PBS) abgespült, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei 300 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in 5 - 10 mL FACS-Puffer resuspendiert und nochmals unter den oben genannten Bedingungen zentrifugiert. Wieder wurde der Überstand entfernt. Für FCM wurden 50 µL FACS-Puffer pro 200.000 Zellen zugegeben. Um Zellen zu sortieren, wurde das gesamte Zellpellet in 100 µL Puffer resuspendiert und auf Eis gelagert. Je nach Anzahl der zu untersuchenden Proben wurden die Färbelösungen in 1,5 mL-Reaktionsgefäßen (< 10 Proben und FACS) oder Mikrotiterplatten (> 10 Proben) vorbereitet. Dazu wurden zuerst die für 100 µL (FCM) bzw. 200 µL (FACS) Färbelösung benötigten Volumina der fluoreszenzmarkierten Antikörper oder Isotypkontrollen in das entsprechende Gefäß bzw. Loch pipettiert und mit FACS-Puffer auf 50 µL (FCM) bzw. 100 µL (FACS) aufgefüllt. Anschließend wurden 50 µL (FCM, entspricht 200.000 Zellen) bzw. 100 µL (FACS, alle Zellen) der Zellsuspension zu den vorgelegten Antikörpermischungen gegeben und durch auf und ab pipettieren mit dieser vermischt. Die Zellen wurden 30 Minuten auf Eis und im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 200 - 500 µL FACS-Puffer hinzugegeben, 5 min bei 300 x g und 4 °C zentrifugiert und die Überstände entfernt. Die Zellen wurden in 300 - 500 µL Puffer resuspendiert, erneut zentrifugiert und der Überstand wieder entfernt. Abschließend wurden die Zellen in 250 µL (FCM) bzw. 500 - 1000 µL (FACS) FACS-Puffer aufgenommen und bis zur Messung bei 4 °C und unter Lichtausschluss gelagert.

Die FCM-Analysen wurden am BD FACSCanto Durchflusszytometer durchgeführt und die Daten mit Hilfe der zugehörigen Software BD FACS Diva (BD Biosciences) aufgezeichnet. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte dabei von zwei Lasern (488 und 633 nm). Die Daten wurden mit dem Programm „Flowing Software 2.5“ des *Turku Centre for Biotechnology* ausgewertet.

Für die Sortierung der Zellen wurde die zentrale Forschungseinrichtung „Zellsortierung“ der Medizinischen Hochschule Hannover in Anspruch genommen. Je nach Verfügbarkeit wurde eines der drei folgenden Geräte verwendet:

- MoFlo von Beckman-Coulter
- XDP von Beckman-Coulter
- FACS Aria IIu von Becton Dickinson

Die sortierten Zellen wurden in 15 mL-Zentrifugenröhrchen aufgefangen, in denen 5 mL Medium vorgelegt waren. Nach dem Sortier-Vorgang wurde die Zellsuspension für 5 min bei 300 x g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und in 5 mL PBS resuspendiert. Nach einer erneuten Zentrifugation mit oben genannten Bedingungen wurde der Überstand wieder entfernt und die Zellen in frischem Medium resuspendiert. Um eine Kontamination der Kultur zu vermeiden, wurden dem Medium nach der Sortierung 1 µg Amphotericin B und 50 µg Gentamycin pro mL Medium zugegeben. Anschließend wurden die Zellen in geeigneten gelatinisierten Zellkulturgefäßen ausgesät.

3.4.1.3 Hinweise zur Auswertung der FCM-Daten

Für die Auswertung der FCM-Daten wurde zu Beginn grundsätzlich die FSC-SSC-Auflösung aller Ereignisse (Zellen) betrachtet und die lebenden gewünschten Zellen markiert (Abbildung 3.6 A). Die Darstellung der markierten Zellen erfolgte anschließend abhängig vom Schwerpunkt der Untersuchung und der jeweiligen Fragestellung als Dot Plot (ein und zwei Fluoreszenzen) oder als Histogramm.

Die quantitative Auswertung, wie sie für die Beurteilung undifferenzierter iPSC und den Vergleich von iPS-MSC mit hBMSC wichtig war, wurde überwiegend mit Hilfe der Histogramm-Darstellung durchgeführt. Zum Teil wurden auch Wolkendiagramme mit zwei gegeneinander aufgetragenen Fluoreszenzen zu Rate gezogen. In jedem Histogramm wurde stets die Isotypkontrolle und die Testpopulation überlagert dargestellt. Da für den SSEA-3-Antikörper keine geeignete Isotypkontrolle vorhanden war, wurden in diesem Fall die ungefärbten Zellen als Negativkontrolle verwendet. Das Histogramm der Kontrollen ist grundsätzlich durch eine schwarze Linie dargestellt. Das Histogramm der Testpopulation wurde entsprechend als dunkelgraue Linie und die Fläche darunter hellgrau abgebildet. Durch das Setzen von weiteren Gates wurde der prozentuale Anteil (schwach oder stark) positiver Fraktionen bestimmt. Dieser Bereich ist durch einen blauen Balken gekennzeichnet. Wie oben beschrieben, kann es aufgrund der Kompensation zu verbreiterten oder leicht verschobenen Histogrammen der Testpopulationen gegenüber den Kontrollen kommen. Daher war es zum Teil sehr schwer, zu beurteilen, ob eine Zellpopulation negative oder schwach positiv einzuordnen ist. Zudem konnten positive Zellen in schwach positive und stark positive Populationen unterteilt werden. Die reine Prozentangabe des positiven Anteils gibt darüber keinen Aufschluss. Daher wurden den Werten in Tabellen die Angaben „+“ für schwach positive und „++“ für stark positive Zellen hinzugefügt. Negative Zellen wurden mit „-“ gekennzeichnet. Um die Subjektivität bei der Auswertung möglichst einzugrenzen, wurden Kriterien festgelegt, anhand derer die FCM-Daten ausgewertet wurden. Diese werden im Folgenden näher erläutert und sind in Abbildung 3.6 B - K dargestellt.

- Als **stark positiv** (++) wurden Fraktionen eingestuft, dessen Maximum sich mindestens auf mittlerer Höhe der x-Achse befindet (3.6 B). Außerdem sollten sich die Kurven von Kontrolle und Testpopulation weit unten, also knapp oberhalb der x-Achse, schneiden.
- Histogramme von **schwach positiven** (+) Populationen besaßen ein Maximum, welches in der Hälfte der niedrigeren Fluoreszenzintensitäten lag (3.6). Zudem war der Schnittpunkt von Kontrolle und Testpopulation deutlich oberhalb der x-Achse.

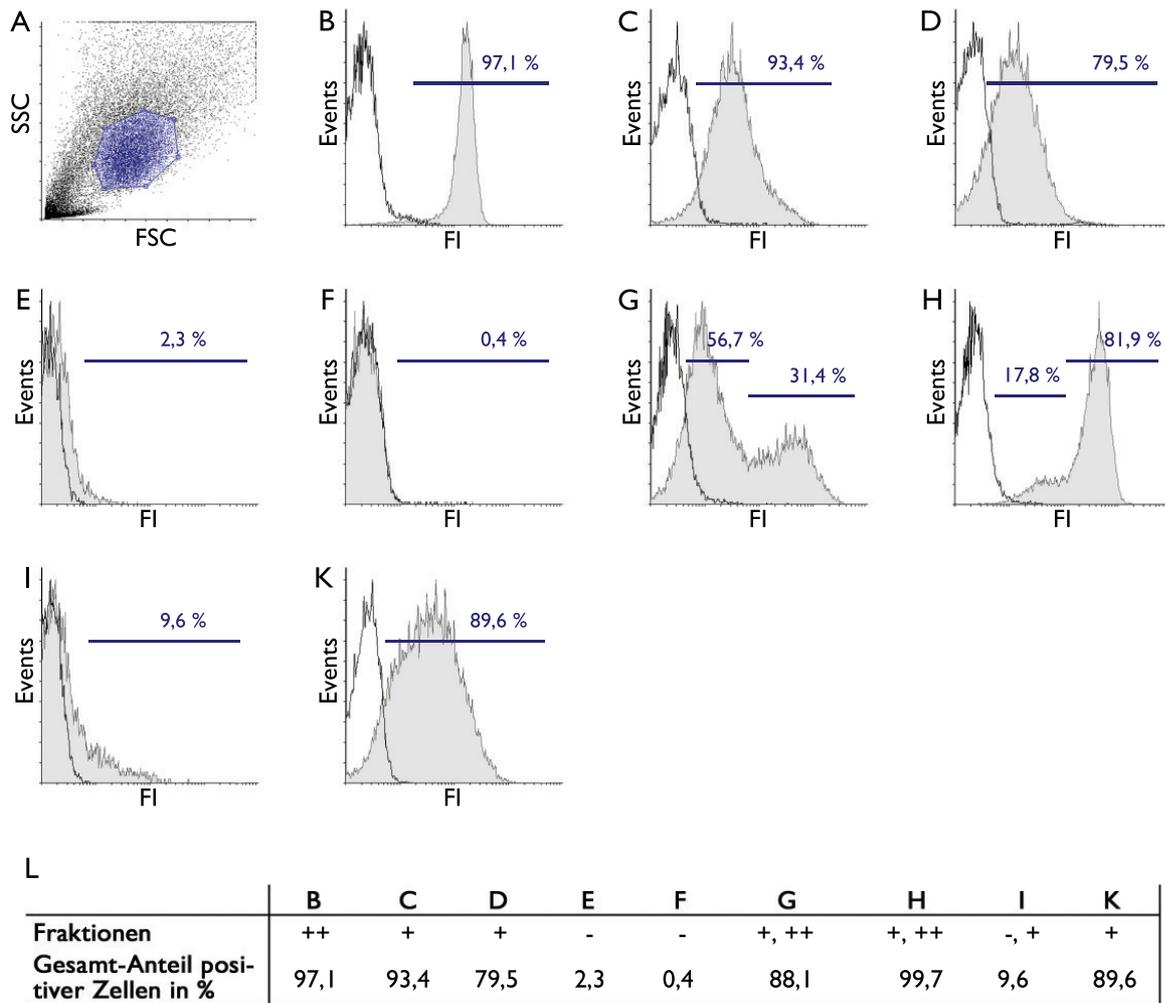


Abbildung 3.6: Beispiele zur Auswertung von durchflusszytometrischen Daten. Dargestellt ist ein Dot Plot-Wolkendiagramm, in dem die zu analysierende Fraktion blau markiert ist (A). Exemplarische Histogramme verdeutlichen die Auswertung von FCM-Daten (B-K). Abschließend werden die vorhandenen Fraktionen sowie der jeweilige Gesamtanteil positiver Zellen als Tabelle dargestellt (L).

- Histogramme, wie in Abbildung 3.6 D dargestellt, wurden ebenfalls als schwach positiv angesehen. Allerdings kann die Isotypkontrolle nicht mehr außer Acht gelassen werden, da diese den Bereich nicht spezifisch gefärbter Zellen aufzeigt. Daher wurde das Gate zur Bestimmung der positiven Fraktion maximal in der Mitte des abfallenden Teilstücks der Kontrollkurve begrenzt. Im vorliegenden Beispiel macht die Fraktion nur 79,5 % aus, obwohl die Testpopulation insgesamt als schwach positiv eingestuft werden könnte. Aus diesem Grund ist die zusätzliche Bewertung der Fraktionen mit „-“, „+“ und „++“ von besonderer Bedeutung und in zugehörigen Tabellen ebenfalls aufgeführt (vergleiche Abbildung 3.6 L).
- Die Histogramme E und F zeigen **negative Populationen (-)**. In E ist die Kurve der Testpopulation im Vergleich zur Isotypkontrolle ein wenig nach rechts verschoben, was vermutlich auf die Kompensation zurückzuführen ist. In Darstellung F verlaufen die Histogramme von Test- und Kontrollpopulation parallel. Somit handelt es sich definitiv um negative Zellen.

- Daneben kam es vereinzelt zu **zwei Fraktionen** innerhalb einer Testpopulation. Exemplarisch dargestellt sind Histogramme mit einer stark und einer schwach positiven (Abbildung 3.6 G und H), einer negativen und einer positiven (I) sowie zwei schwach positiven Fraktionen (K) innerhalb einer Population. Das Histogramm G weist ein Tal zwischen den Maxima beider Fraktionen auf, somit ist eine separate Anteilsbestimmung vergleichsweise einfach und nur mit einem kleinen Fehler behaftet. Der tiefste Punkt des Tals stellt die Grenze dar. Im Falle von H und I ist die Abgrenzung nicht so einfach. Die Kurven weisen eine sogenannte Schulter auf, welche durch Überlagerung zweier oder mehrerer Fraktionen entsteht. Da die eine Fraktion sehr groß und die andere vergleichbar klein ist, wurde der Verlauf der großen Fraktion extrapoliert und entsprechend die Grenze gezogen. Hierbei ist der Fehler allerdings größer als im vorherigen Fall. Für die quantitative tabellarische Auswertung wurde ein Gesamtwert aller positiver Zellen angegeben, zusätzlich aber, wie oben bereits erläutert, mit Hilfe der Angaben „-“, „+“ und „++“ aufgezeigt, wie viele Populationen vorlagen. In Histogrammen mit ähnlichem Verlauf wie in Abbildung 3.6 K, lassen sich zwar zwei etwa gleich große schwach positive Populationen vermuten, eine Abgrenzung und separate Anteilsbestimmung ist jedoch nicht möglich, da sich beide Fraktionen zu stark überlagern. Da kein eindeutiger Beweis für zwei Fraktionen erbracht werden kann, ist nur eine Fraktion angegeben.

3.4.2 Isolierung der Gesamt-RNA aus Zellkulturproben

Die Isolierung der Gesamt-RNA basiert auf einer Ein-Schritt-Methode, die von Chomczynski und Sacchi entwickelt wurde [119]. Das dazu verwendete TRIzol[®] Reagent enthält unter anderem Phenol und Guanidinthiocyanat. In einem Schritt werden verschiedene kleine und große RNA-Spezies (sowie DNA und Proteine) aus Gewebematerial isoliert. Durch gleichzeitige Inhibierung der RNase bleibt die RNA erhalten.

Für die Isolierung wurde das Medium über den Zellen abgenommen und diese einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde 1 mL TRIzol[®] Reagent in eine T25-Flasche bzw. 500 µL pro Loch einer 6-Loch-Platte gegeben und die Zellen durch auf und ab pipettieren gelöst und homogenisiert. Die Proben wurden in 1,5 mL-Reaktionsgefäße überführt und bis zur weiteren Aufreinigung bei -80 °C gelagert.

Für die Aufreinigung wurden die Proben auf Raumtemperatur erwärmt, 100 µL 1-Brom-3-chlorpropan zugegeben und kurz über Kopf gemischt. Nach 5 min Inkubationszeit wurden sie für 15 min bei 4 °C und 20.000 x g zentrifugiert. Die obere wässrige Phase (enthält RNA) wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. War die Phasentrennung nicht vollständig, erkennbar an einer leicht rosa gefärbten wässrigen Phase, wurde die jeweilige Probe nochmals gemischt und erneut zentrifugiert. Zu der isolierten wässrigen Phase wurden anschließend ca. 500 µL *iso*-Propanol (0,7 bis 1-fache Menge) zugegeben, die Probe kurz über Kopf gemischt und 30 min bei 4 °C und 20.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen, das RNA-Pellet mit 500 µL -20 °C kaltem 70 %igem [v/v] Ethanol gewaschen und nachmals 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgenommen und verworfen und der gesamte Waschschrift noch einmal wiederholt. Das Pellet wurde im Anschluss kurz bei 37 °C getrocknet, in 20 µL demineralisiertem Wasser gelöst und für 10 min bei 60 °C denaturiert.

Die Bestimmung der RNA-Konzentration c erfolgte über die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD_{260}). Die RNA wurde 1:100 mit demineralisiertem Wasser verdünnt und in einer Quarzküvette photometrisch analysiert. Mit dem OD_{260} -Wert wurde dann über folgende Formel die RNA-Konzentration bestimmt [120]:

$$c \left[\frac{\mu g}{mL} \right] = OD_{260} \cdot V \cdot F$$

Dabei steht V für den Verdünnungsfaktor und F für den Multiplikationsfaktor. Im vorliegenden Fall war $V = 100$ und $F = 37$, so dass sich

$$c \left[\frac{\mu g}{mL} \right] = OD_{260} \cdot 3700$$

ergab.

Zusätzlich wurde die optische Dichte bei 280 nm (OD_{280}) und damit das Verhältnis von OD_{260} zu OD_{280} bestimmt. Dieses Verhältnis dient der Überprüfung, ob eine Proteinkontamination der RNA-Lösung vorliegt. Idealerweise sollte der Wert zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Proben mit einem OD_{260}/OD_{280} -Verhältnis unter 1,5 wurden noch einmal aufgereinigt.

3.4.3 DNase-Verdau und cDNA-Synthese

Für den DNase-Verdau wurde je RNA-Probe folgender Ansatz in ein PCR-Gefäß pipettiert:

1 μg RNA
1 μL 10x Reaktionspuffer mit $MgCl_2$
1 μL DNase I (1 U/ μL)

Dieser Ansatz wurde mit nuklease-freiem demineralisiertem Wasser auf 10 μL aufgefüllt, kurz zentrifugiert und 30 min bei 37 °C im Thermocycler inkubiert. Anschließend wurden je 1 μL 50 mM EDTA und 1 μL random-Primer (0,2 $\mu g/\mu L$) zugegeben, die Flüssigkeit kurz zentrifugiert und die Probe für 10 min bei 65 °C im Thermocycler inkubiert. Die verwendeten random-Primer sind eine Mischung aus allen möglichen Basenabfolgen mit sechs oder sieben Nukleotiden. Dadurch entstehen zufällige cDNA-Produkte unterschiedlicher Länge.

Für die cDNA-Synthese wurde anschließend ein Mastermix hergestellt, wobei pro Probe folgende Volumina zusammen pipettiert wurden:

4 μL 5x Reaction Buffer
0,5 μL RiboLockTM RNase Inhibitor (20 U/ μL)
2 μL dNTP Mix (10 mM)
1 μL RevertAidTM m-MuLV Reverse Transcriptase (200 U/ μL)
0,5 μL nuklease-freies Wasser

Anschließend wurden 8 μL des Mastermixes zu jeder Probe pipettiert, diese kurz zentrifugiert und im Thermocycler nach folgendem Schema inkubiert:

- 1.) 25 °C 10 min
- 2.) 42 °C 60 min
- 3.) 70 °C 10 min
- 4.) 15 °C ∞

Abschließend wurde jede Probe mit 20 µL TE-Puffer verdünnt und bei -20 °C gelagert.

3.4.4 Polymerasekettenreaktion

Mit der Polymerasekettenreaktion (PCR) können spezifisch DNA-Sequenzen vervielfältigt werden. Die Templat-DNA wird mit zwei Oligonukleotiden (Vorwärts- und Rückwärts-Primer) in einer Pufferlösung vorgelegt. Die Reaktion gliedert sich anschließend in drei Schritte: Denaturierung, Annealing und Elongation. Im ersten Schritt, der Denaturierung, werden die Einzelstränge der DNA bei 94 °C voneinander getrennt. Anschließend wird die Lösung bis zur sogenannten Annealingtemperatur abgekühlt. Dabei hybridisieren die Primer mit den DNA-Strängen. Im letzten Schritt, der Elongation, wird die DNA ausgehend vom jeweiligen Primer in 3' → 5'-Richtung mit Hilfe der thermostabilen Taq-Polymerase amplifiziert. Denaturierung, Annealing und Elongation zusammen stellen einen PCR-Zyklus dar. Unter idealen Bedingungen wird die Menge der Template-DNA verdoppelt, so dass diese exponentiell zunimmt. In späteren Zyklen liegt bereits so viel Produkt vor, dass es sich selbst hemmt (Produkthemmung). Der Vermehrungsfaktor der DNA nimmt somit ab (< 2), bis am Ende die Produkthemmung so groß ist, dass keine Vermehrung mehr möglich ist. Normalerweise besteht eine PCR aus 20 bis 30 Zyklen, da in diesem Rahmen meist noch ein exponentielles Wachstum vorherrscht. So lässt sich die DNA mehr als 10^9 -fach vervielfältigen. Abschließend wird meist eine längere Elongation durchgeführt, um sicherzustellen, dass die gesamte Amplifizierung abgeschlossen ist. Beruhend auf diesem grundlegenden Prinzip sind in den letzten Jahren verschiedene PCR-Anwendungen entwickelt worden. Nachfolgend werden die beiden angewandten PCR-Methoden näher erläutert.

Semiquantitative RT-PCR

Bei der Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) wird unter anderem aus RNA synthetisierte cDNA als Templat verwendet. Diese Methode dient häufig dem Nachweis der Transkription eines Gens in Zellen und Geweben. Obwohl bei der cDNA-Synthese immer die gleiche Menge RNA (1 µg) eingesetzt wird, kann die Effizienz der Synthese sehr unterschiedlich ausfallen. Daher enthalten die umgeschriebenen Proben nicht gleich viel cDNA und die PCR-Ergebnisse können nicht direkt miteinander verglichen werden. Mit Hilfe eines HPRT-Abgleichs, welcher eine PCR zur Vervielfältigung des HPRT-Gens darstellt, werden die einzelnen Proben bzgl. ihrer enthaltenen DNA-Mengen aufeinander abgestimmt. HPRT steht für Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase und ist ein sogenanntes „*Housekeeping Gene*“ oder „Haushaltsgen“. Bei diesen Genen wird angenommen, dass sie in den untersuchten Zellen konstant exprimiert werden. Daher dienen sie auch als externer Standard. Die für die PCR eingesetzten cDNA-Mengen der verschiedenen Proben werden so aufeinander abgestimmt, dass die Banden des Haushaltsgens aller Proben im Agarose-Gel etwa gleich stark zu sehen sind (vgl. Abschnitt 3.4.5). Damit wird sichergestellt, dass von allen

Proben etwa gleich viel cDNA eingesetzt wurde. Mit den passenden Volumina werden anschließend die Untersuchungen der Markergene durchgeführt. Durch den externen Standard wird diese Methode auch als semi-quantitative RT-PCR bezeichnet.

Für den HPRT-Abgleich wurde die zuvor synthetisierte cDNA 1:100 und für die Analyse der Markergene 1:10 verdünnt. Folgende Volumina wurden pro Probe in ein PCR-Gefäß pipettiert:

12,5 - x μL	demineralisiertes Wasser
4 μL	5x Puffer
2 μL	MgCl_2 (25 mM)
0,4 μL	dNTPs (10 mM)
1 μL	Mix aus Vorwärts- und Rückwärtsprimer (je 5 μM)
0,1 μL	Taq-Polymerase (5 U/ μL)
x μL	cDNA

Gegebenenfalls wurde ein Mastermix aus den ersten sechs Lösungen hergestellt und die cDNA anschließend hinzugefügt. Je nach Länge des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes wurden die Zeiten der Denaturierungs-, Annealing- und Elongationsschritte angepasst. Folgende PCR-Programme wurden verwendet (Thermocycler):

		$\leq 500 \text{ bp}$	$> 500 \text{ bp}$	
1.)	94 °C	1:30 min	1:30 min	
2.) Denaturierung	94 °C	0:20 min	0:30 min	} 20 - 30 Zyklen
3.) Annealing	T_M	0:20 min	0:30 min	
4.) Elongation	72 °C	0:30 min	1:00 min	
5.)	72 °C	15:00 min	15:00 min	
6.)	15 °C	∞	∞	

Für die Berechnung der (theoretisch) optimalen Annealingtemperatur T_M wurden zunächst die Annealingtemperaturen der Vorwärts- ($T_M(F)$) und Rückwärts-Primer ($T_M(R)$) ermittelt und daraus schließlich der Mittelwert gebildet:

$$T_M(R, F) = 34 \cdot \frac{G + C}{A + G + C + T} + 67,5 - \frac{395}{A + G + C + T} - 10$$

$$T_M = \frac{T_M(F) + T_M(R)}{2}$$

Dabei stehen A, C, G und T für die Anzahl der jeweiligen Basen Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G) und Thymin (T) in der jeweiligen Primer-Primer. Die tatsächlich angewandten Annealingtemperaturen konnten geringfügig von den berechneten Werten abweichen.

Quantitative Real-Time PCR

Die quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) ist eine fluoreszenzbasierte PCR-Methode. Die hierfür eingesetzten TaqMan-Reagenzien enthalten neben

den Primern eine Sonde, an die ein Fluorochrom und ein Quencher gebunden sind. Solange beide Moleküle an die Sonde gebunden sind, wird bei einer Anregung die Energie vom Fluorochrom auf den Quencher übertragen, ohne dass eine Emission erfolgt (*Fluorescence resonance energy transfer*). Die Sonde bindet neben dem zu amplifizierenden Genabschnitt an die Templat-DNA und wird während der Amplifikation zerstört, so dass das Fluorochrom freigesetzt wird. Wird dieses nun angeregt, erfolgt auch eine messbare Emission. Bei jeder Amplifikation wird genau ein Fluorochrom freigesetzt, so dass die Fluoreszenzintensität proportional zu der Menge an amplifizierter DNA ist. Die Fluoreszenz wird nach jedem Zyklus bestimmt und kann so in Echtzeit (Real-Time) während der gesamten PCR verfolgt werden.

Für die Auswertung der Daten wird anschließend ein sogenannter C_T - (engl. *cycle threshold*) bzw. Schwellenwert ermittelt. Dieser gibt die Anzahl an Zyklen an, die notwendig waren, um ein definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen. Letzteres wird so gewählt, dass es für alle Proben und Gene, die untersucht und miteinander verglichen werden, innerhalb der exponentiellen PCR-Phase liegt. Nur in diesem Bereich ist eine Quantifizierung möglich.

Da normalerweise nicht in jeder Probe exakt gleich viel Ausgangsmaterial vorliegt, werden die Messwerte auf eine Referenzgen normiert (vergleichbar mit HPRT bei der semiquantitativen PCR). Daraus resultiert die relative Genexpression ΔC_T . Bei dem Referenzgen handelt es sich meist um ein Haushaltsgen, bei dem eine unabhängige und homogene Expression angenommen wird. Die Berechnung der relativen Expression wurde anhand der detektierten C_T -Werte folgendermaßen durchgeführt [121, 122]:

$$\Delta C_T = \frac{E^{-C_T(\text{Zielgen})}}{E^{-C_T(\text{Referenzgen})}}$$

Hierbei ist E die Effizienz der PCR. Im Rahmen dieser Arbeit wurde als Referenzgen die ribosomale RNA 18S verwendet. Zudem wurde bei allen Genen und verwendeten TaqMan-Assays von einer 100 %igen Effizienz ausgegangen. Somit verdoppelt sich pro Zyklus die vorliegende mRNA-Menge ($E = 2$) und es ergibt sich

$$\begin{aligned} \Delta C_T &= \frac{2^{-C_T(\text{Zielgen})}}{2^{-C_T(18S)}} \\ &= 2^{-(C_T(\text{Zielgen}) - C_T(18S))} \end{aligned}$$

Sollte das Verhältnis ($\Delta\Delta C_T$) zweier Proben zueinander bestimmt werden (bei gleichem Zielgen), so erfolgte dies stets nach folgender Formel:

$$\Delta\Delta C_T = \frac{\Delta C_T(\text{Probe1})}{\Delta C_T(\text{Probe2})}$$

Für die Durchführung der qRT-PCR wurde zunächst ein Master-Mix aus Wasser, „Fast Advanced Master Mix“ (FAMM) und den jeweiligen Primern hergestellt. Pro Probe wurden folgende Volumina verwendet:

3,5 μL	demineralisiertes Wasser
5 μL	FAMM
0,5 μL	Primer

Von diesem Master-Mix wurden jeweils 9 μL pro Loch der Reaktionsplatte (MicroAmpTM Fast Optical 96-Well Reaction Plate) vorgelegt und 1 μL cDNA zugegeben. Von jeder Probe-Primer-Kombination wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Um eine Verunreinigung des Mastermixes auszuschließen wurde je Primer eine Leerprobe bestimmt, wobei dem Master-Mix keine cDNA zugefügt wurde. Abschließend wurde die Platte mit einem optischen Klebefilm überzogen, kurz zentrifugiert und in den Heizblock des qRT-Geräts eingelegt. Nach einem initialen Denaturierungsschritt wurden insgesamt 40 Zyklen nach folgendem Schema durchlaufen:

1.)	95 °C	0:20 min	} 40 Zyklen
2.)	95 °C	0:01 min	
3.)	60 °C	0:20 min	

Das Gerät erfasste nach jedem Extensionsschritt die Daten.

Zur Auswertung wurde der Schwellenwert des Fluoreszenzniveaus auf 0,2 festgesetzt und die resultierenden C_T -Daten als Excel-Datei exportiert. Die Berechnungen von ΔC_T und $\Delta\Delta C_T$ wurden wie oben angegeben durchgeführt.

3.4.5 Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese werden amplifizierte PCR-Produkte z.B. im Anschluss an eine semiquantitative PCR analysiert. Mit dieser Methode kann visualisiert werden, ob und wie viel Produkt (im Vergleich zu anderen Proben) in einer Probe vorliegt. Zudem können Mischungen verschieden großer Nukleinsäureketten aufgetrennt bzw. aufgereinigt werden. Da DNA ist in gelöster Form negativ geladen, „wandert“ die DNA bei Anlegen einer Spannung Richtung Plus-Pol. Dabei wirkt das Agarosegel als eine Art Molekularsieb. Kleine DNA-Fragmente bewegen sich schneller durch das Gel als große. Unter Zuhilfenahme von standardisierten DNA-Markern, sogenannten Leitern, kann die Kettenlänge der aufgetrennten Fragmente abgeschätzt werden.

Zum Ansetzen eines 1 %igen Agarosegels wurden 1,2 g Agarose mit 120 mL TAE-Puffer in der Mikrowelle erhitzt bis alles gelöst war. Für ein 2 %iges Gel wurden entsprechend 2,4 g Agarose verwendet. Die etwas abgekühlte Lösung wurde anschließend mit 1,2 μL Ethidiumbromid oder 4,8 μL SERVA DNA Stain Clear G versetzt. Durch vorsichtiges Schwenken wurde das Fluorophor in der Lösung verteilt, diese in eine Gelkammer gegossen, eventuelle Luftblasen entfernt und die Gelkämme eingesetzt. Das Gel kühlte bei Raumtemperatur ab und härtete dabei aus. Vor der Elektrophorese wurde die Gelkammer mit TAE-Puffer gefüllt, die Kämme entfernt und die PCR-Produkte sowie eine geeignete DNA-Leiter vorsichtig in die entstandenen Taschen pipettiert. Es wurde eine Spannung von 150 V angelegt. Die Leistung wurde auf 300 W, die Stromstärke auf 2 A begrenzt. Nach etwa 35 - 45 Minuten wurden die DNA-Banden im ultravioletten Licht sichtbar gemacht. Das Ergebnis wurde an der Geldokumentationsstation von Intas fotografiert.

3.4.6 Microarrays

Der Einsatz von Microarrays bietet die Möglichkeit einer genomweiten Analyse der Genexpression. Dazu wurde die gewonnene mRNA an Mitarbeiter der Facility-Einheit Genomanalyse der Medizinischen Hochschule Hannover übergeben. Die Microarray-Analysen wurden mit Dual-Color-Chips der Firma Agilent (Human GE 4x44k V2 Microarray) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden anschließend in Form von Excel-Dateien erhalten. Für einige Gene befanden sich auf den Chips mehrere Sonden, wodurch auch mehrere Werte erhalten wurden. In diesen Fällen wurde der Mittelwert bestimmt und dieser für die weitere Auswertung verwendet.

3.4.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Wie die Agarose-Gelelektrophorese (Abschnitt 3.4.5) dient die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, oder kurz SDS-PAGE, der Auftrennung verschieden großer Fragmente. Hierbei werden allerdings Proteine und keine Nukleinsäuren aufgereinigt. Dazu werden Proben mit dem anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) und einem reduzierenden Reagenz (z.B. 2-Mercaptoethanol) denaturiert. Das SDS bindet an die Proteine, wobei die Menge an gebundenem Molekül abhängig von der Anzahl an vorhandenen Peptidbindungen ist. Zudem trägt jedes SDS-Molekül eine Ladung von -1, wodurch sich eine hohe Ladungsdichte auf der Proteinoberfläche ergibt. Diese überdeckt die Eigenladung der funktionalen Aminosäuregruppen der Proteine. Auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen werden die Proteine nach ihrer Ladung aufgetrennt werden, indem eine elektrische Spannung angelegt wird. Große und damit stärker geladene Protein-SDS-Komplexe wandern schneller durch das Gel als kleinere und damit schwächer geladene Moleküle. Da das Ladung-Masse-Verhältnis bei allen Proteinen etwa gleich groß ist, kann unter Verwendung von Standards die ungefähre Molmasse von isolierten oder *in vitro* hergestellten Proteinen ermittelt und überprüft werden.

Für diese Arbeit sollten Proteine analysiert werden, die in humanen Zellen vorkommen. Um diese zu isolieren, wurden die kultivierten Zellen wie in Abschnitt 3.2 beschrieben mit Trypsin/EDTA abgelöst, in einem Zentrifugenröhrchen gesammelt und 5 min bei 1.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Röhrchen mit dem verbliebenen Zellpellet direkt auf Trockeneis gestellt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Zur Analyse der Proben wurden diese aufgetaut und eventuelle Restflüssigkeit über dem Zellpellet abgenommen. Das Pellet wurde in 35 µL CoIP-Puffer resuspendiert und 10 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Anschließend wurden 30 µL des Überstands in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß pipettiert und mit 10 µL 4x SDS-Probenpuffer, welchem 2 % [v/v] 2-Mercaptoethanol zugesetzt worden war, vermischt. Um die sekundären und tertiären Proteinstrukturen aufzuspalten, wurden die Proben für 5 min auf 95 °C erhitzt und anschließend bei RT abgekühlt.

Für die Elektrophorese wurde ein diskontinuierliches Gel, bestehend aus Sammel- und Trenngel, verwendet. Diese wurden folgendermaßen angesetzt:

	Trenngel	Sammelgel
demineralisiertes Wasser	3,6 mL	2,4 mL
Lower Gel Buffer	1,8 mL	-
Upper Gel Buffer	-	1,15 mL
AA-Bisacrylamid	1,8 mL	404 μ L
TEMED	5,9 μ L	5,8 μ L
APS	8,7 μ L REV	9,3 μ L

Für das Gel wurden die begrenzenden Glasplatten und eine U-förmige Dichtung zusammen gebaut und vertikal aufgestellt. Zunächst wurde das Trenngel bis ca. 1 cm unterhalb des inneren Randes eingefüllt und vorsichtig mit Wasser überschichtet. Nachdem das Gel ausgehärtet war, wurde das Wasser abgegossen, das Sammelgel angemischt und dieses bis zum inneren Rand auf das Trenngel gegeben. Der Kamm für die Probenaschen wurde vorsichtig darauf gesteckt und das Gel aushärten gelassen. War dies geschehen, wurde der Kamm entfernt und je Probe 7 μ L in eine Tasche pipettiert. Ein geeigneter Molekulargewichtsstandard wurde ebenfalls in eine benachbarte Tasche gefüllt. Die Gelkammer wurde mit 0,1 %igem TTBS gefüllt und zunächst eine Spannung von 75 V angelegt. Nach etwa 10 Minuten, wenn die Proben das Sammelgel durchwandert hatten, wurde die Spannung auf 175 V erhöht, bis das Gel annähernd vollständig durchlaufen war.

3.4.8 Western Blot

Der Western Blot dient der Übertragung von Proteinen aus einem Agarose- oder Polyacrylamid-Gel auf eine Trägermembran und deren anschließenden Nachweis. In der vorliegenden Arbeit wurde die Übertragung mittels Elektrophorese im sogenannten Semidry-Verfahren durchgeführt. Dazu wurde eine Polyvinylidenfluorid-Membran auf die Größe des durchlaufenen Trenngels der SDS-PAGE zugeschnitten, für 15 Sekunden in Methanol und anschließend 1 Minute in vollentsalztem Wasser (VE-Wasser) gelegt. Zudem wurden mehrere Whatman-Papiere in Blotpuffer eingeweicht. Auf der unteren Plattenelektrode der Semidry-Apparatur wurde die Hälfte der Whatman-Papiere übereinander liegend vorbereitet. Darauf wurde die Membran, das Gel und abschließend die zweite Hälfte Whatman-Papiere gelegt. Luftblasen wurden herausgedrückt, die obere Plattenelektrode aufgesetzt und eine Spannung von 3 V angelegt.

Nach etwa einer Stunde waren die Proteine auf die Membran übergegangen, welche anschließend mit TTBS gewaschen wurde. In kommerziell erhältlicher fettarmer Milch wurden die Proteine 30 min unter Schwenken blockiert. Über Nacht wurde der primäre Antikörper in Milch und bei 4 °C schüttelnd inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Membran dreimal mit TTBS gewaschen und mit dem sekundären Antikörper, welcher gegen den primären Antikörper gerichtet ist, in Milch bei RT schüttelnd inkubiert. An den sekundären Antikörper ist die Meerrettichperoxidase gebunden, welche bei Kontakt mit Luminol eine Chemolumineszenz-Reaktion hervorruft. Um diese zu erzeugen, wurde die Membran mit ECL-Lösung, welche Luminol enthielt, nach Herstellerangaben 5 Minuten im Dunkeln inkubiert. Unter Lichtausschluss wurde anschließend ein Film lokal unterschiedlich lange belichtet und abschließend entwickelt. Die Stellen, an denen der sekundäre über den primären Antikörper an das zu untersuchende Protein gebunden

hatte, erschienen aufgrund der Chemolumineszenz schließlich schwarz.

3.5 Klonierung von humanem CD105

Für die Überexpression von CD105 in iPSC sollte die entsprechende DNA-Sequenz kloniert werden. Als Template diente cDNA, die aus RNA von hBMSC synthetisiert wurde. Die amplifizierte DNA wurde mit einer Bam HI- und einer Sal I-Schnittstelle sowie einem HA-Tag am C-Terminus versehen und in einen pLox/GFP-Vektor (Plasmid) kloniert, welcher mit den Restriktionsenzymen Bam HI und Sal I verdaut wurde. Näheres zu den Durchführungen der einzelnen Schritte wird in den nächsten Abschnitten erläutert.

3.5.1 Amplifikation der DNA

Zu Beginn wurde die cDNA amplifiziert. Die nötigen Primer wurden von Sigma Aldrich bezogen und nach Anleitung gelöst. Der Vorwärts-Primer enthielt eine Bam HI-Schnittstelle, der Rückwärtsprimer eine Sal I-Schnittstelle (siehe Großbuchstaben in Tabelle 3.5). Die Sequenz des HA-Tags ist hellgrau hinterlegt.

Tabelle 3.5: Primer-Sequenzen für die Amplifizierung von humanem CD105. Die Schnittstellen sind mit Großbuchstaben hervorgehoben.

Primer	Primer-Sequenz (5' → 3')
Vorwärts-Primer	atat GGATCC gccaccatggaccgcggcacgctccctctg
Rückwärts-Primer	atat GTCGAC ctactaa agcgtaatctggaacatcgatgggta tgccatgctgctggtggagcaggg

Die DNA wurde mittels PCR amplifiziert. Dafür wurde folgender Ansatz in ein PCR-Gefäß pipettiert und das nebenstehende PCR-Programm verwendet:

33,5 µL demineralisiertes Wasser	1.) 92 °C 2:00 min	} 35 Zyklen
5 µL DMSO	2.) 92 °C 0:30 min	
5 µL 10x-Puffer	3.) 60 °C 0:30 min	
1 µL dNTPs (10 mM)	4.) 72 °C 2:00 min	
3 µL Primer-Mix (je 5 µM)	5.) 72 °C 15:00 min	
2 µL Template-cDNA	6.) 15 °C ∞	
0,5 µL Herculase		

Die amplifizierte DNA wurde anschließend mit 5,5 µL 10x Orange G Probenpuffer versetzt und auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen. Wie in Abschnitt 3.4.5 beschrieben, wurde zum Abschätzen der Sequenz-Länge ein geeigneter DNA-Marker verwendet und die DNA bei einer Spannung von 120 V aufgetrennt. Der Bereich im Gel, in dem das gewünschte Produkt enthalten war, wurde mit einem sauberen Skalpell heraus geschnitten und in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde anschließend mittels

GeneJet Gel Extraction Kit von Fermentas nach Herstelleranweisung aufgereinigt und in 20 μL Puffer eluiert.

3.5.2 Restriktionsverdau und Phenolextraktion

Bei dem Restriktionsverdau werden DNA und Plasmid separat mit Hilfe von Restriktionsenzymen geschnitten und anschließend miteinander ligiert.

Der Verdau der zuvor amplifizierten CD105-Sequenz wurde mit den Enzymen Bam HI und Sal I durchgeführt. Für die DNA und den Vektor wurden folgende Ansätze in 1,5 mL Reaktionsgefäße pipettiert:

	DNA	Vektor
demineralisiertes Wasser	3,5 μL	22,5-x μL
amplifizierte DNA	19 μL	-
Vektor (20 μg)	-	x μL
NEBuffer 3	3 μL	3 μL
BSA (2 mg/mL)	1,5 μL	1,5 μL
Bam HI	1,5 μL	1,5 μL
Sal I	1,5 μL	1,5 μL

Die Ansätze wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurde der verdaute Vektor zusätzlich mit shrimp alkaline phosphatase (SAP) verdaut. Dieser dient der Dephosphorylierung, wodurch ein Religieren des geschnittenen Vektors unterbunden wird. Dafür wurden 2 μL SAP in das Reaktionsgefäß mit dem Vektor pipettiert und diese Mischung weitere 30 min bei 37 °C inkubiert.

Mit der anschließenden Phenolextraktion wurden die verdauten Produkte aufgereinigt und die Restriktionsenzyme entfernt. Es wurden jeweils 70 μL TE-Puffer zu DNA und Vektor pipettiert, die Mischung wurde 15 Sekunden moderat gevortext und 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die obere wässrige Phase, welche das geschnittene Produkt enthielt, wurde abgenommen und jeweils in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß gegeben. Zu der verbliebenen Verdau-Lösung wurden erneut 100 μL TE-Puffer gegeben, dieses wieder 15 Sekunden gevortext und 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die obere Phase wurde wieder abgenommen und zu der vorher gesammelten Lösung gegeben. Die vereinten wässrigen Phasen wurden mit 20 μL 3 M Natriumacetat (pH = 5,7) und 600 μL Ethanol versetzt. Diese Mischung wurde über Nacht bei -20 °C gelagert und am nächsten Tag 99 min bei maximaler Geschwindigkeit und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde zweimal mit 700 μL 70 %igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurde es in 5,5 μL TE-Puffer gelöst und 5 min bei 37 °C inkubiert. Die verbleibende DNA-Lösung, die nicht für die folgende Ligation verwendet wurde, wurde für spätere Anwendungen bei -20 °C gelagert.

3.5.3 Ligation

Die Ligation dient dazu, das geschnittene DNA-Produkt mit dem linearisierten Vektor zu verbinden. Da beides jeweils an einer Seite mit Bam HI und an der anderen Seite mit

Sal I geschnitten wurden, können die übereinstimmenden Schnittstellen ligieren. Das Produkt bildet wieder ein zirkuläres Plasmid, welches die gewünschte (CD105-)Gen-Sequenz enthält.

Der Ligationsansatz

2 μL	TE-Puffer
5 μL	verdaute, aufgereinigte DNA und
1 μL	verdauter, aufgereinigter Vektor

wurde auf 56 °C erwärmt und 2 min bei dieser Temperatur, gefolgt von 1 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Mix kurz zentrifugiert und

1 μL	10 x Ligasepuffer sowie
1 μL	T4 DNA-Ligase

zugegeben. Dies wurde über das Wochenende bei 4 °C stehen gelassen. Mit dem Ligationsansatz wurde direkt im Anschluss eine Transformation durchgeführt. Restliche DNA-Lösung wurde bei -20 °C gelagert.

3.5.4 Transformation mittels Elektroporation

Die nicht-virale Übertragung von DNA in kompetente Bakterien wird als Transformation bezeichnet. Um dies zu bewerkstelligen, müssen die Bakterien transformationskompetent sein, d.h. deren Membran muss vorübergehend durchlässig gemacht werden. Diese Permeabilisierung kann entweder chemisch, z.B. mit Calciumchlorid, oder elektrisch erfolgen. Zu letzterer Kategorie gehört die Elektroporation, welche für die vorliegenden Versuche angewandt wurde. Daher wird lediglich diese Methode nachfolgend näher erläutert.

Bei der Elektroporation werden Spannungspulse durch eine Bakterien-Suspension geleitet. Die sonst isolierende Zellmembran wird durch das Anlegen einer Spannung polarisiert. Überschreitet die Spannung einen kritischen Wert, kann die Membran ihre stabile Anordnung nicht mehr aufrecht erhalten und wird permeabel. Dieser Zustand kann einige Sekunden bis Minuten anhalten, auch wenn die Spannung bereits wieder abgeschaltet ist. Währenddessen können Substanzen, wie z.B. DNA-Moleküle, aus dem umgebenden Medium in das Zellinnere gelangen.

Für die Durchführung wurden WK6- λ -Bakterien verwendet, die aliquotiert bei -80 °C lagerten. Zunächst wurden pro Probe 982 μL SOB-Medium mit 18 μL 20 %iger Glukose-Lösung versetzt und auf 37 °C erwärmt. Die Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, mit 1 μL der ligierten DNA versetzt, kurz durch Rühren mit der Pipettenspitze gemischt und 60 Sekunden auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde in eine Elektroporationsküvette gefüllt und durch leichtes Klopfen von Luftblasen befreit. Die Transformation erfolgte bei einer angelegten Spannung von 2,5 kV, 200 Ω und 25 μF . Anschließend wurden die Bakterien in 1 mL des vorbereiteten SOB-Mediums suspendiert und in ein 15 mL-Zentrifugenröhrchen überführt. Der Deckel wurde nur leicht angedreht, so dass ein Luftaustausch möglich war. Das Röhrchen wurde für mindestens 60 min bei 37 °C

und 180 rpm geschüttelt. Danach wurden dreimal 300 μL und einmal 30 μL der Bakteriensuspension auf Ampicillin-LB-Agar-Platten ausplattiert und über Nacht im Brutschrank inkubiert.

Am folgenden Tag wurden insgesamt mindestens 24 angewachsene (isolierte) Klone mit Hilfe einer 10 μL -Pipettenspitze gepickt, auf eine neue Ampicillin-LB-Agar-Platte aufgestrichen sowie parallel einem PCR-Screening unterzogen. Die Platten wurden wieder über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Für das Screening wurde ein Mastermix hergestellt. Pro Klon wurden

11,5 μL	demineralisiertes Wasser
4 μL	5x Puffer
2 μL	MgCl ₂ (25 mM)
0,4 μL	dNTPs (10 mM)
1 μL	Forwärts-Primer (5 μM)
1 μL	Rückwärts-Primer (5 μM)
0,11 μL	Taq-Polymerase (5 U/ μL)

zusammen pipettiert. Jeweils 20 μL des Master-Mixes wurden in PCR-Gefäßen vorgelegt und anschließend durch Auf- und Abpipettieren mit jeweils einer abgestrichenen Pipettenspitze mit den Bakterien eines Klons vermischt. Die PCR-Primer wurden so gewählt, dass der Forwärts-Primer innerhalb der CD105-Sequenz und der Rückwärts-Primer innerhalb des pLox-Vektors bindet. So kann überprüft werden, ob die Ligation wie gewünscht erfolgt ist. Da die zu amplifizierende DNA-Sequenz eine Länge von etwa 500 bp hat, wurde das PCR-Programm für Sequenzen ≤ 500 bp gewählt wie in Abschnitt 3.4.4 angegeben. Es wurden 35 Zyklen und eine Annealingtemperatur von 56,1 °C verwendet. Die PCR-Produkte wurden auf ein 1 %iges Agarose-Gel aufgetragen und dieses 30 bis 40 min bei 150 V wie oben angegeben aufgetrennt. An der Geldokumentation wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert und die Ergebnisse festgehalten. Anhand dieser Aufnahmen wurden diejenigen Klone ermittelt, bei denen die Ligation positiv verlaufen war. Um die Ergebnisse zu überprüfen, wurden die entsprechenden Klone sequenziert.

Für eine Sequenzierung werden allerdings große Mengen an Plasmid-DNA benötigt. Daher wurden mit den zuvor positiv eruierten Klonen zunächst Vorkulturen und damit anschließend größere Kulturen angeimpft. Für die Vorkultur wurden kleine Glasröhrchen mit 2 mL LB-Medium und 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ampicillin vorgelegt. Mit einer Pipettenspitze wurde über den jeweiligen Klon gestrichen und die Spitze in das Röhrchen mit Medium gegeben. Dies wurde kurz gevortext und 4 - 6 Stunden im Inkubationsschüttler bei 37 °C und 220 rpm inkubiert.

Für die Hauptkultur wurde für das gewünschte Kulturvolumen entsprechend wieder LB-Medium mit 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ampicillin vorgelegt und 1:100 mit der Vorkultur angeimpft. Diese Kultur wurde über Nacht bei 37 °C und 220 rpm geschüttelt. Am nächsten Tag wurde das in den Bakterien enthaltene Plasmid unter Verwendung der JETSTAR Plasmid Purification Kits der Firma Genomed nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die Konzentration der gewonnenen DNA wurde wie in Abschnitt 3.4.2 beschrieben photometrisch über die Messung der optischen Dichte ermittelt. Als Multiplikationsfaktor wurde für DNA allerdings $F = 50$ festgesetzt. Somit ergab sich für die Berechnung der

DNA-Konzentration:

$$c \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right] = OD_{260} \cdot 5000$$

3.5.5 Sequenzieren

Die Proben wurden zur Sequenzierung entweder in die Abteilung für Mikrobiologie an der Medizinischen Hochschule Hannover gebracht oder von der Firma GATC abgeholt. Bei beiden Varianten wurden DNA und Primer nach den jeweiligen Vorgaben gemischt. Die elektronischen Daten wurden anschließend mit dem Programm Lasergene ausgewertet und mit der gewünschten DNA-Sequenz verglichen.

3.6 Lentivirale Überexpression von CD105 und Knockdown von CD24

Mit Hilfe (lenti)viral-vermittelter Transduktionen wird fremd-DNA oder -RNA in einen Rezipienten (hier hBMSC und iPSC) überführt. Eingebraachte DNA wird in das Genom eingebaut und anschließend dort dauerhaft transkribiert und translatiert. Um die Expression des eingebrachten Zielgens von außen steuern zu können, werden häufig induzierbare Promotoren eingesetzt. Diese werden durch die Zugabe eines Stimulanz aktiviert und initiieren daraufhin die Transkription des gewünschten Gens. Als induzierbares Expressionssystem wurde für diese Arbeit das sogenannte Tet-On-System verwendet, bei dem Doxycyclin als Stimulanz diente.

Wird hingegen RNA eingebracht, so wird diese meist nicht lange abgelesen, da die Nukleinsäure schnell wieder abgebaut wird. Mittels *short hairpin* RNA (shRNA) ist es allerdings gelungen, eine stabile Expression auch in proliferierenden Zellen zu erreichen [123]. Über einen komplexen Mechanismus können Gene mit Hilfe geeigneter shRNA ausgeschaltet werden [124]. Dies wird als Knockdown bezeichnet.

Die genauen Vorgehensweisen werden im Folgenden erläutert.

3.6.1 Generierung des Lentivirus für CD105-Überexpression

Für eine Überexpression von CD105 wurden Lentiviren erzeugt, die die rekombinante DNA des ENG-Gens² (siehe auch Abschnitt 3.5) tragen. Diese wurden sowohl mittels 3-Plasmid- als auch 4-Plasmid-System (3- bzw. 4-PS) generiert. In beiden Fällen bestand das erste Plasmid aus der einzubringenden Nukleinsäuresequenz sowie 2 oder 3 Helferplasmiden. Letztere kodieren die für den Virus essentiellen Gene (für Hüll-, Replikations- und Kernproteine). Erst nach Zusammenführung aller Plasmide wird der aktive Virus gebildet und kann sich vermehren. Die einzelnen Bestandteile sind nicht gesundheitsschädigend, so dass dadurch das Risiko beim Arbeiten mit Lentiviren weitestgehend reduziert wird. Bei der Generierung des Lentivirus kann Natriumbutyrate eine Steigerung der viralen Genexpression in den Wirtszellen hervorrufen, wodurch auch die Translation und Transkription der Plasmide gesteigert werden [125]. Daher wird dieses zum Teil ebenfalls in den vorliegenden Versuchen eingesetzt.

²ENG steht für Endoglin (CD105)

Die CD105-Lentiviren wurden in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK-Zellen, engl. *human embryonic kidney cells*) generiert. Hierfür wurde je Ansatz zunächst eine große Petrischale (145 cm²) mit Poly-L-Lysin beschichtet und darauf 10⁷ HEK-Zellen ausgesät. Am nächsten Tag wurde der Transfektionsansatz vorbereitet. Hierzu wurden je nach verwendetem Plasmid-System folgende Volumina zusammen gegeben und durch Auf- und Abpipettieren vermischt:

3-Plasmid-System

	Volumen	Endkonzentration
demineralisiertes Wasser (steril)	1007,5 µL	
Zielpasmid (CD105) (1 µg/µL)	50 µL	35,7 ng/µL
Helferplasmid 1 (1 µg/µL)	12,5 µL pMD.G	8,9 ng/µL
Helferplasmid 2 (1 µg/µL)	50 µL pCMVΔR8.2	35,7 ng/µL
CaCl ₂ (2,5 M)	280 µL	500 mM

4-Plasmid-System

	Volumen	Endkonzentration
demineralisiertes Wasser (steril)	1069 µL	
Zielpasmid (CD105) (1 µg/µL)	25 µL	20,0 ng/µL
Helferplasmid 1 (1 µg/µL)	8,75 µL pMD.G	7,0 ng/µL
Helferplasmid 2 (1 µg/µL)	16,25 µL RRE	13,0 ng/µL
Helferplasmid 3 (1 µg/µL)	6,25 µL REV	5,0 ng/µL
CaCl ₂ (2,5 M)	125 µL	250 mM

Als Zielpasmid wurde die klonierte CD105-DNA aus Abschnitt 3.5 verwendet. Anschließend wurden in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen 1400 µL (3-Plasmid-System) bzw. 1250 µL (4-Plasmid-System) 2-fach HEPES-gepufferte Kochsalzlösung vorgelegt. Während mit einer Pasteurpipette Luftblasen in der Lösung erzeugt wurden, wurde der Transfektionsansatz tropfenweise knapp über der Oberfläche zugegeben. Die Mischung wurde 5 Sekunden auf einem Vortexer geschüttelt und danach 30 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde das Medium der HEK-Zellen abgenommen und die inkubierte Lösung vorsichtig tropfenweise zu den Zellen gegeben. Unter regelmäßigem Schwenken wurde der Ansatz 15 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Danach wurden 20 mL frisches Medium für HEK-Zellen hinzugefügt und dies weitere 24 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Am folgenden Tag wurde das Transfektions-Medium abgenommen und durch 15 mL frisches Medium mit 10 mM zugesetztem HEPES ersetzt. Wenn die Transfektion mit Zugabe von Natriumbutytrat durchgeführt wurde, wurde dieses dem frischen Medium im Verhältnis 1:100, in diesem Fall 150 µL, ebenfalls zugesetzt. Die Zellen wurden erneut 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend (etwa 48 Stunden nach der Transfektion) wurde das Medium über den HEK-Zellen abgenommen, durch einen 0,45 µm-Filter filtriert und in einem 50 mL-Zentrifugenröhrchen gesammelt. Dieses wurde bei 4 °C gelagert. Die Zellen wurden erneut mit 15 mL frischem Medium inkl. 10 mM zugesetztem HEPES (aber ohne Natriumbutytrat) versorgt und noch einmal für einen Tag im Brutschrank inkubiert. Die Prozedur vom Vortag wurde wiederholt, das

filtrierte Medium mit dem vorherigen vermischt und die Zellen entsorgt. Das Medium, welches den Virus enthält, wurde anschließend aliquotiert und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.6.2 Lentiviral-vermittelte Transduktion von hBMSC und iPSC

Für die Transduktion humaner MSC und iPSC wurden die Zellen in Zellkulturflaschen zunächst bis zu einer Konfluenz von etwa 60 % kultiviert. Neben dem selbst generierten Virus zur CD105-Überexpression wurden auch arbeitsgruppenintern hergestellte Lentiviren mit folgenden Templaten verwendet:

- shRNAmir gegen CD24 zum Knockdown von CD24
- shRNAmir ohne Ziel-RNA als Kontrolle
- GFP als Kontrolle zum CD105-Lentivirus: Tet-On-System, Induzierung der Translation durch Doxycyclin
- CD34 trunkiert (CD34t), welches nicht funktionsfähig ist und als Kontrolle für die CD105-Überexpression bei der magnetischen Zellsortierung diente: Tet-On-System, Induzierung der Translation durch Doxycyclin

Hatten die Zellen die entsprechende Konfluenz erreicht, wurden diese infiziert. Dazu wurde bei den Tet-On-Systemen (CD105, CD34t und GFP) frisches Medium mit 5 % [v/v] Lentivirus-Lösung, 5 % [v/v] MIK-Virus und 8 ng/mL Polybrene versetzt. Bei dem Einsatz von shRNA wurden dem Medium 10 % [v/v] Lentivirus-Lösung und 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Polybrene zugesetzt. Das alte Kulturmedium wurde anschließend abgenommen und durch das vorbereitete Medium für die Transduktion ersetzt. Je T25-Zellkulturflasche wurden 3 mL und je T75-Zellkulturflasche wurden 9 mL Virusmischung verwendet. Diese wurden mindestens einen Tag im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Virus-haltige Medium abgenommen und durch frisches ersetzt (ohne Virus). Um die Überexpression von GFP, CD34t oder CD105 einzuleiten, wurde dem Medium zusätzlich 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Doxycyclin zugesetzt. Nach einer Transduktion mit shRNA-Viren wurde dem Medium hingegen 5 bis 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Puromycin, ein Zellgift, zugegeben. Die verwendeten Viren enthielten neben der eigentlichen kodierenden Sequenz ein Gen, welches die infizierten Zellen resistent gegen Puromycin macht, sodass auf diese Weise eine Selektion der erfolgreich infizierten Zellen erfolgen konnte. Zellen ohne transduzierte RNA wurden durch die Puromycin-Zugabe abgetötet und mit dem nächsten Mediumwechsel aus der Kultur herausgewaschen. Zusätzlich kodierten die verwendeten shRNA-Sequenzen GFP, sodass infizierte Zellen direkt unter dem Fluoreszenzmikroskop durch eine grüne Fluoreszenz erkennbar wurden.

3.7 Magnetische Zellsortierung

Die magnetische Zellsortierung (MACS) beruht ebenso wie die Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung auf einem Antigen-Antikörper-Prinzip. Hierbei sind die Antikörper allerdings nicht mit Fluorochromen, sondern mit magnetischen Partikeln markiert. Nachdem der Antikörper an das jeweilige Antigen der Zelloberfläche gebunden hat, wird die Zellsuspension auf eine Säule geladen, die in einem magnetischen Feld platziert ist. Die Zellsuspension wird durch die Säule geleitet, wobei die markierten Zellen durch das

magnetische Feld zurück gehalten werden. Das bedeutet, nur unmarkierte Zellen, also Zellen ohne entsprechendes Oberflächenantigen, laufen durch die Säule hindurch und können aufgefangen werden. Anschließend wird das magnetische Feld entfernt und die zuvor zurück gehaltenen Zellen können in einer zweiten Fraktion durch die Säule geleitet werden. Diese Zellen sind positiv in Bezug auf das entsprechende Antigen.

In den vorliegenden Versuchen wurde eine positive Selektion von CD105 und CD34t auf lentiviral transduzierten iPS-Zellen durchgeführt. Dazu wurde das MACS-Separation-Prinzip der Firma Miltenyi Biotech angewandt. Vorbereitend wurden die Zellen wie oben beschrieben mit Trypsin/EDTA abgelöst und nach Herstellerangaben mit den MicroBeads (magnetische Partikel) markiert und mit Hilfe des MidiMACS unter sterilen Bedingungen sortiert. Abschließend wurden die erhaltenen positiven Zellen zweimal mit PBS gewaschen, jeweils 5 min bei RT und 300 x g zentrifugiert und in iPS-MSC-Medium resuspendiert. Je nach Zellzahl wurden sie in geeigneten gelatinierten Zellkulturflaschen ausgesät und wie gewohnt weiter kultiviert.

4 Ergebnisse

Dieses Kapitel befasst sich mit den Ergebnissen der experimentellen Arbeiten. Zu Beginn wurden die verwendeten induzierten pluripotenten Stammzellen hinsichtlich eventueller Passage-, Ursprungs- und Kultivierungs-abhängiger Unterschiede analysiert (Abschnitt 4.1). Daraufhin sollte getestet werden, inwiefern induzierte pluripotente Stammzellen (iPSC) für die Erzeugung mesodermaler Zelltypen (Fett-, Knorpel- und Knochenzellen) geeignet sind (Abschnitt 4.1.2). Im darauffolgenden Abschnitt 4.2 wurde die Differenzierung von iPSC zu MSC mittels Embryoid Body (EB)- und Monolayer (ML)-Methode untersucht, die resultierenden Zellen (iPS-MSC) näher analysiert und mit humanen MSC aus Knochenmark (hBMSC) verglichen. Anschließend wurde die mesodermale Differenzierungskapazität sowohl von den generierten iPS-MSC als auch von hBMSC untersucht und miteinander verglichen (Abschnitt 4.3). Durch verschiedene Modifizierungen der ML- und EB-Methoden wurden schließlich der Differenzierungsprozess auf molekularer Ebene sowie einzelne Optimierungsmöglichkeiten näher beleuchtet (Abschnitt 4.4).

Für die Darstellung der Ergebnisse werden die verwendeten Zellen folgendermaßen bezeichnet:

- Die Abkürzung des Ursprungsgewebes der iPSC wird an den Anfang der jeweiligen Kultur-Bezeichnung gesetzt (vgl. Tabelle 3.3), z.B. **hCB-iPSC**.
- Die jeweils zur Generierung von iPS-MSC verwendete Methode wird abgekürzt in Klammern hinter die Kulturbezeichnung gesetzt, z.B. **iPS-MSC(EB)**.
- Die jeweilige Passagenzahl, in der sich die Zellen zum Zeitpunkt des Versuches befunden haben, werden wie folgt angegeben:
 - Für hBMSC **Passage X**
 - Für iPSC, iPS-MSC und alle Zustände dazwischen **Passage Z.X**

Dabei ist X die Anzahl an Passagen, die in unserem Labor durchgeführt wurden und Z die Anzahl an Passagen, die die iPSC zuvor in Kultur gehalten wurden. Beispielsweise bedeutet Passage 45.0, dass die iPSC über 45 Passagen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Martin kultiviert, für die eigenen Experimente aber noch nicht passagiert wurden. Passage 61.3 hingegen bedeutet, dass die iPS-Zellen über 61 Passagen expandiert und anschließend dreimal im Rahmen der Differenzierung von iPSC zu MSC passagiert wurden.

Für die meisten Experimente dieser Arbeit wurden hCB-iPSC verwendet. Diese iPSC wurden aus humanen Nabelschnurblut-Zellen durch lentivirale Transduktion mit den Thomson-Faktoren (OCT4, SOX2, NANOG und LIN28) generiert. Da die Ursprungszellen eine sehr junge Zellpopulation darstellen, werden den entsprechenden iPSC äußerst positive Eigenschaften prognostiziert. Unter anderem ist das Risiko genetischer Veränderungen bei Zellen eines jungen Menschen deutlich geringer als bei Zellen eines Erwachsenen.

4.1 iPSC als Zellquelle zur Erzeugung mesenchymaler Zelltypen

4.1.1 Analyse und Charakterisierung von iPSC als gleichbleibende Zellquelle

Um zu verifizieren, ob iPSC als eine konstante Zellquelle zur Erzeugung mesenchymaler Zelltypen geeignet sind, wurden zunächst verschiedene iPSC-Populationen analysiert. Diese wurden aus unterschiedlichen somatischen Zellen (Nabelschnurblut, hämatopoetischen Stammzellen und Vorhaut-Fibroblasten) generiert und entweder auf murinen Fibroblasten als Feeder-Zellen oder vor der Analyse zwei Passagen auf Matrigel kultiviert. Damit ergaben sich sechs verschiedene iPSC-Populationen, die getrennt voneinander untersucht und anschließend miteinander verglichen wurden. Jede Population wurde mindestens in drei verschiedenen Passagen untersucht.

Einfluss des Ursprungsgewebes und der Kultivierungsbedingungen

Mittels Durchflusszytometrie (FCM) wurde zunächst die Präsentation typischer pluripotenter und mesenchymaler Marker auf der Zelloberfläche analysiert. Tabelle 4.1 und Abbildung 4.1 zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen der FCM-Analysen. Tabellen mit den Ergebnissen der Einzelmessungen befinden sich im Anhang (Abschnitt C).

Anhand der FCM-Daten konnten zwei Gruppen von Antigenen identifiziert werden: Die erste Gruppe (CD14, CD24, CD34, CD45, CD90, CD106) wies nur sehr kleine Unterschiede sowohl zwischen als auch innerhalb einer Population auf. Diese Zellen waren entweder deutlich positiv (CD24, CD90; weit über 90 % positive Zellen) oder negativ (CD14, CD 34, CD 45 und CD106; max. 5,6 %) einzuordnen. Dadurch ergaben sich nur geringe Standardabweichungen.

Die zweite Gruppe wies hingegen sehr große Unterschiede und damit deutlich höhere Standardabweichungen auf. Die Heterogenität konnte sowohl zwischen hCB-, hHSC- und hFF-iPSC als auch zwischen den jeweiligen Kulturen von Matrigel und Feeder-Zellen beobachtet werden. Bei CD73, CD105 und CD106 wurden sogar Standardabweichungen ermittelt, die größer waren als der jeweilige Mittelwert (gelb markiert in Tabelle 4.1).

Daneben ließ jede Population für sich betrachtet einen Vergleich der unterschiedlichen Kulturbedingungen zu (obere drei Diagramme in Abbildung 4.1). Auffällig hierbei war, dass sowohl bei den hCB- als auch den hHSC-iPSC die Pluripotenzmarker CD24, SSEA-3, -4 und -5 sowie TRA-1-60 in den Kulturen von Feeder-Zellen durchschnittlich erhöht auf der Zelloberfläche präsentiert wurden. Die typischen positiven MSC-Marker CD44, CD73, CD90, CD105, CD146 und CD271 wurden hingegen im Mittel auf den Matrigel-Kulturen verstärkt nachgewiesen. Entsprechende Tendenzen wiesen hFF-iPSC lediglich im Fall von SSEA-3, CD73 und CD105 auf. Alle anderen typischen Pluripotenzmarker (CD24, SSEA-4 und -5, TRA-1-60) wurden durchschnittlich auf den hFF-iPSC von Matrigel, die weiteren angesprochenen MSC-Marker (CD44, CD90, CD146, CD271) entsprechend auf den Zellen der Feeder-Kulturen stärker exprimiert. Dennoch sei an dieser Stelle noch einmal auf die starken Schwankungen innerhalb einer Kultur, erkenntlich

Tabelle 4.1: Durchschnittswerte und Standardabweichungen der FCM-Analysen von hCB-, hHSC- und hFF-iPSC, die auf Matrigel oder Feeder-Zellen kultiviert wurden. Es ist der Anteil positiver Zellen in Prozent angegeben. Bei den gelb markierten Werten ist die Standardabweichung größer als der jeweilige Mittelwert.

Anteil positiver Zellen / %	hCB-iPSC		hHSC-iPSC		hFF-iPSC	
	Matrigel (n = 9)	Feeder (n = 5)	Matrigel (n = 4)	Feeder (n = 5)	Matrigel (n = 4)	Feeder (n = 3)
CD13	36,92 ± 29,65	52,48 ± 34,04	57,10 ± 37,98	51,45 ± 36,00	27,78 ± 22,07	55,47 ± 11,45
CD14	0,46 ± 0,36	0,48 ± 0,36	0,45 ± 0,39	0,40 ± 0,14	0,23 ± 0,15	0,37 ± 0,29
CD24	93,98 ± 9,21	97,76 ± 0,39	95,48 ± 5,20	96,58 ± 2,58	95,30 ± 3,11	90,67 ± 6,99
CD34	1,98 ± 0,68	2,42 ± 1,55	3,48 ± 1,42	3,08 ± 1,59	1,83 ± 0,59	1,97 ± 1,59
CD44	58,61 ± 41,92	52,26 ± 45,81	68,55 ± 19,60	63,20 ± 14,47	16,03 ± 2,99	42,77 ± 14,85
CD45	0,47 ± 0,19	0,62 ± 0,25	0,63 ± 0,15	0,70 ± 0,24	0,65 ± 0,58	1,17 ± 0,90
CD56	90,14 ± 9,32	73,82 ± 13,44	77,05 ± 15,04	77,46 ± 8,07	73,03 ± 25,52	74,37 ± 32,62
CD73	35,30 ± 34,31	14,02 ± 17,81	15,80 ± 9,83	2,40 ± 2,46	8,23 ± 2,18	4,00 ± 0,26
CD90	98,74 ± 0,99	96,28 ± 1,72	95,48 ± 6,22	92,10 ± 3,94	92,23 ± 5,66	91,67 ± 3,96
CD105	28,63 ± 36,06	9,32 ± 17,77	30,28 ± 19,35	5,16 ± 5,85	4,65 ± 1,35	1,50 ± 0,82
CD106	1,39 ± 0,94	1,00 ± 0,41	5,00 ± 5,64	1,80 ± 1,33	4,18 ± 4,25	2,77 ± 1,70
CD146	85,43 ± 11,72	68,02 ± 37,02	79,80 ± 9,74	74,08 ± 6,94	60,75 ± 32,51	75,70 ± 16,48
CD271	52,67 ± 38,10	46,14 ± 40,67	41,73 ± 34,66	41,03 ± 28,44	2,23 ± 0,85	2,47 ± 0,93
SSEA-3	35,33 ± 34,27	68,52 ± 26,51	41,45 ± 34,74	36,38 ± 22,01	34,53 ± 13,59	59,65 ± 33,45
SSEA-4	85,80 ± 23,78	98,70 ± 0,72	91,90 ± 11,47	93,64 ± 5,87	82,40 ± 3,93	79,50 ± 12,96
SSEA-5	74,38 ± 28,37	96,80 ± 1,60	83,00 ± 14,47	84,50 ± 15,93	58,77 ± 25,48	53,60 ± 11,60
TRA-1-60	54,29 ± 34,83	85,40 ± 13,61	58,80 ± 22,07	60,16 ± 19,45	49,73 ± 14,63	48,93 ± 35,01

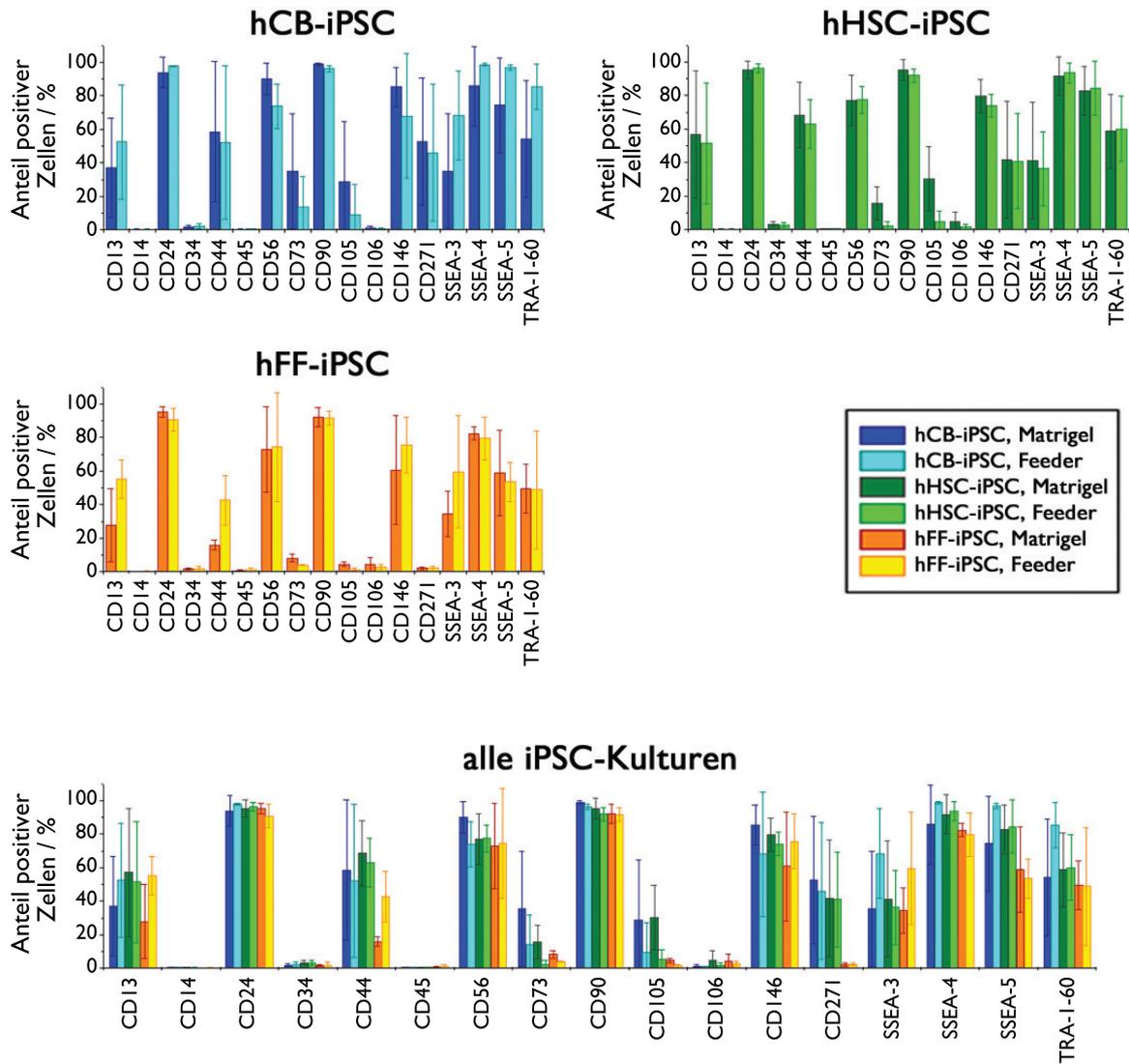


Abbildung 4.1: Durchflusszytometrische Analyse verschiedener pluripotenter und mesenchymaler Oberflächenproteine auf iPSC verschiedenen Ursprungs (hCB-, hHSC- und hFF-iPSC) und Kultur (Matrigel, Feeder). Dargestellt sind die Mittelwerte der positiven Anteile einer iPSC-Population inklusive der jeweiligen Standardabweichung in Prozent. hCB-iPSC sind in blau, hHSC-iPSC in grün und hFF-iPSC in orange/gelb dargestellt, wobei die Matrigel-Populationen jeweils durch den dunkleren Balken, die Feeder-Populationen durch den helleren Balken repräsentiert werden. In den oberen drei Diagrammen sind hCB-, hHSC- und hFF-iPSC getrennt, im unteren Diagramm gemeinsam dargestellt.

an den großen Standardabweichungen, hingewiesen.

Die verringerte Expression der Pluripotenzmarker in Einklang mit einer erhöhten Expression mesenchymaler Marker auf hCB- und hHSC-iPSC von Matrigel lässt auf eine Prädifferenzierung der iPSC-Kultur auf Matrigel zu mesenchymalen Zelltypen schließen. Von anderen Forschergruppen wurde für Feeder-frei kultivierte pluripotente Stammzellen beschrieben, dass es vor allem in den Randbereichen einzelner Klone zu einer EMT kommt und Zellen mit mesenchyalem Charakter auftreten [107, 111]. Für die eigenen nachfolgenden Experimente war dies aber kein Nachteil, da die induzierten pluripotenten Stammzellen ohnehin in mesenchymale Richtung differenziert werden sollten.

Warum bei hFF-iPSC keine Prädifferenzierung stattgefunden hatte, wurde nicht näher untersucht. Anhand der FCM-Analysen lässt sich jedoch vermuten, dass der pluripotente Charakter dieser iPSC-Population nicht so stark ausgeprägt war wie der der hCB- und hHSC-iPSC. Neben einer schwächeren Oberflächenexpression der Pluripotenz-Marker SSEA-4, SSEA-5 und TRA-1-60 wurden auch einige der MSC-Marker (CD44, CD73, CD105, CD271) auf hFF-iPSC am geringsten präsentiert. Somit wäre ein allgemein vermindertes Expressionsverhalten dieser Zellen ebenfalls denkbar.

Neben den durchflusszytometrischen Analysen wurden die Proben aller iPSC-Populationen mittels quantitativer RT-PCR in Bezug auf die Genexpression verschiedener Pluripotenz- (ALPL, CD24, E-Cadherin, LIN28, NANOG, OCT4, SOX2) und MSC-Marker (CD44, CD73, CD90, CD105, CD146) untersucht. Die Zellen wurden in mindestens drei verschiedenen Passagen analysiert. Ziel war es dabei, einen Eindruck davon zu erhalten, ob und, wenn ja, wie stark sich die zum Teil großen Schwankungen der Oberflächenantigene auf mRNA-Ebene widerspiegeln. Dazu wurden alle ermittelten ΔC_T -Werte auf den insgesamt niedrigsten Messwert normiert. Die so erhaltenen $\Delta\Delta C_T$ -Werte sind sortiert nach iPSC-Population in Abbildung 4.2 als Boxplots dargestellt.

Allgemein zeigte sich, dass die Unterschiede zwischen den einzelnen Populationen sowie zwischen Matrigel oder Feeder-Kulturen meist gering ausfielen. Die Schwankungen blieben überwiegend unterhalb eines $\Delta\Delta C_T$ -Wertes von 10 (ALPL, CD24, LIN28, NANOG, SOX2, CD90, CD105). Dies bedeutete, dass sich der niedrigste und der höchste Wert aller Populationen um maximal eine 10er-Potenz unterschieden. Bei ALPL, CD24, LIN28 und SOX2 waren dies $\Delta\Delta C_T$ -Maxima sogar unter 4 bzw. 6. OCT4, CD44 und CD146 besaßen lediglich in den hCB-iPSC-Populationen einen oder zwei stärker abweichende Werte oberhalb der 10-fachen Expression (bezogen auf den insgesamt niedrigsten Wert). Ansonsten waren auch hier die Schwankungen sehr gering. Relativ große Schwankungen wurden nur bei CD73 mit $\Delta\Delta C_T$ -Werten bis zu 210 detektiert. Für CD44, OCT4 und eingeschränkt auch für CD73 konnten die Schwankungen auf eine Ab- bzw. Zunahme der Genexpression mit fortschreitender Kultivierungsdauer zurückgeführt werden (siehe unten).

Durchflusszytometrisch konnte gezeigt werden, dass Pluripotenz-assoziierte Oberflächenantigene vermehrt auf den iPSC von Feeder-Zellen und typische mesenchymale Antigene stärker auf den iPSC von Matrigel exprimiert wurden. Auf mRNA-Ebene kann dies nur bei den MSC-Markern (CD44, CD73, CD90, CD105, CD146) festgestellt werden. Deren Genexpressionen sind im Mittel durchgehend in den Matrigel-Kulturen höher als in den iPSC von Feeder-Zellen. Die Präsentation dieser Oberflächenmarker scheint demnach direkt von der jeweiligen Menge an entsprechend exprimierter mRNA abhängig zu sein. Die mRNA-Analysen der Pluripotenzmarker (CD24, E-Cadherin, LIN28, NANOG, OCT4 und SOX2) lassen hingegen nur minimale Tendenzen vermuten, welche ebenfalls zugunsten der Matrigel-iPSC ausfallen. Dies verhält sich demnach gegenläufig zu den FCM-Daten. Allerdings konnten lediglich für CD24 sowohl FCM- als auch mRNA-Daten gewonnen und damit ein direkter Zusammenhang ermittelt werden. Da die Präsentation vieler Oberflächenantigene nicht direkt von der Transkription abhängt, kann es durchaus sein, dass trotz erniedrigtem mRNA-Niveau eventuell mehr Proteine translatiert und/oder auf der Zelloberfläche präsentiert wurden.

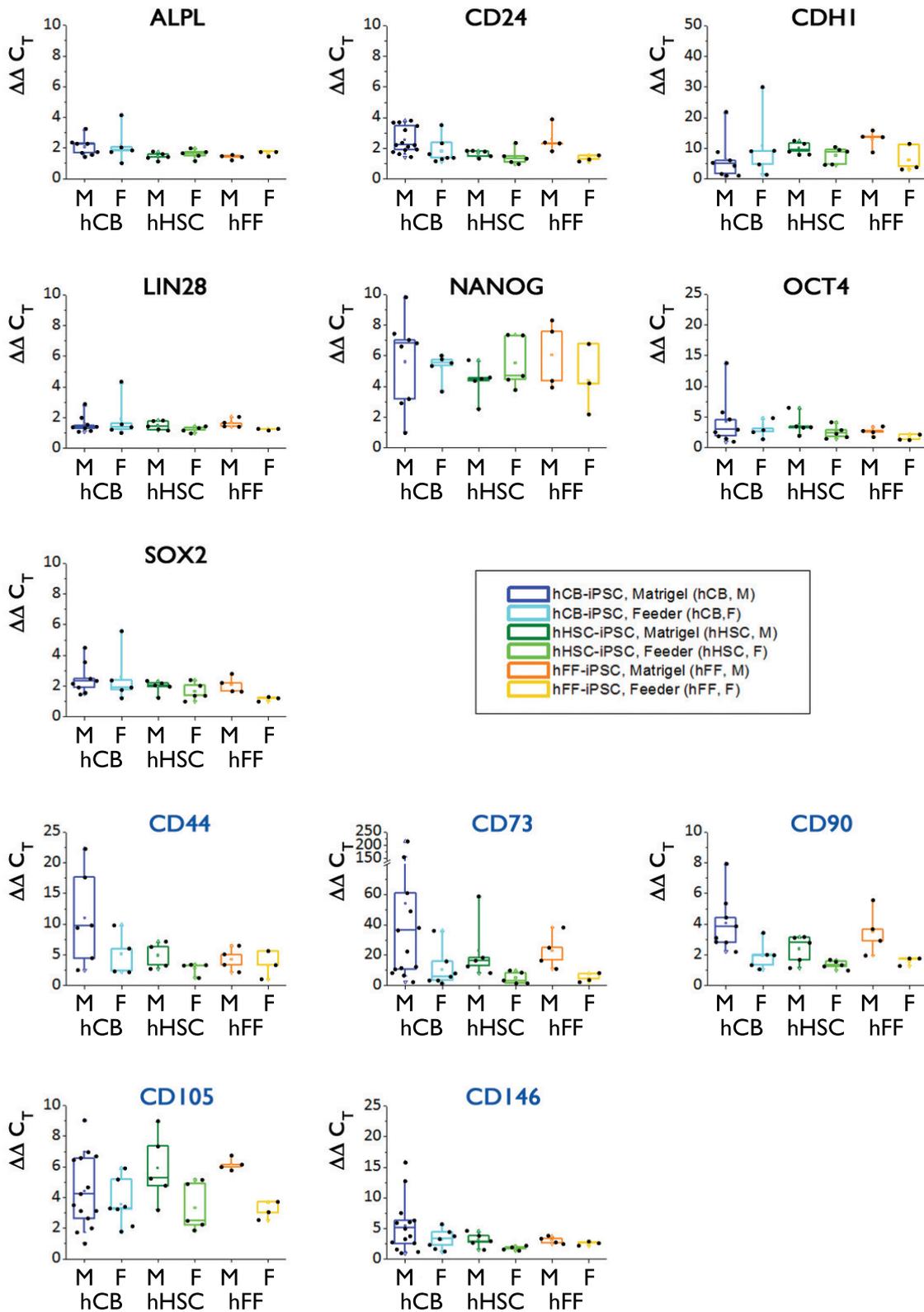


Abbildung 4.2: Boxplot-Diagramme der normierten relativen Genexpressionswerte von allen hCB-, hHSC- und hFF-iPSC-Populationen, die auf Matrigel oder Feeder-Zellen kultiviert und in verschiedenen Passagen analysiert wurden. Alle Messwerte eines Gens wurden jeweils auf den Messwert mit der geringsten Genexpression normiert ($\Delta\Delta C_T$).

Einfluss der Kultivierungsdauer

In vitro werden Zellen häufig möglichst schnell bis zu einer gewünschten Zellzahl expandiert, als Aliquote eingefroren und bei Bedarf wieder aufgetaut. Somit wird das Risiko einer Seneszenz¹ verringert. Da nun aber iPSC als immortalisierte Zellen gelten und oft über einen langen Zeitraum kultiviert werden, sollte deren Alter bzw. die Passagenzahl keinen Einfluss auf ihre pluripotenten Eigenschaften sowie ihr Differenzierungsverhalten haben. Um zu überprüfen, ob und inwiefern sich Unterschiede bei den induzierten pluripotenten Stammzellen in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer ergaben, wurden die Zellen innerhalb von fünf Monaten in den Passagen 34.0, 36.0, 42.0, 45.0, 50.0 und 61.0 analysiert. Diese Untersuchungen wurden lediglich mit hCB-iPSC durchgeführt. Die Zellen wurden als Langzeitkultur auf Feeder-Zellen gehalten und jeweils ein Teil von ihnen zwei Passagen vor der Analyse auf Matrigel gesetzt.

Die durchflusszytometrischen Analysen der iPSC ergaben eine kontinuierlich abnehmende Oberflächenexpression von CD13, CD44, CD56, CD73, CD146, CD271 und SSEA-3 über den gesamten Messzeitraum (Abbildung 4.3). Sowohl bei den Matrigel- als auch den Feeder-Zellen waren zwischen den ersten beiden Messungen (Passage 34.0 und 36.0 bzw. 36.0 und 42.0) meist nur kleine Unterschiede erkennbar. Spätestens ab der dritten Messung konnte jedoch eine starke Verminderung des jeweiligen Antigens beobachtet werden. Die größten Unterschiede zwischen der ersten und letzten Messung konnten in beiden Kulturen bei den MSC-typischen Oberflächenproteinen CD13, CD44, CD73 sowie in der Feeder-Kultur zusätzlich bei CD146 und CD271 beobachtet werden. Hierbei gingen die Expressionen von 40 % (Feeder, CD73) bzw. über 80 % auf annähernd 0 % zurück. Bei den Pluripotenzmarkern SSEA-3 und TRA-1-60 und dem mesenchymalen Negativmarker CD56 umfasste die Verminderung immerhin noch 21 bis 65 %-Punkte.

Die abnehmende Tendenz einiger Oberflächenantigene konnte auf mRNA-Ebene ebenfalls beobachtet werden (Abbildung 4.3). Bei CD73 und CD146 war eine abnehmende Tendenz über die Zeit in den Matrigel-iPSC zwar schwach erkennbar, die Analysen der Feeder-iPSC zeigten allerdings keinen eindeutigen Verlauf. Aus diesem Grund wurden diese qRT-PCR-Ergebnisse nicht dargestellt. CD44 spiegelte allerdings das Ergebnis der Durchflusszytometrie vor allem bei den Zellen von Matrigel sehr gut wider. Es war eindeutig eine Abnahme der Genexpression zwischen Passage 34.0 und 61.0 erkennbar. Die Pluripotenz-assoziierten Marker OCT4, E-Cadherin, LIN28 und SOX2 wiesen mRNA-Ebene einen Anstieg und damit eine entgegengesetzte Tendenz zu den Oberflächenantigenen SSEA-3 und TRA-1-60 auf.

Auffällig waren zudem die Analysen beider iPSC-Kulturen (Matrigel, Feeder) in Passage 50.0. Bei diesen Zellen wurde sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene in den meisten Fällen eine der jeweiligen Tendenz gegenläufige Expression detektiert. Warum es zu den abweichenden Ergebnissen bezüglich dieser Passage kam, konnte nicht abschließend geklärt werden. Nach bisherigem Kenntnisstand wurden an den Kulturbedingungen keine Veränderungen vorgenommen. Allerdings könnten äußere Umstände² die Ursache hierfür gewesen sein, auch wenn derartige nicht bekannt ist. Ein Messfeh-

¹Zellalterung, die z.B. zu verringerter Proliferation sowie Zellaktivität und schließlich zum Zelltod führt

²Z.B. ein Stromausfall, ein Defekt bei der Gaszufuhr, oder auch die Betreuung der Kultur durch eine andere Person

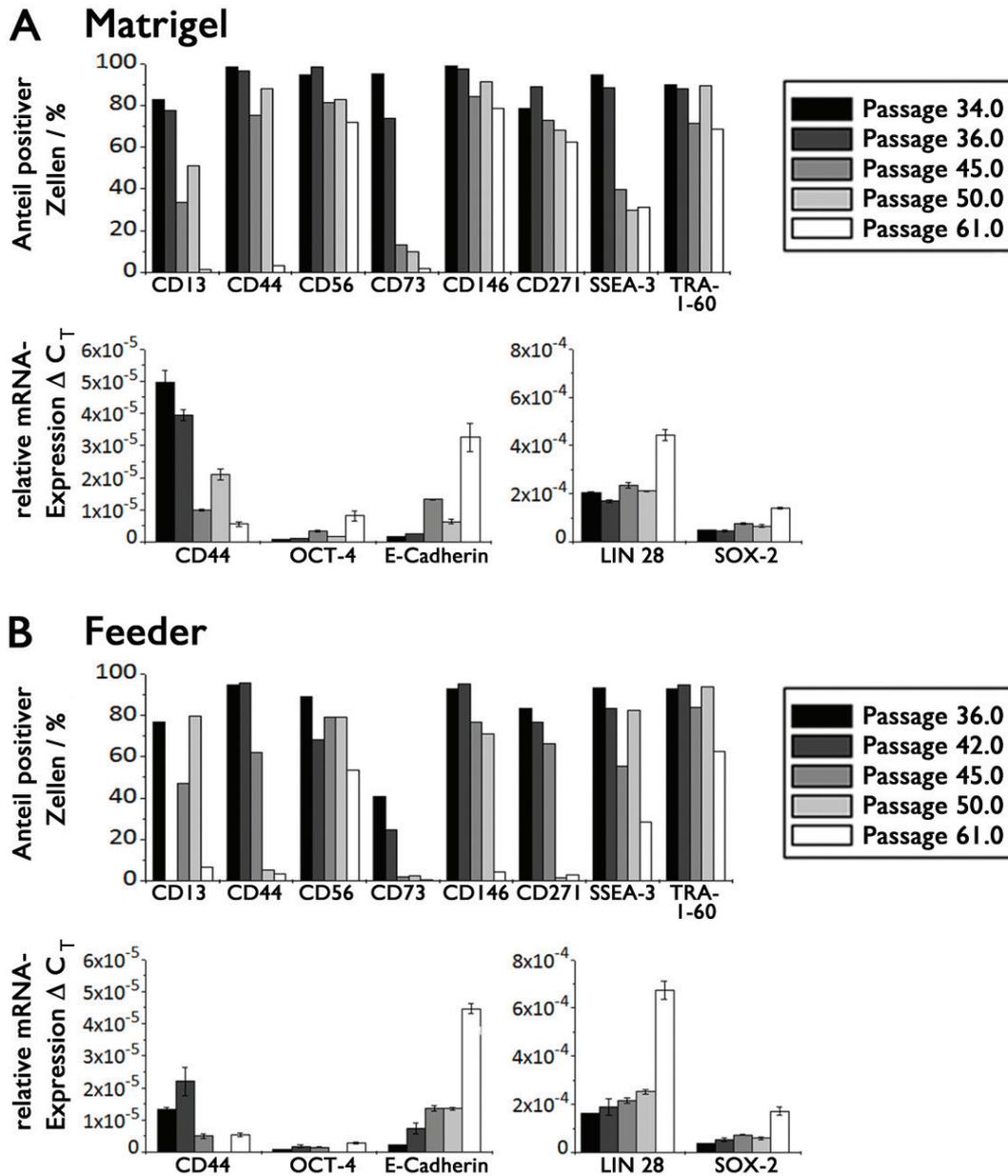


Abbildung 4.3: Analyse der Oberflächenmarker und der Genexpression während der Langzeitkultivierung über fünf Monate in verschiedenen Passagen. Dargestellt sind hCB-iPSC, die auf Matrigel (A) oder Feeder-Zellen (B) kultiviert wurden. Das jeweils obere Diagramm zeigt die Ergebnisse der FCM-Analysen, das jeweils untere Diagramm zeigt entsprechend die Resultate der qRT-PCR.

ler aus methodischen oder technischen Gründen kann ausgeschlossen werden, da beide unabhängigen Messmethoden ähnliche Abweichungen bei denselben Zellen aufwiesen.

4.1.2 Direkte mesodermale *in vitro*-Differenzierung von hCB-iPSC

In diesem Abschnitt wird die adipogene, chondrogene und osteogene Differenzierung von hCB-iPSC beschrieben. Letztere wurde sowohl mit 10 mM β -Glycerophosphat (β -GP) als auch mit 3 mM Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4) induziert. Die Versuche wurden mit Zellpopulationen durchgeführt, die entweder auf Matrigel oder auf

Feeder-Zellen kultiviert wurden. Die Zellzahl der zu Beginn verwendeten iPSC (Passage 40.0) von Matrigel war nicht ausreichend, um alle drei Differenzierungen parallel durchzuführen. Daher wurden diese Zellen zunächst nur chondrogen induziert. Für die Adipogenese und die Osteogenese wurden Zellen der darauffolgenden Passage (Passage 41.0) verwendet. Mit den iPSC von Feeder-Zellen (Passage 44.0) konnten alle drei Differenzierungen parallel durchgeführt werden.

Histologische Analysen

Bei beiden Zellpopulationen (Matrigel, Feeder) war auffällig, dass sich die Zellpellets für die Chondrogenese sowie die entsprechenden Kontrollen kaum abgerundet haben. Über den gesamten Differenzierungszeitraum blieben die Zellen eher schwammartig, wurden aber zum Ende hin etwas kompakter. Zudem nahm der Pelletumfang nicht merklich zu. Aus diesen Gründen wurde auf das Einbetten in Einbettmedium und das Anfertigen von Kryoschnitten verzichtet. Die adipogen und osteogen induzierten Zellen wurden nach vier Wochen mit PFA fixiert und entsprechend histologisch analysiert. Von allen Differenzierungen wurden zu Versuchsbeginn (Tag 0) sowie nach drei und nach vier Wochen mRNA-Proben genommen.

Abbildung 4.4 zeigt die histologischen Färbungen nach vierwöchiger Differenzierung. Die histologischen Analysen zeigten schwache, aber dennoch eindeutig positive Resultate bezogen auf eine adipogene und osteogene Differenzierung. Die Färbung der Lipid Droplets (LDs) mit dem Fluoreszenzfarbstoff BODIPY ließ sehr kleine Fetttropfen erkennen, was auf ein frühes Stadium der Adipogenese deutet. Neben der BODIPY-Färbung wurden die Zellen auch mit DAPI inkubiert, wonach die Zellkerne blau fluoreszierten. Auf eine Overlay-Darstellung wurde in Abbildung 4.4 verzichtet, da die Zellen eine sehr dichte und zum Teil mehrschichtige epitheliale Struktur aufwiesen. In einer überlagerten Darstellung hätte die blaue Fluoreszenz der eng aneinander liegenden Zellkerne die grüne Fluoreszenz der LDs überdeckt, wodurch eine adäquate Darstellung der adipogenen Differenzierung nicht möglich wäre. Neben den differenzierten Zellen wiesen die Kontrollzellen beider Versuche ebenfalls einen einheitlichen leicht grünen Schimmer auf. Dieser wird von der Bindung des Fluoreszenzfarbstoffes an die lipophilen Bereiche der Zellmembran hervorgerufen [116]. Durch die hohe Dichte der Zellen und ihrer Membranen ist eine schwache Fluoreszenz auch bei nicht differenzierten Zellen möglich. Zwischen der Differenzierung von iPSC von Matrigel und jenen, die auf Feeder-Zellen kultiviert wurden, konnte kein Unterschied im Differenzierungsverhalten festgestellt werden.

Die Histologie der Osteogenese zeigte, dass mit dem Natriumsalz NaH_2PO_4 bessere Resultate erreicht wurden als mit der Phosphatquelle β -GP. Nach einer Induktion mit NaH_2PO_4 konnten sowohl Calcium- (Alizarin Rot) als auch Phosphat-Ionen (von Kossa) in der extrazellulären Matrix nachgewiesen werden, was für eine Mineralisierung spricht. Bei der Alizarin Rot-Färbung der mit β -GP differenzierten Zellen konnte lediglich ein leichter roter Schimmer wahrgenommen werden. Die von Kossa-Färbung zeigte hingegen wenige gelb-braune (iPSC von Feeder) bis dunkelbraune Flecken (iPSC von Matrigel) und somit kleine Phosphat-reichere Bereiche. Aufgrund des zu schwachen Calciumionen-Nachweises konnte von einer hinreichenden Mineralisierung nach β -GP-Induktion jedoch nicht ausgegangen werden. Die zuvor angesprochene teilweise mehrlagige Zellschicht konnte auch bei der Osteogenese beobachtet werden. Scheinbar

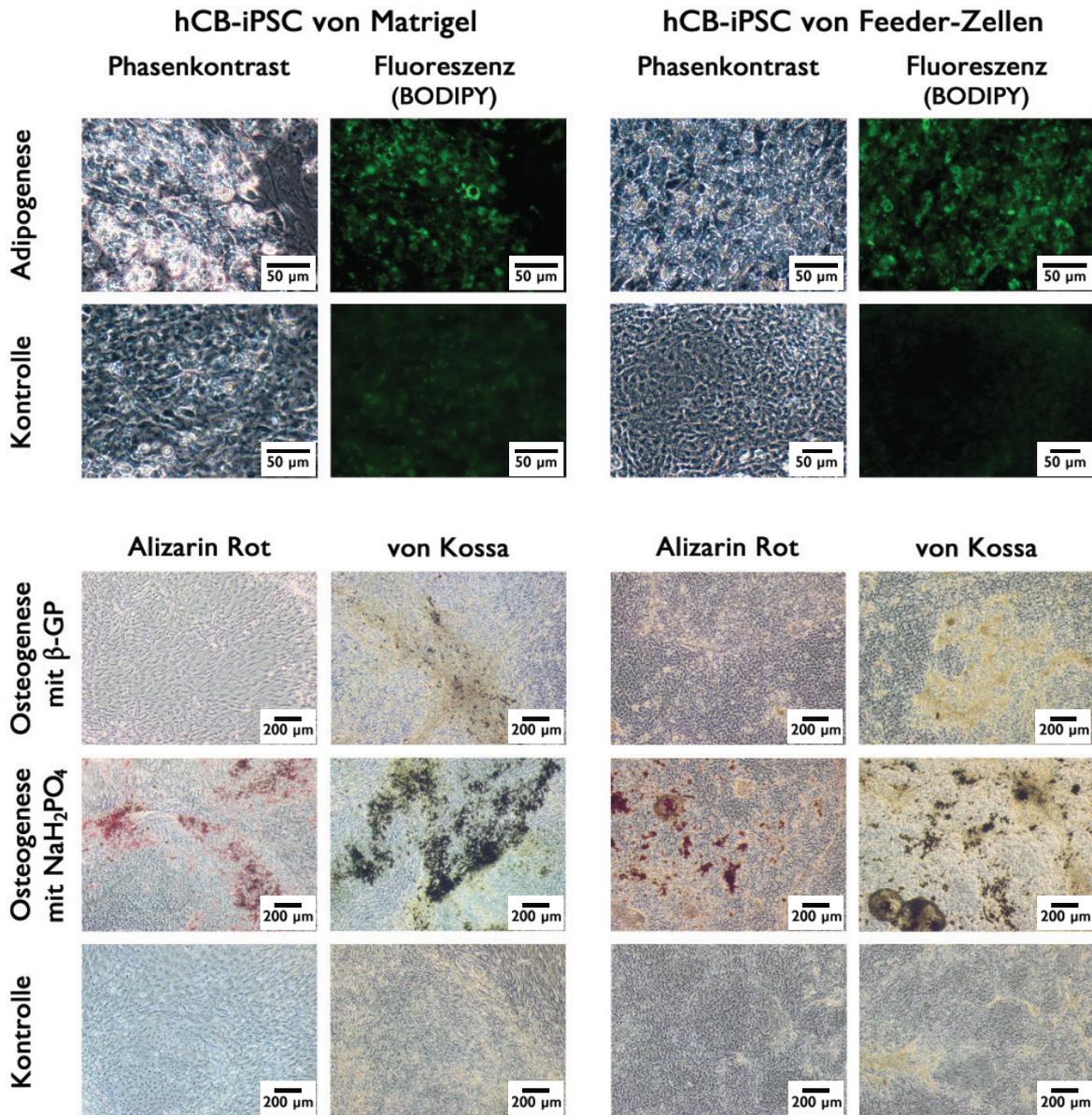


Abbildung 4.4: Darstellung der histologischen Färbungen nach 4 Wochen adipogener (oben) und osteogener (unten) Differenzierung von hCB-iPSC. Die linken zwei Spalten stellen iPSC (Passage 41.0) dar, die zuvor auf Matrigel kultiviert wurden. Die rechten beiden Spalten zeigen entsprechend iPSC (Passage 44.0), die auf Feeder-Zellen kultiviert wurden.

proliferierten die konfluent gewachsenen iPSC weiter und bildeten somit stellenweise mehrere übereinander liegende Schichten aus. Dabei ist auffällig, dass die osteogene Differenzierung ausschließlich in diesen mehrschichtigen Bereichen nachgewiesen werden konnte. In den Kontrollzellen waren ebenfalls Bereiche mit überlagerten Zellen erkennbar, die Färbungen fielen hier aber negativ aus, so dass eine spontane Differenzierung der iPSC zu Osteoblasten ausgeschlossen werden kann. Bei dem Vergleich beider Zellpopulationen (Matrigel, Feeder) hinsichtlich ihres osteogenen Differenzierungspotentials zeigte sich eine etwas fortgeschrittenere Osteogenese bei den Zellen von Matrigel, da hier die gefärbten Bereiche großflächiger und mit einer intensiveren von-Kossa-Färbung

ausgefallen waren als bei den iPSC von Feeder-Zellen. Vermutlich ist dies auf die angesprochene Prädifferenzierung in den Randbereichen von Feeder-freien iPSC-Kulturen zurückzuführen (siehe Abschnitt 4.1.1, Seite 54).

Zusammenfassend konnte somit gezeigt werden, dass induzierte pluripotente Stammzellen, die sowohl auf Matrigel als auch auf Feeder-Zellen kultiviert wurden, in der Lage sind, adipogen und osteogen zu differenzieren. Dabei war das adipogene Differenzierungspotential bei beiden Kulturen vergleichbar und die Osteogenese war etwas ausgeprägter in der Matrigel-Kultur. Letztere ließ sich zudem besser mit NaH_2PO_4 induzieren als mit β -GP. Das mehrschichtige Zellwachstum deutete darauf hin, dass neben den wenigen differenzierten Zellen noch viele undifferenzierte iPSC vorlagen. Histologische Untersuchungen der chondrogen induzierten Zellpellets konnten nicht durchgeführt werden, da die Pellets sich nicht abgerundet und keine feste Struktur ausgebildet hatten.

Untersuchung der differenzierungsspezifischen Genexpression

Zusätzlich zu den histologischen Analysen wurde die mRNA-Expression der induzierten Zellen untersucht und mit den entsprechenden Kontrollzellen verglichen (Abbildung 4.5 und 4.6). Mittels semiquantitativer und quantitativer RT-PCR wurden spezifische Differenzierungsmarker an Tag 0 sowie nach drei- bzw. vierwöchiger Induktion analysiert. Für die Adipogenese waren dies FABP4 (*Fatty acid binding protein 4*), Leptin, LPL (Lipoproteinlipase) und PPAR- γ (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*), für die Osteogenese ALPL, IBSP (*integrin-binding sialoprotein*), Kollagen I α 1, Osteocalcin, Osteopontin und RUNX-2 (*Runt-related transcription factor 2*) und für die Chondrogenese entsprechend Aggrecan, Kollagen II α 1 und SOX9 (*sex determining region Y-box 9*). Die semiquantitativen RT-PCR-Analysen zeigten bei beiden iPSC-Kulturen (Matrigel, Feeder) nur eine sehr schwache Expression der frühen Adipogenese Marker PPAR- γ und LPL.

Abbildung 4.5 zeigt die relativen mRNA-Expressionen der adipogen induzierten Zellen. Auffällig war hierbei, dass diese Marker bereits in den undifferenzierten iPSC exprimiert wurden (schwache Banden an Tag 0). Auch nach dreiwöchiger Kultivierung konnten in den Kontrollzellen noch Expressionen von PPAR- γ und LPL detektiert werden (Matrigel: stark, Feeder: schwach). In den induzierten Zellen hingegen war lediglich eine sehr schwache Bande zu erahnen. Nach einer weiteren Woche (Tag 27/28) war die Expression von LPL und PPAR- γ in den Kontrollzellen weiter zurückgegangen. Die Expression der adipogen induzierten Matrigel-iPSC hatte etwas zugenommen, bei der Feeder-Kultur konnte hingegen keine Zunahme zu Vorwoche festgestellt werden. Alle Nachweise der späten adipogenen Marker Leptin und FABP4 fielen negativ aus.

Typische Genexpressionsmarker der osteogenen und chondrogenen Differenzierung wurden mittels quantitativer RT-PCR analysiert und sind in Abbildung 4.6 dargestellt. Die ermittelten relativen Expressionswerte eines Gens (ΔC_T) wurden jeweils auf den Messwert von Tag 0 normiert ($\Delta\Delta C_T$). In Bezug auf die Osteogenesemarker zeigte sich sowohl bei den induzierten als auch den Kontrollzellen beider iPSC-Kulturen innerhalb der ersten drei Wochen bei vier (ALPL, Osteocalcin, Osteopontin und Runx-2) der insgesamt sechs untersuchten Gene eine deutliche Expressionsverminderung. In der darauffolgenden Woche ging die Expression dieser vier Gene in den meisten induzierten Zellen nochmals geringfügig zurück. Im Gegensatz dazu kann bei der Expression

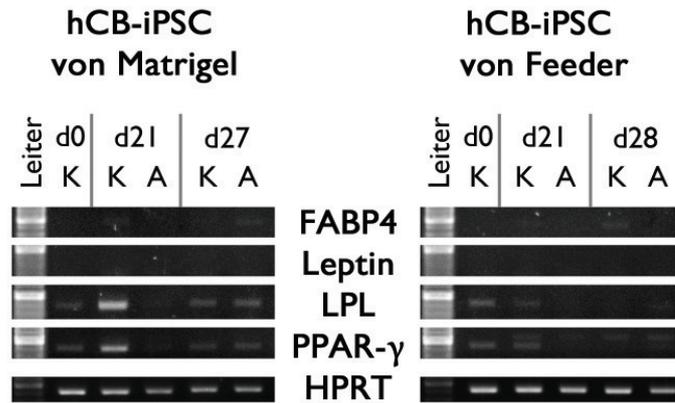


Abbildung 4.5: Darstellung der semiquantitativen RT-PCR-Analysen bei direkter adipogener Differenzierung von hCB-iPSC. Untersucht wurde die relative mRNA-Expression der adipogenen Marker FABP4, Leptin, LPL und PPAR- γ . HPRT diente als interner Standard. Links sind die Ergebnisse der induzierten Matrigel-iPSC (Passage 41.0) und rechts die der Feeder-iPSC (Passage 44.0) dargestellt. Für die cDNA-Synthese wurden random-Primer und als Haushaltsgen wurde HPRT verwendet. d0 = Tag 0/vor Start der Differenzierung, A = Adipogen differenzierte Zellen, K = Kontrollzellen.

von Kollagen I α 1 und IBSP (nur Matrigel) eine Zunahme verzeichnet werden. Kollagen I α 1 stieg jedoch auch in den Kontrollzellen an. Die IBSP-Werte der osteogen induzierten Feeder-iPSC konnten leider nicht bestimmt werden, da die Templatmengen der entsprechenden cDNA scheinbar zu gering waren.

Im Vergleich der unterschiedlichen Phosphatquellen bekräftigten die mRNA-Daten die histologischen Analysen. Sowohl die Matrigel- als auch die Feeder-iPSC, deren Differenzierungsmedium mit NaH₂PO₄ versetzt war, wiesen fast durchgehend höhere Genexpressionswerte auf als jene mit β -GP im Medium. Zwei Ausnahmen bildeten Kollagen I α 1 und Osteopontin nach vierwöchiger Differenzierung der Matrigel-iPSC. In beiden Fällen lagen die Werte der NaH₂PO₄-differenzierten unter denen der β -GP-differenzierten Zellen. Im Falle des Osteopontin befanden sich die Werte allerdings in einem sehr niedrigen Bereich. Das heißt, die $\Delta\Delta C_T$ -Werte unterscheiden sich (auch aufgrund der Auftragung) zwar recht deutlich, die absoluten ΔC_T -Werte hingegen nur um $1,2 \cdot 10^{-6}$, was sehr gering ist. Auch bei Kollagen Typ I ist der absolute Unterschied von $1,1 \cdot 10^{-5}$ noch recht gering.

Anhand der qRT-Daten lässt sich somit eine positive Osteogenese mit NaH₂PO₄-haltigem Differenzierungsmedium in beiden iPSC-Populationen vermuten, vor allem da deren Messwerte meistens über denen der Kontrollen lagen. Die Tatsachen, dass allerdings vier der sechs analysierten Gene (ALPL, Osteocalcin, Osteopontin und Runx-2) in den undifferenzierten iPSC (Tag 0) am höchsten und ein weiteres Gen (Kollagen I α 1) auch nach einer mehrwöchigen Kultivierung noch sehr stark exprimiert wurden, machen eine konkretere Aussage sehr schwierig. Zusammen mit den histologischen Daten war jedoch eine geringfügige Differenzierung zu Osteoblasten mit dem Natriumsalz wahrscheinlich. Dem gegenüber kann eine Differenzierung mit β -GP nicht bestätigt werden. Einerseits fiel die Histologie dieser Zellen maximal schwach positiv für Calcium- und Phosphationen aus und andererseits lagen deren Genexpressionswerte meistens unterhalb der jeweiligen Kontrollen.

Bezüglich der angesprochenen Expressionsabnahme einiger osteogener Marker

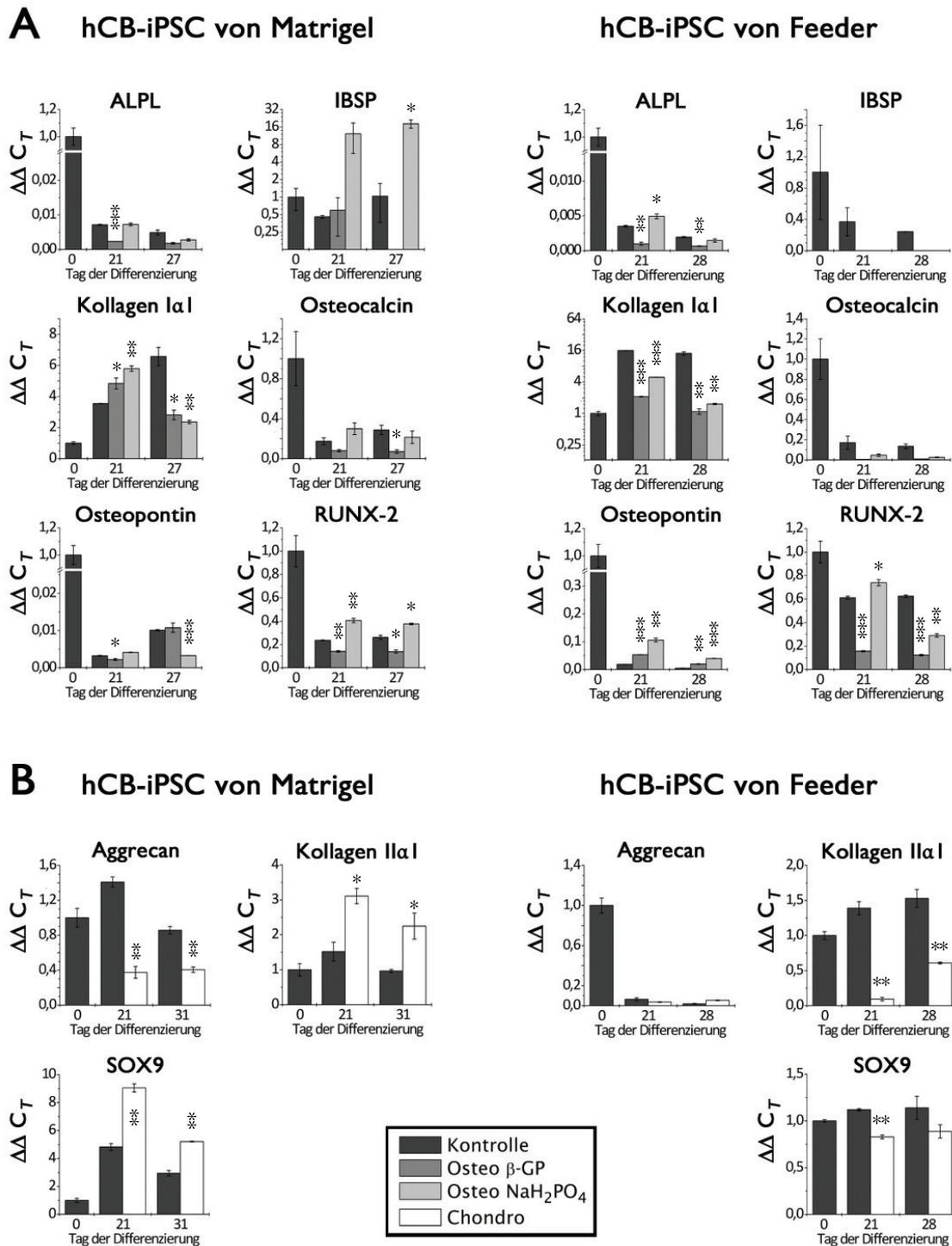


Abbildung 4.6: Darstellung der qRT-PCR-Analysen einiger osteogener und chondrogener Expressionsmarker nach direkter Differenzierung von hCB-iPSC. Links sind die Ergebnisse der Differenzierung von Matrigel-iPSC (Passage 41.0) und rechts die von Feeder-iPSC (Passage 44.0) dargestellt. A: qRT-PCR-Ergebnisse der osteogenen (β -GP und NaH_2PO_4) Differenzierung, normiert auf den Wert der Kontrollzellen an Tag 0; B: qRT-PCR-Ergebnisse der chondrogenen Differenzierung, normiert auf den Wert der Kontrollzellen an Tag 0. Für die cDNA-Synthese wurden random-Primer und als Haushaltsgen wurde 18S-rRNA verwendet. Signifikanzen wurden in Bezug auf die entsprechenden Kontrollen des jeweiligen Tages berechnet. * : $p \leq 0,05$; ** : $p \leq 0,01$; *** : $p \leq 0,001$.

(ALPL, Osteocalcin, Osteopontin, Runx-2) im Laufe der Differenzierung ist bekannt, dass ALPL nicht nur ein Marker für die Osteogenese, sondern auch für die Pluripotenz ist. Entsprechend wird es in iPSC und ESC stark exprimiert. Über eine erhöhte Expression der anderen drei Gene in pluripotenten Zellen gibt es, soweit bekannt, keine Daten. Davon ausgehend, dass ALPL, Osteocalcin, Osteopontin und Runx-2 in pluripotenten Stammzellen erhöht exprimiert werden, lässt die starke Expressionsabnahme einen Verlust des pluripotenten Charakters vermuten. In diesem Fall müssten auch typische Pluripotenz-Marker einen deutlichen Rückgang bei ihrer Genexpression aufweisen. Diese Hypothese wurde im Anschluss überprüft (siehe unten).

Zur Überprüfung der chondrogenen Induktion wurden die Marker Aggrecan, Kollagen II α 1 und SOX9 analysiert. Dabei zeigte sich eine Expressionszunahme von Kollagen II α 1 und SOX9 in den iPSC von Matrigel. In beiden Fällen war der Wert nach dreiwöchiger Induktion (Tag 21) am höchsten. Bei der iPSC-Kultur von Feeder-Zellen kann etwas derartiges nicht beobachtet werden. Hier nehmen die $\Delta\Delta C_T$ -Werte der induzierten Zellen im Laufe der Differenzierung schwach (SOX9) bis stark (Kollagen II α 1) ab und waren immer geringer als die Werte der Kontrollzellen. Das dritte untersuchte Gen Aggrecan zeigte in den induzierten Matrigel-iPSC eine leicht abnehmende Tendenz (Faktor $\approx -2,5$). Die Kontrollwerte sind nach 3 Wochen hingegen leicht erhöht (Faktor $\approx 1,4$) und nach 4 Wochen leicht erniedrigt (Faktor $\approx -1,2$). In der Feeder-Kultur zeigten sowohl die Werte der Kontrollen als auch die der induzierten Zellen zwischen Tag 0 und Tag 21 eine Expressionserniedrigung etwa um den Faktor 20. In der darauffolgenden Woche veränderten sie sich aber nur noch wenig. Dieser Verlauf ähnelte der Expressionsabnahme bei den osteogenen Markern ALPL, Osteocalcin, Osteopontin und Runx-2.

Auf Grundlage dieser Daten ließ sich eine beginnende Chondrogenese lediglich bei den induzierten pluripotenten Stammzellen von Matrigel vermuten. Aufgrund der Tatsache, dass sich die Zellpellets nicht abgerundet hatten und deswegen keine histologischen Färbungen durchgeführt werden konnten, kann die Vermutung nicht endgültig bestätigt werden. Die Genexpressionsdaten der induzierten Feeder-iPSC ließen hingegen keine Chondrogenese vermuten. Dieser Unterschied könnte ebenfalls auf einer möglichen Prädifferenzierung der iPSC zu mesenchymalen Zellen innerhalb Feeder-freier Kulturen beruhen. Dadurch könnte eine Weiterdifferenzierung in die chondrogene Richtung erleichtert worden sein, nicht aber bei den iPSC von Feeder-Zellen.

Untersuchung der Genexpression pluripotenter Marker

Um den vermuteten Verlust des pluripotenten Charakters während der direkten mesodermalen Differenzierung von Matrigel- und Feeder-iPSC zu überprüfen, wurden die Expressionen typischer Pluripotenzmarker vor und nach vierwöchiger Kultivierung mit Induktions- oder Kontrollmedium untersucht. Analysiert wurden die Marker ALPL, CD24, E-Cadherin, LIN28, NANOG, OCT4 und SOX2. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.7 dargestellt.

Im Rahmen des vierwöchigen Experimentes zeigte sich, dass die Genexpressionen aller Pluripotenzmarker in ausnahmslos allen Zellen herunterreguliert wurden. Dies deutete auf einen weitestgehenden Verlust des pluripotenten Charakters hin. Bei den zweidimensional kultivierten Zellen war jedoch auffällig, dass die adipogen induzierten

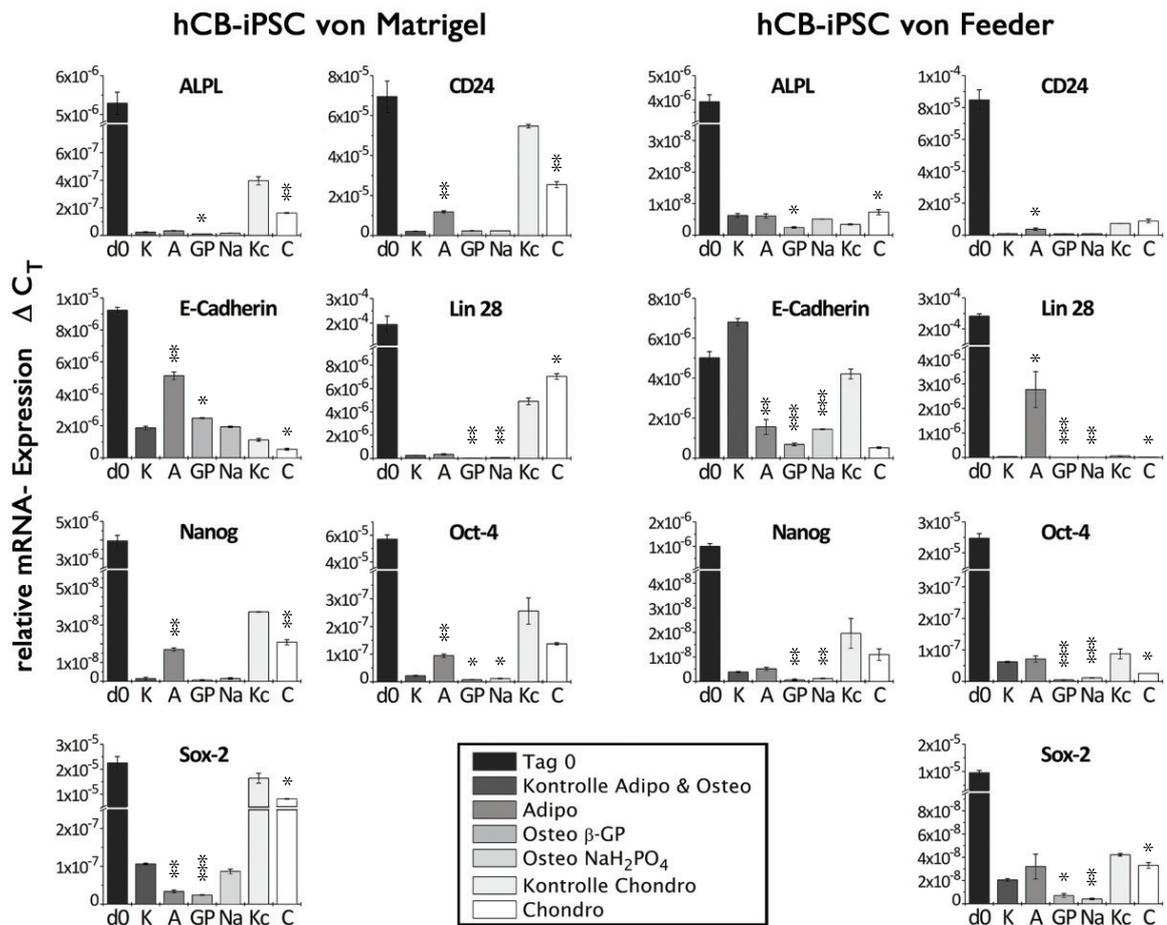


Abbildung 4.7: Darstellung der qRT-PCR-Analysen der Pluripotenzmarker nach vierwöchiger adipogener, osteogener und chondrogener Induktion von hCB-iPSC. Links sind die Ergebnisse der Matrigel-iPSC (Passage 41.0) und rechts die der Feeder-iPSC (Passage 44.0) dargestellt. d0 = Zellen an Tag 0, K = Kontrollzellen (2D) der Adipo- & Osteogenese, A = adipogen differenzierte Zellen, GP = mit β -GP osteogen differenzierte Zellen, Na = mit NaH_2PO_4 osteogen differenzierte Zellen, Kc = Kontrollzellen (3D) der Chondrogenese, C = chondrogen differenzierte Zellen. Für die cDNA-Synthese wurden random-Primer und als Haushaltsgen wurde 18S-rRNA verwendet. Signifikanzen wurden in Bezug auf die entsprechenden Kontrollen des jeweiligen Tages berechnet. * : $p \leq 0,05$; ** : $p \leq 0,01$; *** : $p \leq 0,001$.

Zellen beider iPSC-Kulturen (Matrigel, Feeder) überwiegend eine erhöhte Genexpression gegenüber den anderen Zellen aufwiesen. Lediglich auf SOX2 (Matrigel-iPSC) und E-Cadherin (Feeder-iPSC) traf dies nicht zu. Die dreidimensional als Pellet kultivierten Zellen (chondrogen induziert und Kontrollen) wiesen allerdings häufig eine erhöhte Genexpression gegenüber den 2D-kultivierten Zellen auf. Dabei exprimierten die Zellen in den Kontrollpellets noch bis zu 80 % der Genexpression in den Ausgangszellen (Tag 0), die chondrogen induzierten Pellets exprimierten hingegen maximal ein Drittel. Die vergleichsweise geringe Abnahme der Pluripotenzmarker deutete somit darauf hin, dass in den dreidimensionalen Zellpellets noch deutlich mehr pluripotente Stammzellen vorhanden waren als in den 2D-Kulturen.

4.2 Generierung und Charakterisierung von iPS-MSK mittels EB- und ML-Methode

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Monolayer (ML)- und der Embryoid Body (EB)-Methode im Hinblick auf die Differenzierung von iPSC zu MSC beschrieben. Im ersten Teil steht sowohl der Vergleich der beiden Methoden unter Verwendung von hCB-iPSC als auch die Charakterisierung der generierten iPSC-MSK im Vordergrund. Abschließend wird die Differenzierung von hHSC- und hFF-iPSC näher erläutert. Um einen möglichen Einfluss muriner Feeder-Zellen zu vermeiden, wurden nur iPSC verwendet, die vor der Differenzierung für zwei Passagen auf Matrigel kultiviert worden waren.

4.2.1 Vergleichende Differenzierung von hCB-iPSC zu MSC mittels ML- und EB-Methode und Charakterisierung der iPSC-MSK

Insgesamt wurden 15 Generierungen von hCB-iPSC-MSK unter den Standardbedingungen durchgeführt. Es wurde neunmal die Monolayer und sechsmal die Embryoid Body-Methode angewandt. Tabelle 4.2 gibt einen ersten Überblick über die durchgeführten Experimente und deren Ergebnisse. Eine erste Einschätzung, ob die Differenzierung geglückt war oder nicht, erfolgte anhand morphologischer Aspekte. Für erfolgreich generierte iPSC-MSK mussten die Zellen ansatzweise homogen sein und eine spindelförmige fibroblastoide Struktur aufweisen. Zudem war das Auftreten isolierter Zellen wichtig, um diese von epithelialen, im Verbund wachsenden Zellen zu unterscheiden. Waren nicht alle Kriterien erfüllt, wurde der Versuch als „nicht erfolgreich“ gewertet. Soweit möglich wurden ML- und EB-Differenzierungen parallel mit den gleichen Ausgangszellen durchgeführt. Dies war bei ML6 und EB1, ML7 und EB3, ML8 und EB4 sowie ML9 und EB6 der Fall.

Mittels ML-Methode konnten lediglich zwei (ML1 und ML6) von insgesamt neun Differenzierungen (22 %) erfolgreich beendet werden. In den anderen sieben Fällen waren entweder aufgrund eines plötzlichen Zelltodes nach dem Passagieren keine oder nur wenig proliferierende Zellen wieder angewachsen (ML3, ML4, ML5, ML7) oder es konnte keine homogene MSC-ähnliche Morphologie beobachtet werden (ML2, ML4, ML5, ML8, ML9). In Bezug auf den plötzlichen Zelltod ist bekannt, dass pluripotente Stammzellen in Einzelzellsuspension, wie sie beim Passagieren vorkommt, extrem stressempfindlich sind und apoptotisch darauf reagieren. Daher wurde dem Medium ROCK-Inhibitor (Y-27632) zugegeben, welcher pluripotente Zellen in Suspension stabilisiert [126, 127]. Vorversuche hatten gezeigt, dass bei Passagier-Vorgängen ohne den Kinase-Inhibitor annähernd 100 % der Zellen abgestorben waren, mit dessen Verwendung waren es immer noch 80 bis 90 %. Dieser Zellverlust wurde durch relativ hohe Aussaatdichten kompensiert (vergleiche Tabelle 3.4), welche zum Teil deutlich höher waren als in der Literatur angegeben [80, 90, 128]. Mit zunehmender Passage nahm die Empfindlichkeit der Zellen ab, so dass weniger ROCK Inhibitor zugegeben und geringere Zellzahlen ausgesät wurden. Ab Passage 7 wurde kein ROCK-Inhibitor mehr eingesetzt. Trotzdem kam es in vier Fällen (ML3, ML4, ML5, ML7) zu einer plötzlichen Apoptose, so dass die Differenzierung nicht beendet werden konnte.

Dem gegenüber waren fünf von sechs EB-Experimenten (83 %) erfolgreich iPSC-MSK

Tabelle 4.2: Übersicht der durchgeführten Experimente zur Generierung von iPS-MSK mittels ML- und EB-Methode. Alle Differenzierungen wurden mit hCB-iPSC durchgeführt. Gleiche Ausgangszellen wurden jeweils bei ML6 und EB1, ML7 und EB3, ML8 und EB4 sowie ML9 und EB6 verwendet.

Experiment	Passage der hCB-iPSC	Erfolgreich?	Kommentar
<i>Monolayer-Differenzierungen</i>			
ML1	45.0	Ja	MSC-ähnliche Kultur ab Passage 45.7, morphologische Veränderungen in Passage 45.12
ML2	48.0	Nein	kleine, runde Zellen bis in Passage 48.9, keine MSC-ähnliche Morphologie
ML3	33.0	Nein	plötzlicher Zelltod in Passage 33.5
ML4	41.0	Nein	keine MSC-ähnliche Morphologie, plötzlicher Zelltod in Passage 41.12
ML5	55.0	Nein	plötzlicher Zelltod von einem Großteil der Zellen in Passage 55.7, danach extrem inhomogene Kultur mit wenigen MSC-ähnlichen Zellen
ML6	42.0	Ja	MSC-ähnliche Kultur ab Passage 42.8, morphologische Veränderungen in Passage 42.12
ML7	42.0	Nein	plötzlicher Zelltod in Passage 42.6
ML8	36.0	Nein	kleine runde Zellen bis in Passage 36.8, nur vereinzelt MSC-ähnliche Zellen
ML9	61.0	Nein	ab Passage 6 wenige MSC-ähnliche Zellen, aber sehr inhomogen und ab Passage 61.9 großflächige Zellen
<i>Embryoid Body-Differenzierungen</i>			
EB1	42.0	Ja	Morphologische Veränderungen in Passage 42.7, kleinere Zellen
EB2	46.0	Ja	Morphologische Veränderungen in Passage 46.9, kleinere Zellen
EB3	42.0	Ja	Morphologische Veränderungen in Passage 42.6, breite und flächige Zellen
EB4	36.0	Nein	keine MSC-ähnliche Morphologie
EB5	42.0	Ja	Morphologische Veränderungen in Passage 42.6, breite und flächige Zellen
EB6	61.0	Ja	leicht inhomogene Kultur, morphologische Veränderungen in Passage 61.3, breite und flächige Zellen

generiert werden. Ein plötzlicher Zelltod wurde zu keinem Zeitpunkt beobachtet. Lediglich in Experiment EB4 konnte keine iPS-MSK-Kultur generiert werden.

Morphologische Analysen

Während der Differenzierung von iPSC zu MSC wurden die Zellen regelmäßig am Mikroskop betrachtet und fotografiert. Abbildung 4.8 zeigt noch einmal den schematischen Ablauf beider Methoden sowie Fotos vor (C1), während (C3-4, 6-7) und nach der Differenzierung (C5, 8). Zu Vergleichszwecken ist ein exemplarisches Foto von nativen hBMSC ebenfalls dargestellt (C2).

Während der ML-Differenzierung von iPSC zu MSC wurden die Zellen durchgehend als Monolayer kultiviert. Dabei konnte eine langsame morphologische Veränderung beobachtet werden. Zunächst (Passage 1 bis 4) wuchsen die Zellen nicht mehr in mehrschichtigen Kolonien, sondern in einschichtigen Zellverbänden, welche häufig spitze Ausläufer oder eine Stern-ähnliche Form aufwiesen (Abbildung 4.8, C3). Anschließend konnten immer mehr vereinzelt Zellen registriert werden. Deren Morphologie hat sich von anfänglich klein und rund zu flach und langgestreckt entwickelt und ähnelte damit immer mehr derer von Fibroblasten und mesenchymalen Stammzellen (C4). Wenn die Differenzierung erfolgreich war, konnte ab Passage 7 oder 8 eine annähernd homogene MSC-ähnliche Kultur beobachtet werden (C5). Allerdings wurden auch vereinzelt Zellen mit andersartiger Morphologie beobachtet, so dass keine 100 %ig homogene Kultur generiert wurden. Die Differenzierung dauerte bis zu diesem Zeitpunkt 39 (ML1) bzw. 40 (ML6) Tage. In den meisten Fällen (78 %) war die iPS-MSC-Generierung jedoch nicht erfolgreich.

Für die Differenzierung mittels EB-Methode wurden die iPSC mit einem Zellschaber von der Kulturschalenoberfläche abgelöst. Die dadurch entstandenen Zellhaufen wurden anschließend in eine Petrischale für Suspensionskulturen überführt. Innerhalb des ersten Tages rundeten sich die Zellverbände ab, so dass Embryoid Bodies (EBs) von unterschiedlicher Größe entstanden (Abbildung 4.8, C6). In Suspension konnte, subjektiv wahrgenommen, lediglich eine geringe Vergrößerung der EBs, aber ansonsten keine morphologische Veränderung beobachtet werden. Nach 7 Tagen wurden die EBs in eine gelatinierte Zellkulturflasche überführt und adhärten an den Flaschenboden. Daraufhin wuchsen Zellen aus den EBs heraus, welche bereits eine Fibroblasten-ähnliche Morphologie aufwiesen (C7). Die EBs wurden mechanisch entfernt und nur die herausgewachsenen, am Flaschenboden adhärten Zellen passagiert. Bereits nach dem ersten Passagieren wiesen die meisten Zellen eine spindelförmige Morphologie auf, wie sie für Fibroblasten und mesenchymale Stammzellen typisch ist. Spätestens in Passage 2 (durchschnittlich Tag 21) konnte eine homogene MSC-typische Morphologie beobachtet werden (C8). Der Wechsel zu MSC-Wachstumsmedium in der dritten Passage hatte bei keiner Differenzierung einen Einfluss auf die Morphologie.

Die erfolgreich generierten iPS-MSC beider Methoden (ML und EB) konnten anschließend einige Passagen als stabile Kultur mit fibroblastoider Morphologie kultiviert werden. Nach einer längeren Kultivierung traten allerdings morphologische Veränderungen auf (vergleiche Tabelle 4.2). Teilweise wurden die iPS-MSC wieder deutlich kleiner und eckiger (ML1, ML6, EB1 und EB2). In anderen Kulturen wurden die Zellen, ähnlich zu seneszenten MSC, flächiger und breiter (EB3, EB5 und EB6). Exemplarische Fotos sind in Abbildung 4.9 dargestellt. Dies trat etwa drei bis neun Passagen nach der Entstehung einer annähernd homogenen MSC-ähnlichen Kultur auf. Aus welchem Grund die iPS-MSC weiterdifferenzierten konnte nicht abschließend geklärt werden.

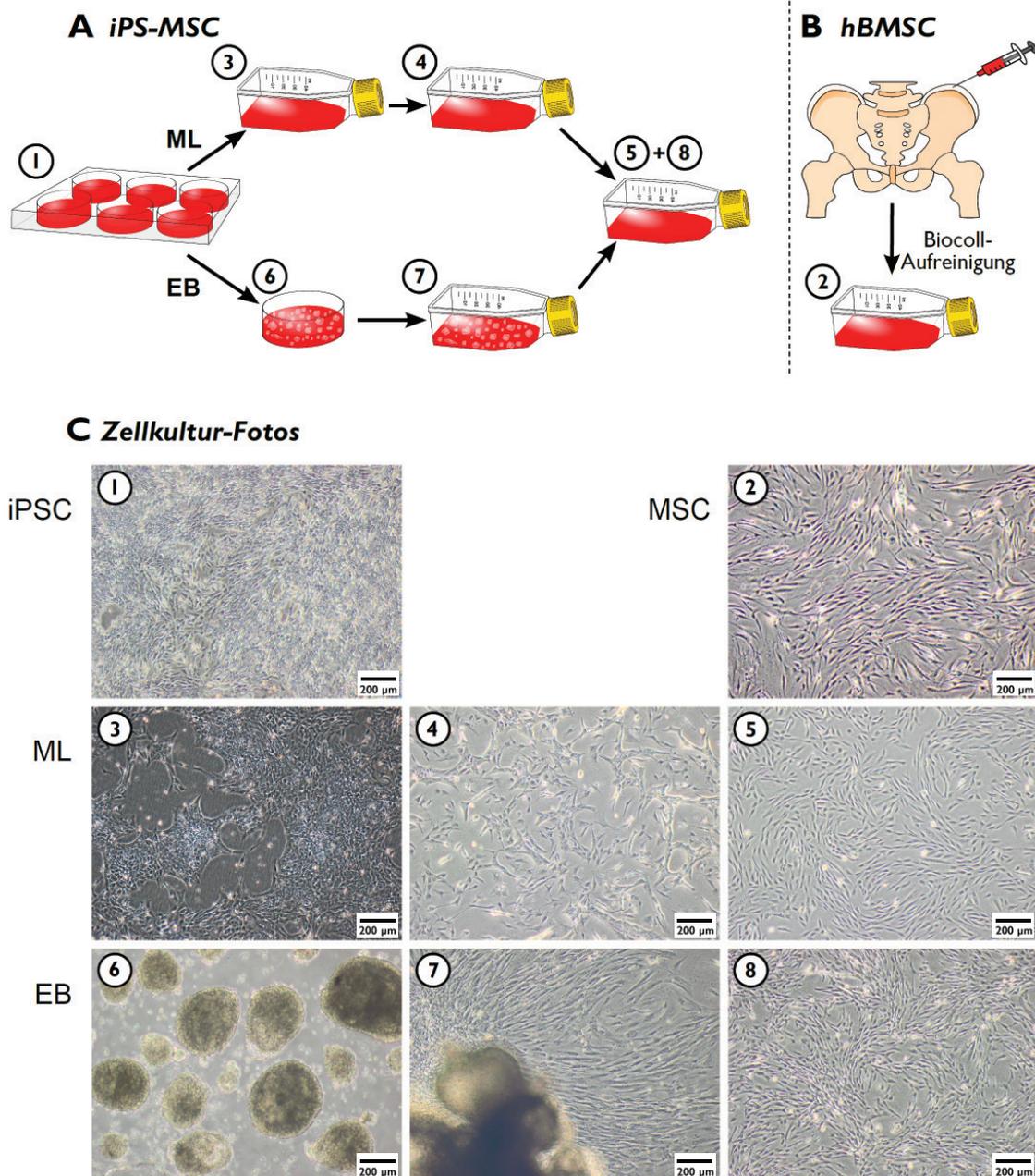


Abbildung 4.8: A: Schematische Darstellung der durchgeführten Monolayer- (oben) und Embryoid Body-Methoden (unten) zur Differenzierung von iPSC zu MSC. B: Schema der hBMSC-Gewinnung. Die Stammzellen wurden dem Spender mittels Beckenkammpunktat entnommen, mit Biocoll aufgereinigt und anschließend plastik-adhärenz kultiviert. C: Zellkulturfotos von iPSC (1), hBMSC (2) sowie während der Generierung von iPSC-MSC (3 - 8). Die Fotos 3 und 4 zeigen iPSC während der ML-Differenzierung in Passage 1 und 5, Foto 5 die Zellen einer erfolgreich generierten iPSC-MSC(ML)-Kultur in Passage 8. Auf Foto 6 sind EBs nach 7-tägiger Suspensionskultur und auf Foto 7 die adhärenzte EBs an Tag 14 dargestellt. Foto 8 zeigt iPSC-MSC(EB) in Passage 2. Die Morphologien beider iPSC-MSC-Kulturen sind mit der der hBMSC vergleichbar.

Durchflusszytometrische Analysen

Die durchflusszytometrischen Analysen wurden grundsätzlich zum Zeitpunkt des Passagierens durchgeführt. Nachdem die Zellen enzymatisch abgelöst waren, wurde die für

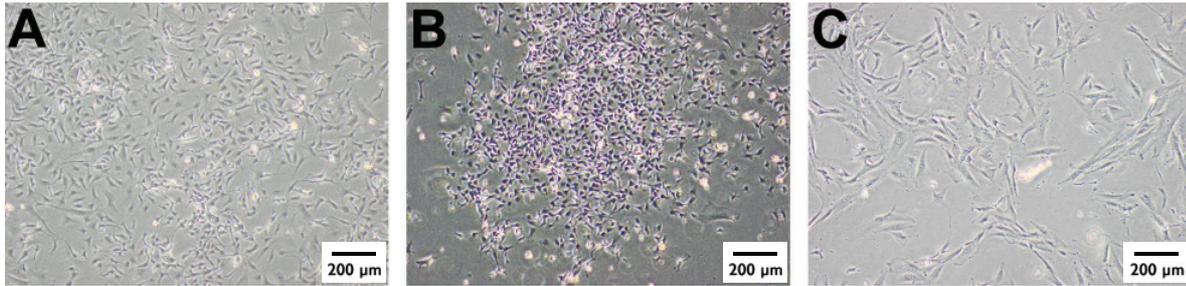


Abbildung 4.9: Exemplarische Fotos der morphologischen Entwicklung von iPS-MSC nach längerer Kultivierung. Es wurden kleine, eckige (A und B, EB1 Passage 7 und ML1 Passage 16) oder breite, flächige Zellen (C, EB5 Passage 6) beobachtet. Messbalken: 200 μm

eine weitere Differenzierung benötigte Zellzahl abgenommen. Die verbliebenen Zellen wurden für die Färbungen mit Antikörpern und entsprechenden Isotypkontrollen verwendet. Die FCM-Analysen hatten die Klärung von zwei Fragestellungen zum Ziel. Zum einen sollte die Veränderungen der Oberflächenantigene im Rahmen der EB- und ML-Differenzierungen analysiert werden. Zum anderen war der Vergleich der Expressionsmuster von undifferenzierten iPSC, generierten iPS-MSC und genuinen hBMSC von Interesse.

Für die Analyse der Oberflächenantigene im Differenzierungsverlauf wurden die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten, wenn möglich aber in den Passagen 0, 3, 5, 7 und 10 (ML-Methode) bzw. 0, 1, 3 und 5 (EB-Methode), durchflusszytometrisch untersucht. Bei der EB-Methode konnten keine bedeutenden zeitlichen Veränderungen beobachtet werden, da die Zellen bereits in der ersten Passage nach der EB-Phase annähernd dem MSC-typischen Expressionsmuster entsprachen (siehe unten). Diese Ergebnisse deckten sich mit den morphologischen Beobachtungen. Lediglich CD24 und SSEA-4 werden auf einem geringen Anteil ($< 20\%$) der iPS-MSC(EB) in Passage 1 exprimiert. Bei der darauffolgenden Messung in Passage 3 waren die Ergebnisse auch für diese beiden Antigene negativ. Eine weitere Veränderung des Expressionsmusters wurde bei iPS-MSC(EB) in höheren Passagen nicht festgestellt.

Während der langsameren ML-Differenzierung war eine direkte Verfolgung der Differenzierung anhand der Oberflächenantigene möglich. Bei den Pluripotenzmarkern CD24, SSEA-3 und -4 und TRA-1-60 zeigte sich, dass sich innerhalb der Kultur zunächst zwei Fraktionen bildeten, eine positive entsprechend den Ausgangszellen und eine schwächer positive oder negative Fraktion. Umgekehrt verhielten sich die mesenchymalen Positivmarkern, welche nicht oder nur schwach auf iPSC exprimiert wurden (CD13, CD44, CD73, CD105, CD146). Zu Beginn der Differenzierung bildete sich eine zweite, positivere Fraktion. Diese nahm mit der Zeit zu, wohingegen die negativere der beiden Fraktionen abnahm. Insgesamt verschob sich das Expressionsmuster der Oberflächenantigene von einem pluripotenten zu einem MSC-ähnlichen Phänotyp. Dieser Befund lässt sich anhand der Präsentation von CD24 und CD105 veranschaulichen. Abbildung 4.10 zeigt die Wolkendiagramme einer ML-Differenzierung (ML5) zwischen Passage 0 und 7, wobei die Fluoreszenzintensitäten von CD24 und CD105 gegeneinander aufgetragen sind.

Im undifferenzierten Zustand exprimieren iPSC CD24 zu annähernd 100 %, aber kein CD105. Anhand der zeitlich aufeinander Analysen zeigte sich, dass zunächst die CD24-Expression reduziert wurde, wodurch doppelt negative Zellen ($\text{CD}24^-/\text{CD}105^-$)

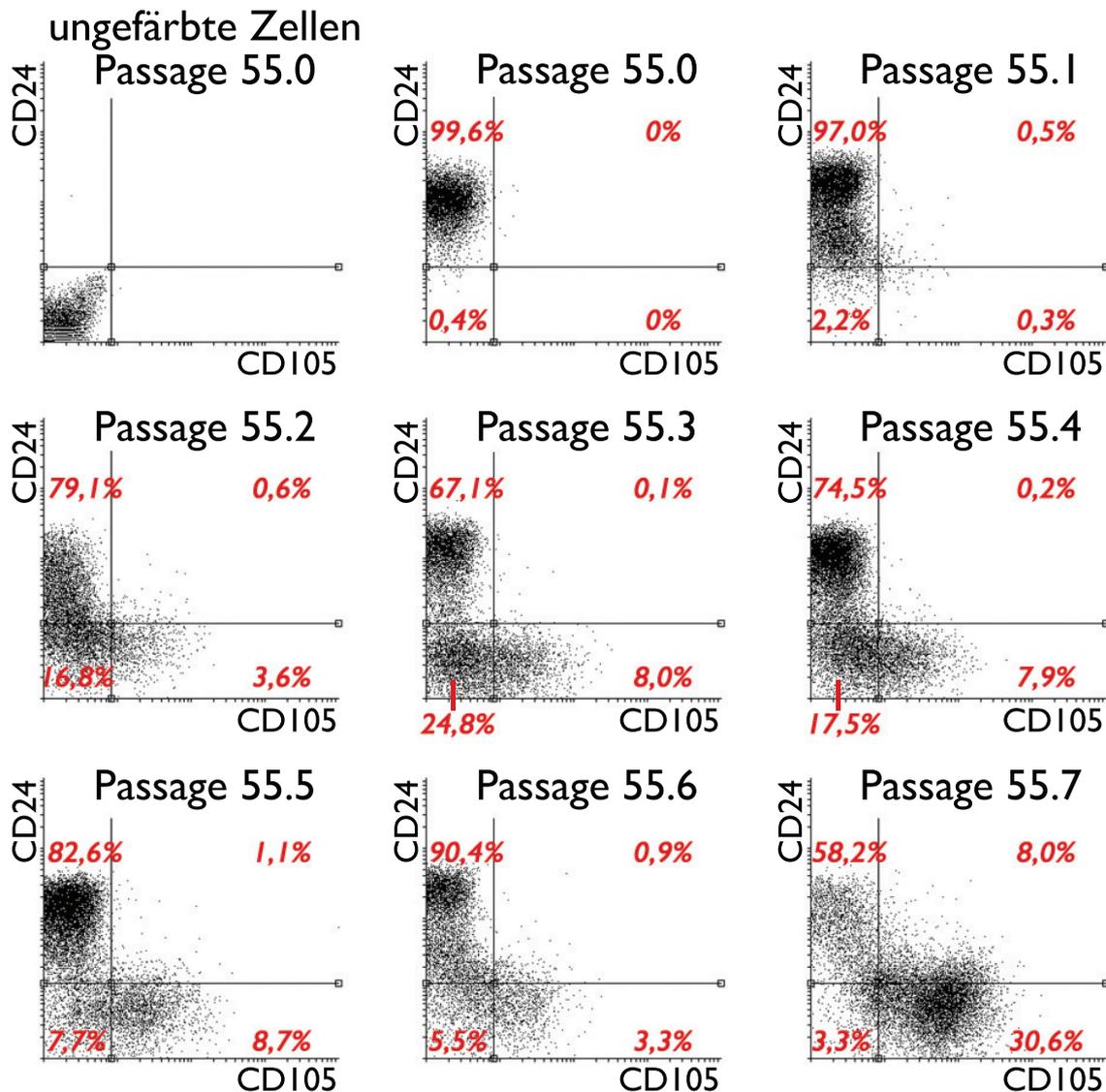


Abbildung 4.10: Dot Plot-Darstellung der Fluoreszenzintensitäten von CD24 und CD105 während der Differenzierung von iPSC zu MSC. Dargestellt sind ungefärbte Zellen (links oben) sowie die gefärbten Zellen zwischen Passage 55.0 und 55.7. Anhand der ungefärbten Zellen in Passage 55.0 wurden die Grenzen der Quadranten gesetzt und für alle weiteren Passagen beibehalten. Die jeweiligen Prozentangaben geben den Anteil der Zellen in dem entsprechenden Quadranten an.

entstanden. Anschließend nahm die CD105-Expression immer mehr zu, so dass die CD24⁻/CD105⁺-Zellen überwogen. Mit zunehmender Passage verschob sich somit das Expressionsmuster von einem pluripotenten CD24⁺/CD105⁻- zu einem mesenchymalen CD24⁻/CD105⁺-Phänotyp. Doppelt positive Zellen (CD24⁺/CD105⁺) traten kaum auf. Die wenigen Zellen im entsprechenden Quadranten Q1 waren entweder Ausreißer der benachbarten einfach positiven Fraktionen in Q2 (CD24⁺/CD105⁻) und Q4 (CD24⁻/CD105⁺) oder Agglomerate aus zwei einfach positiven Zellen. Dies konnte im Rahmen späterer Sortierungsexperimente anhand einer Reanalyse der Zellen aus Q1 ermittelt werden.

Daneben gaben die durchflusszytometrischen Analysen von Experiment ML5 Grund zu der Annahme, dass sich die Differenzierung zwischen Passage 55.3 und 55.6 wieder

rückläufig verhielt (Abbildung 4.10). In der dritten Passage lagen bereits knapp 25 % doppelt negative und 8 % CD105-positive Zellen vor, der Anteil an CD24-positiver Zellen hatte sich auf 67,1 % reduziert. Drei Passagen später betrug der Anteil der CD24⁺/CD105⁻-Fraktion allerdings wieder über 90 %, der der CD24⁻/CD105⁻-Fraktion nur noch 5,5 % und die CD24⁻/CD105⁺ Zellen sind auf 3,3 % zurückgegangen³. Scheinbar ist die Differenzierung von iPSC zu iPS-MSC bis zu einem bestimmten Punkt reversibel. Diese Theorie wird auch von der Tatsache gestützt, dass die Differenzierung nicht erfolgreich abgeschlossen werden konnte, obwohl zwischenzeitlich eine eindeutige Entwicklung von pluripotenten zu mesenchymalen Zellen verzeichnet wurde. In Passage 55.10 wiesen wieder 97 % der Zellen einen CD24⁺/CD105⁻-Phänotyp auf.

Neben der Analyse des Differenzierungsprozesses sollten die Oberflächenantigene von undifferenzierten iPSC, generierten iPS-MSC(EB/ML) und nativen hBMSC miteinander verglichen werden. Abbildung 4.11 zeigt exemplarische Ergebnisse dieser durchflusszytometrischen Analysen. Zum einen sind die Ergebnisse einer hCB-iPSC-Kultur von Feeder-Zellen (Passage 50.0) gezeigt, da diese die Ausgangszellen darstellen. Zum anderen sind exemplarische Histogramme der iPS-MSC aus den Versuchen ML6 und EB5 abgebildet. Für den Vergleich mit nativen MSC sind die Analyse-Ergebnisse einer entsprechenden hBMSC-Population (Passage 3) ebenfalls abgebildet.

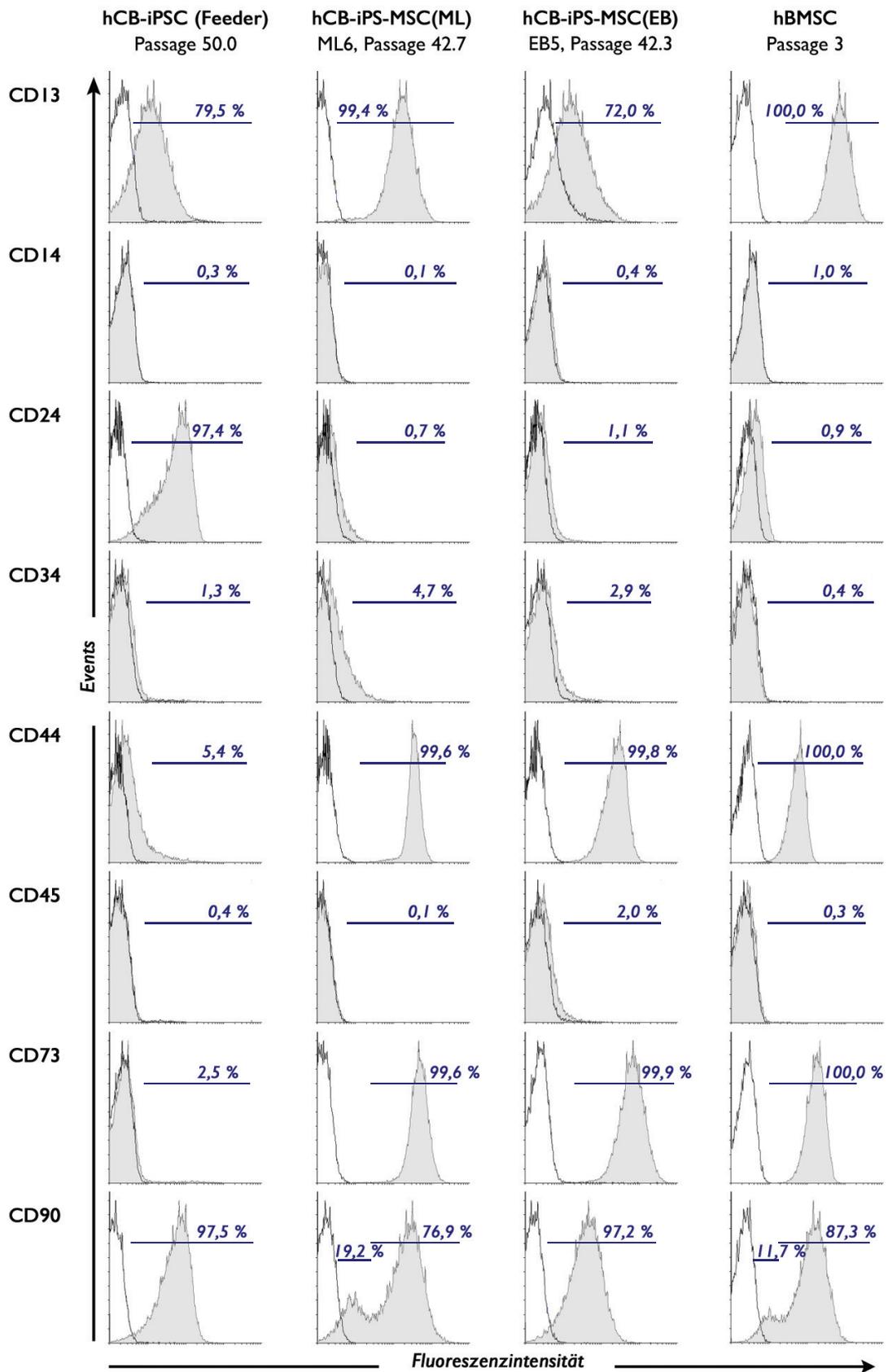
Die durchflusszytometrischen Daten zeigten, dass sich die Expression der Oberflächenmoleküle durch die Differenzierung von einem pluripotenten zu einem MSC-typischen Expressionsmuster verändert hatte. Alle Pluripotenzmarker (CD24, SSEA-3, SSEA-4 und TRA-1-60) wurden vor der Differenzierung stark und danach gar nicht mehr auf der Oberfläche präsentiert. Die analysierten hBMSC exprimierten jedoch SSEA-4, was einen großen Unterschied zu den iPS-MSC darstellt. Dazu ist bereits publiziert, dass SSEA-4 auf mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks, jedoch nicht auf MSC aus anderen Geweben wie z.B. dem Fettgewebe oder der Nabelschnur, exprimiert wird [19, 129]. Somit kann dessen Fehlen bei der Bewertung der generierten iPS-MSC nicht negativ ausgelegt werden.

Ein weiterer Unterschied zwischen genuinen und generierten MSC war, dass CD106 nicht auf der Oberfläche von iPS-MSC präsentiert wird. Zwar gehört dieses Oberflächenantigen nicht zu den Minimalkriterien der International Society for Cellular Therapy für mesenchymale Stammzellen [18], doch wird es häufig als MSC-Marker angesehen. Daneben wurde allerdings auch von MSC ohne CD106-Expression berichtet [21, 90, 130].

Ausgehend von iPSC nahm die Präsentation der anderen positiven MSC-Marker (CD13, CD44, CD73, CD90, CD105, CD147) im Rahmen der Differenzierung zu iPS-MSC zu oder blieb positiv. Die Expressionen der Negativmarker (CD14, CD34, CD45) blieben durchgehend negativ. Dabei hatte die angewandte Differenzierungsmethode (ML oder EB) keinen Einfluss auf das resultierende Expressionsmuster der iPS-MSC. Letzteres entsprach somit mesenchymalen Stammzellen, welche weder SSEA-4 noch CD106 exprimieren.

Daneben konnten sowohl in iPS-MSC(EB)- als auch in iPS-MSC(ML)-Kulturen keine Zellen mit pluripotentem Charakter nachgewiesen werden. Dies ließ vermuten, dass

³Der Eindruck, dass die Prozentangaben nicht mit den Dotplot in Abbildung 4.10 (vor allem in Passage 55.6 und 55.7) übereinstimmen, liegt daran, dass die Fluoreszenzintensitäten zu geringeren Werten verschoben waren und somit einige Datenpunkte nicht mehr dargestellt werden konnten.



Fortsetzung

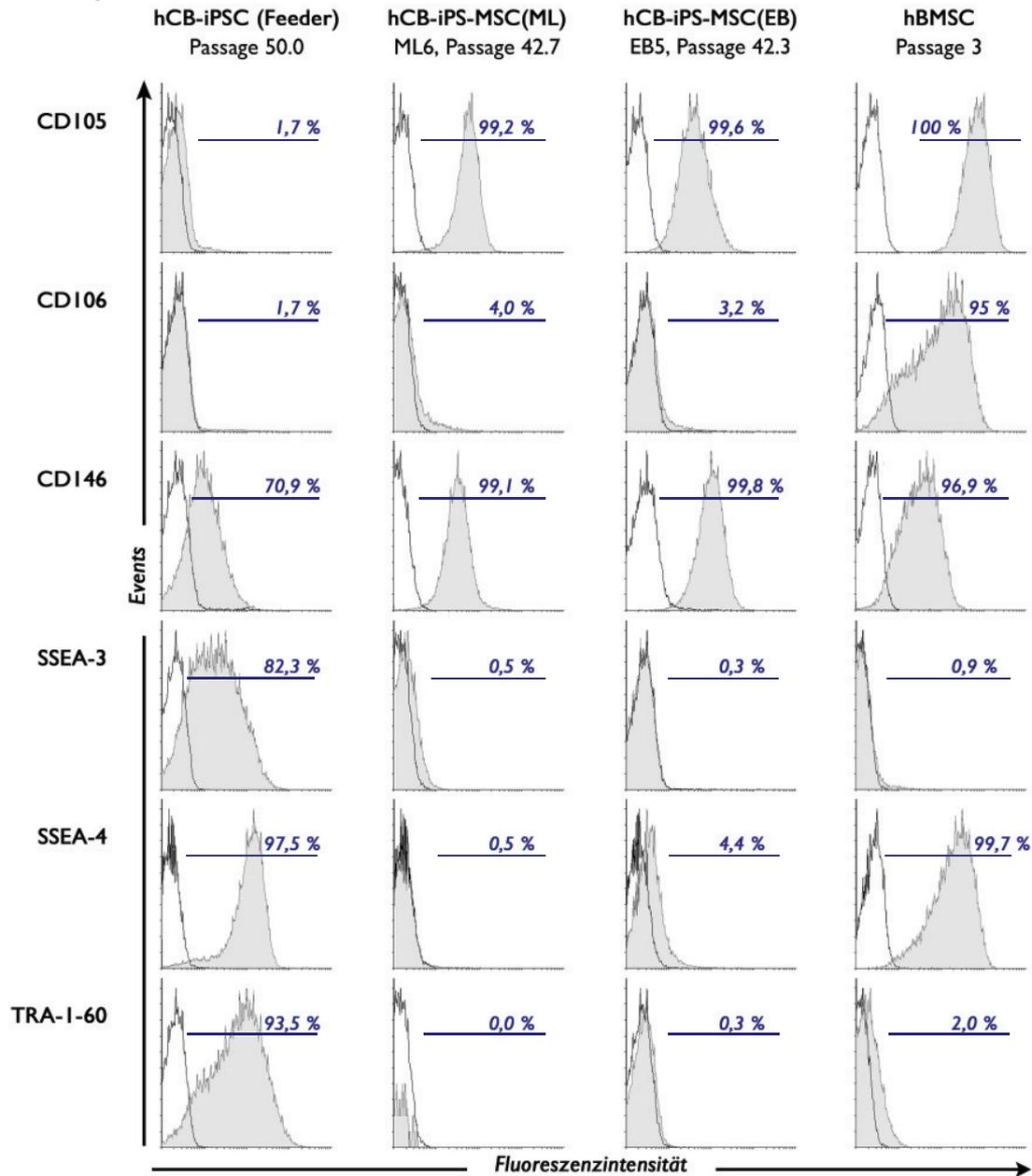


Abbildung 4.11: Exemplarische Histogramme von Pluripotenz- und MSC-assoziierten Oberflächenmarkern. Dargestellt sind undifferenzierte hCB-iPSC von Feeder-Zellen in Passage 50.0, iPS-ML6 in Passage 42.7, iPS-EB5 in Passage 42.3 und hBMSC in Passage 3. Das grau unterlegte Histogramm repräsentiert die mit Antikörpern gefärbten Zellen und das nicht gefüllte Histogramm entsprechend die Kontrollen. Für SSEA-3 dienten ungefärbte Zellen als Referenz, da kein passender Isotypkontroll-Antikörper zur Verfügung stand.

keine größeren Mengen an iPSC mehr in der Kultur vorhanden waren. Die Möglichkeit, dass vereinzelte pluripotente Stammzellen vorlagen, bestand allerdings.

Untersuchung der Genexpression

Für die Analyse der Genexpression auf mRNA-Niveau wurden von den zu differenzierenden Zellen vor annähernd jedem Passagieren eine Probe genommen und analysiert.

Bei diesen Untersuchungen war ebenfalls der Vergleich der erfolgreich generierten iPSC-MSC mit undifferenzierten iPSC sowie isolierten und *in vitro* kultivierten hBMSC von besonderem Interesse. Abbildung 4.12 zeigt zunächst den zeitlichen Verlauf der Genexpression pluripotenter (ALPL, CD24, E-Cadherin, LIN 28, NANOG, OCT4, SOX2), mesenchymaler (CD44, CD73, CD90, CD105, CD146) und EMT-Markergene (TGF- β 3). Exemplarisch für beide Methoden sind die Ergebnisse der EB3- (schwarze Quadrate, gefüllt) und der ML1-Differenzierung (graue Diamanten, leer) dargestellt. Da beide Versuche mit iPSC unterschiedlicher Passage durchgeführt wurden und, wie bereits gezeigt, deren Genexpressionen zum Teil stark variieren konnten, wiesen die Ausgangszellen (Tag 0) zum Teil nicht die gleichen Anfangswerte auf.

Die qRT-PCR-Daten zeigten mit Ausnahme von CD24 bei allen Pluripotenzmarkern der Embryoid Body-Differenzierung zu Beginn (Tag 7, EBs in Suspensionskultur) einen Anstieg des mRNA-Niveaus (Abbildung 4.12). Ähnliche Verläufe zeigten sich auch bei den anderen erfolgreichen EB-Differenzierungen und konnten für ALPL, LIN28, NANOG und SOX2 auch bei der ML-Methode beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Im Anschluss fand bei beiden Methoden eine starke Reduktion aller Pluripotenz-assoziierten Gene statt. Diese stimmte mit den FCM-Analysen überein, welche eine starke Abnahme aller pluripotenten Oberflächenmarker aufwiesen. Einmal herunterregulierte Gene bleiben zudem meist auf dem niedrigen Expressionsniveau. Lediglich ALPL stieg nach Tag 40 der EB-Differenzierung wieder an. Im Vergleich der Differenzierungsmethoden zeigte sich durchgehend, dass die EB-Methode eine schnellere Abnahme der Pluripotenzmarker bewirkte als die ML-Methode. Ab Tag 22, dies entspricht der ersten Passage nach der EB-Phase, lagen die ΔC_T -Werte bereits ein bis zwei Zehnerpotenzen unterhalb des Anfangswertes. Dieses niedrige mRNA-Niveau wurde im weiteren Versuchsverlauf beibehalten (Ausnahme: ALPL). Bei der ML-Differenzierung wurden vergleichbare ΔC_T -Werte erst ab Tag 39 oder 53 verzeichnet. Zeitgleich mit dem Erreichen der niedrigen Expressionsniveaus der Pluripotenzmarker, erreichte TGF- β 3 ein zwischenzeitliches Maximum. Bei der EB-Methode befand sich dieses Maximum am Ende der EB-Phase (EB5) oder zu Beginn der anschließenden Monolayer-Kultur (EB3, EB6), also innerhalb der ersten drei bis vier Wochen. Das TGF- β 3-Maximum trat bei der ML-Differenzierung hingegen erst nach knapp acht Wochen und damit deutlich später vor. TGF- β 3 ist ein typischer EMT-Marker. Sein Maximum deutet, einhergehend mit der Abnahme der Pluripotenz-assoziierten Gene, somit auf eine epithelial-mesenchymale Transition hin. Passend dazu nahmen die Genexpressionen der MSC-Marker mit dem TGF- β 3-Anstieg ebenfalls zu. Von diesen Markern zeigten bis auf CD90 alle Gene (CD44, CD73, CD105, CD146) eine steigende Tendenz. CD90 wies einige Schwankungen auf, eine eindeutige Zu- oder Abnahme konnte aber nicht beobachtet werden. Dies bekräftigte die durchflusszytometrischen Analysen, welche zeigten, dass CD90 auf der Zelloberfläche von undifferenzierten iPSC und generierten iPS-MSC etwa gleich stark präsentiert wurde (vergleiche Abbildung 4.11, Seite 73). Auch das mRNA-Niveau von CD146 wies trotz steigender Tendenz starke Schwankungen auf. CD44, CD73 und CD105 steigen nach Tag 7 (EB-Phase in Suspensionskultur) bis Tag 39 (3. Passage in Monolayer-Kultur) kontinuierlich an. Der etwas stärkere Anstieg zwischen der zweiten und dritten Passage war mit dem Wechsel von iPS-MSC-Medium zu MSC-GM zu begründen.

Die Genexpressionensänderungen der mesenchymalen Positivmarker verliefen, ebenso wie die der Pluripotenzmarker, kongruent zu den präsentierten Oberflächenantigenen.

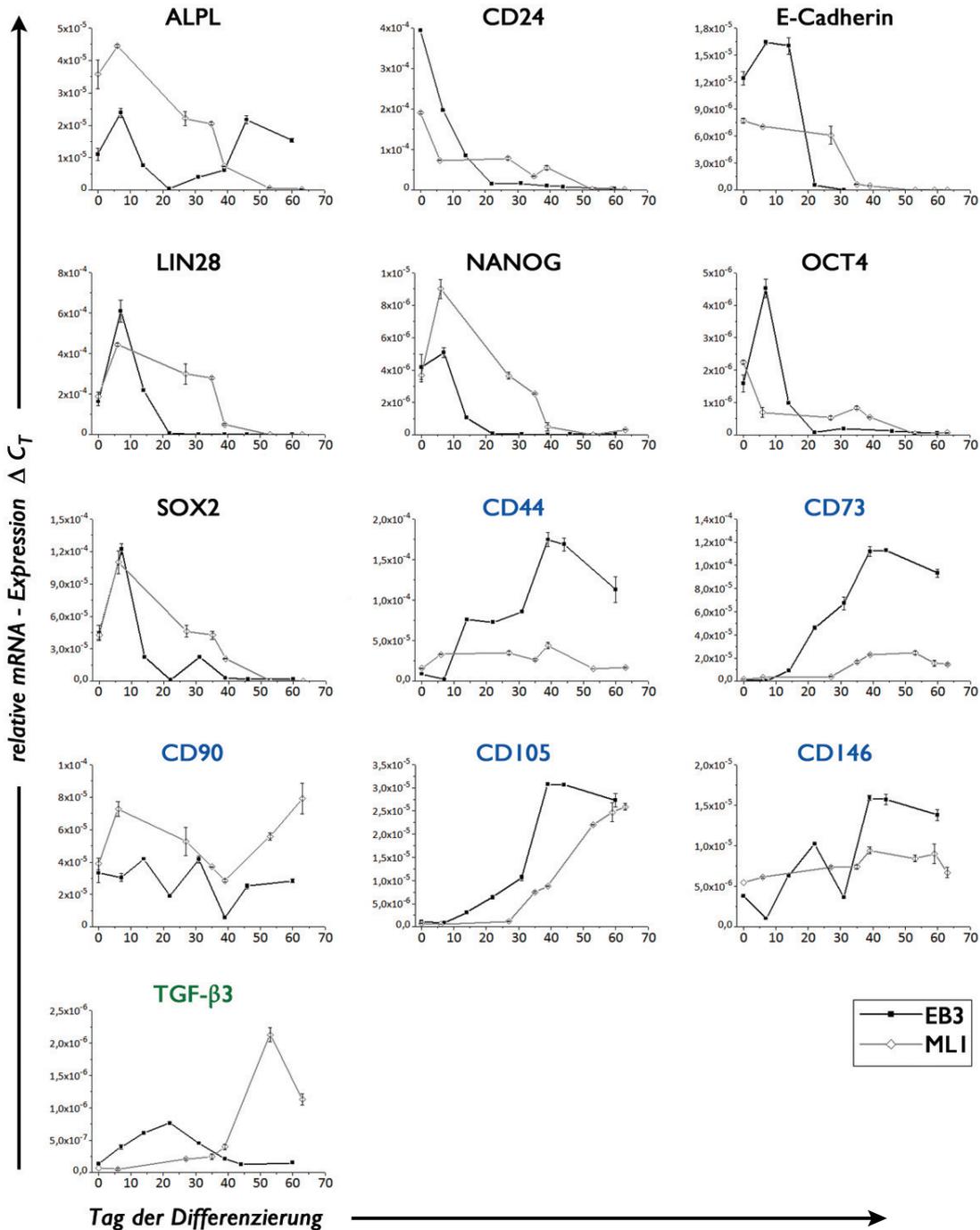


Abbildung 4.12: Darstellung der relativen mRNA-Expressionen typischer Pluripotenz- (schwarze Schrift), MSC- (blaue Schrift) und EMT-Marker (grüne Schrift) während der Monolayer- und EB-Differenzierung. Für die cDNA-Synthese wurden random-Primer und als Haushaltsgen wurde 18S-rRNA verwendet.

Die EB-Differenzierung verlief deutlich schneller und wies häufig eine intensivere Genexpressionssteigerung der MSC-Marker auf als bei der ML-Methode. Zusammen mit den morphologischen Beobachtungen konnte bei der EB-Methode bereits in der ersten Passage nach der EB-Phase von einer erfolgreichen Differenzierung ausgegangen werden. Als mittlere Differenzierungsdauer ergab sich für die EB-Methode 21,2 Tagen (EB1:

21, EB2: 18, EB3: 22, EB5: 26, EB6: 19 Tage) und für die ML-Methode mindestens 37,5 Tagen (ML1: 39, ML6: 36 Tage). Somit dauerte die ML-Differenzierung etwa zwei Wochen länger als die EB-Differenzierung und war mit 22,2 % (zwei von neun erfolgreich) Erfolgsquote deutlich unzuverlässiger als die Differenzierung über eine Embryoid Body-Phase. Diese wies bei den durchgeführten Experimenten eine Erfolgsquote von 83,3 % (fünf von sechs erfolgreich) auf.

Anschließend wurden die generierten hCB-iPS-MSC beider Methoden mit aus Knochenmark isolierten MSC verglichen. Abbildung 4.13 zeigt die Ergebnisse dieser quantitativen mRNA-Analysen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus allen erfolgreich generierten iPS-MSC (ML: $n = 2$, EB: $n = 5$) im Vergleich zu undifferenzierten hCB-iPSC ($n = 5$) und hBMSC ($n = 6$). Für eine bessere Vergleichbarkeit sind die mittleren ΔC_T -Werte der Pluripotenzmarker auf den jeweiligen Wert der pluripotenten Stammzellen und die der MSC-Marker auf den Wert der mesenchymalen Stammzellen normiert.

Einhergehend mit beiden Differenzierungsmethoden fand eine starke Abnahme der Pluripotenz-assoziierten Gene (ALPL, CD24, E-Cadherin, LIN28, NANOG, OCT4, SOX2) statt, so dass schließlich mRNA-Genexpressionsniveaus erreicht wurden, die mit denen der hBMSC vergleichbar waren. Entsprechend wurden auch in Bezug auf die mesenchymalen Marker CD44, CD73 und CD90 in iPS-MSC und hBMSC vergleichbare mRNA-Niveaus gemessen. CD44 und CD73 wurden nach der EB-Differenzierungen und CD90 nach der ML-Differenzierungen sogar in den jeweiligen iPS-MSC geringfügig höher exprimiert als in hBMSC ($\Delta\Delta C_T < 2,5$). Die CD146-Expressionswerte der iPS-MSC überstiegen zudem die Werte der hBMSC um das fünf- (ML) bzw. sechsfache (EB). Die hBMSC-Werte von CD105 wurden hingegen von keiner der beiden iPS-MSC-Kulturen erreicht ($\Delta\Delta C_T < 0,25$). Jedoch hatten weder das erhöhte noch das verminderte mRNA-Niveau einen Einfluss auf die Präsentation der Oberflächenantigene. In allen mesenchymalen Populationen wurden annähernd 100 % CD105- und CD146-positive Zellen detektiert (vergleiche Abbildung 4.11, Seite 74). Die erhöhte (CD146) bzw. verminderte (CD105) Genexpression zeigte sich lediglich darin, dass iPS-MSC das CD146-Protein minimal stärker und das CD105-Protein etwas weniger präsentierten als hBMSC.

Zusammenfassend haben die qRT-Daten gezeigt, dass sowohl mittels EB- als auch ML-Differenzierung von iPSC Kulturen mit einer MSC-ähnlichen Genexpression generiert werden können.

4.2.1.1 Microarray-Analysen

Es wurden Microarray-Analysen von beiden Differenzierungsmethoden durchgeführt, wobei mRNA-Proben aus den Experimenten ML1 (Monolayer-Methode) und EB3 (Embryoid Body-Methode) eingesetzt wurden. Bei der angewandten Dual-Color-Methode wurden immer zwei Proben miteinander verglichen, indem sie mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und anschließend auf den gleichen Array hybridisiert wurden.

Für eine nähere Analyse des Differenzierungsprozesses wurden schließlich von der ML-Methode mRNA-Proben aus drei unterschiedlichen Passagen gewählt: Passage 45.7, welche in diesem Experiment die erste Passage mit MSC-Charakter darstellte, sowie Passage 45.10 und 45.14 als spätere Zeitpunkte. Bei der EB-Methode wurden entspre-

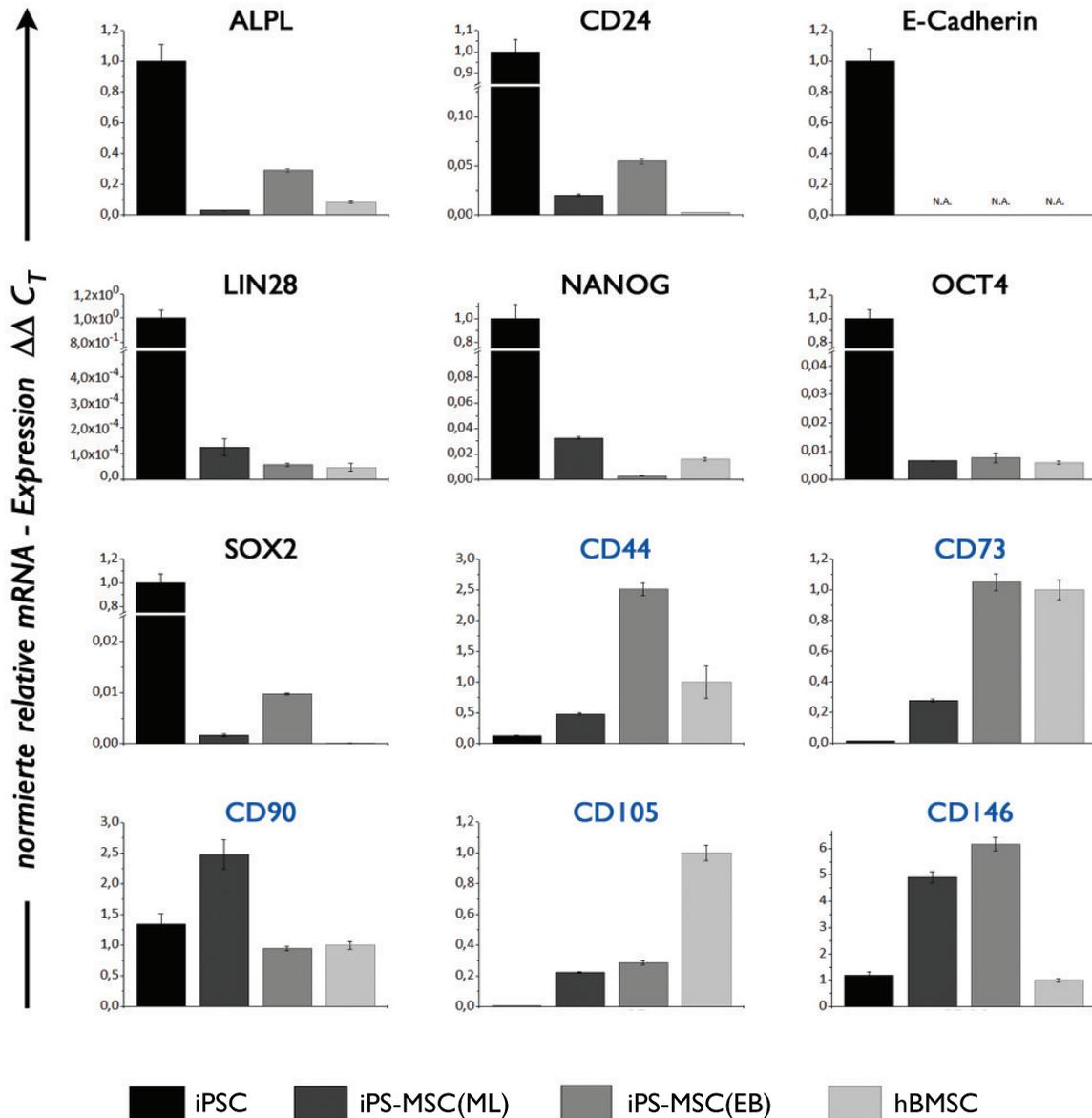


Abbildung 4.13: Vergleichende Darstellung der mittleren Genexpressionswerte von hCB-iPSC ($n = 5$), hCB-iPS-MSC, die mittels ML- ($n = 2$) und EB-Methode ($n = 5$) generiert wurden sowie nativen hBMSC ($n = 6$). Die typischen Pluripotenz-Marker (schwarze Schrift) wurden auf den Mittelwert der iPSC, die MSC-Marker (blaue Schrift) entsprechend auf den Mittelwert der hBMSC normiert. Für die cDNA-Synthese wurden random-Primer und als Haushaltgen wurde 18S-rRNA verwendet.

chend zwei mRNA-Proben aus den Passagen 42.1 (erste Passage mit MSC-typischen Eigenschaften) und 42.3 (späterer Zeitpunkt) ausgewählt. Diese Proben wurden jeweils mit denen der entsprechenden Ausgangszellen (Passage 45.0 (ML) bzw. 42.0 (EB)) verglichen. Dazu wurden die Proben der undifferenzierten iPSC mit einem grünen, alle anderen mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff markiert. Für die Messungen wurden die Proben aus Passage 45.7, 45.10 und 45.14 jeweils zusammen mit der Probe aus Passage 45.0 auf einen Dual-Color-Chip hybridisiert. Entsprechende Kombinationen wurden aus den Proben 42.1 und 42.3 mit 42.0 gebildet. Die erhaltenen Genexpressionsänderungen entsprachen dem Verhältnis der differenzierten zu undifferenzierten iPSC. Die Ergeb-

nisse sind in Abbildung 4.14 dargestellt. Hierbei stellt der rote Bereich positive Werte und damit eine Induktion der entsprechenden Gene (bezogen auf Passage 0) dar, der grüne Bereich steht für negative Werte bzw. eine Inhibierung.

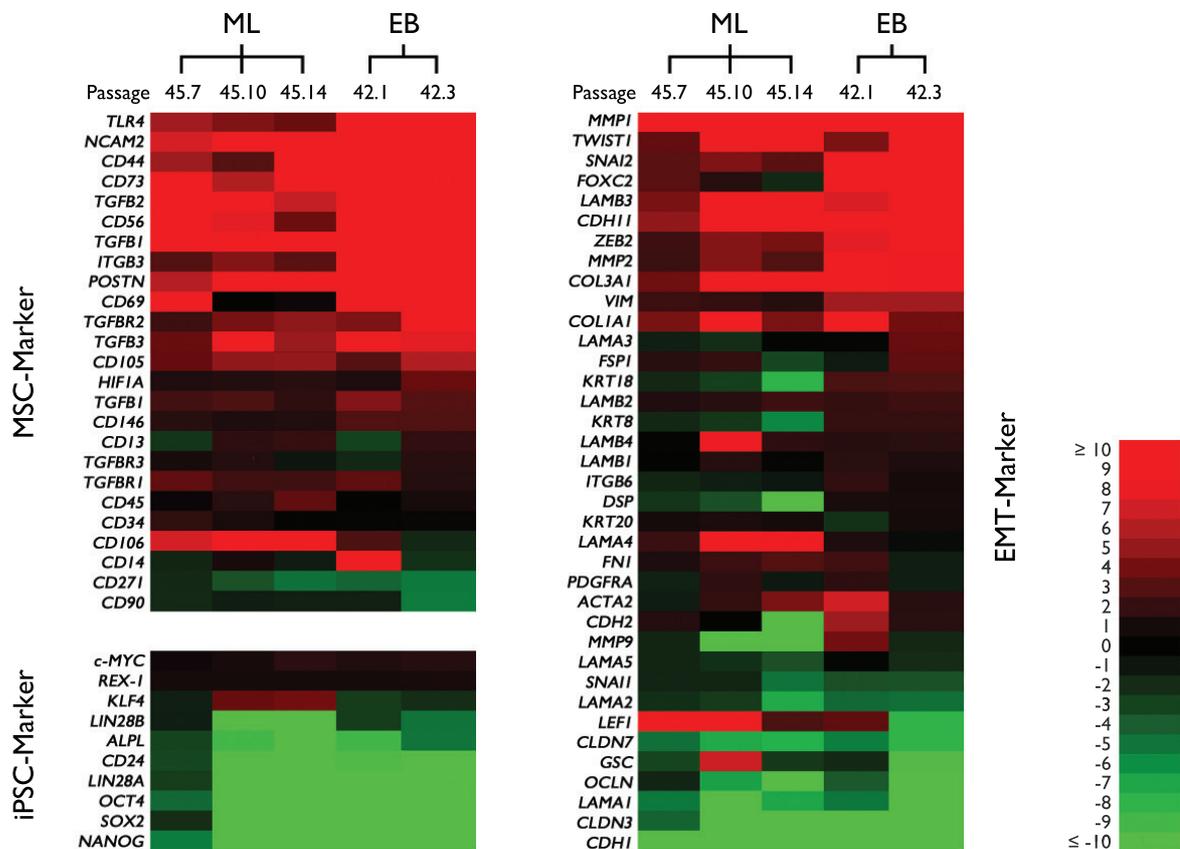


Abbildung 4.14: Darstellung der Ergebnisse der Microarray-Analysen als Heatmap. Es wird deutlich, dass während der ML- und EB-Differenzierung von iPS zu MSC typische MSC-assoziierte Gene (links oben) herauf- und Pluripotenz-assoziierte Gene (links unten) herunterreguliert werden. Zudem entsprechen die Genexpressionsänderungen häufiger EMT-Marker einer Transition von epithelialen zu mesenchymalen Zellen (rechts). Die rote Bereiche stellen positive Werte und damit eine Induktion der entsprechenden Gene (bezogen auf Passage 0) dar, die grünen Bereiche stehen für negative Werte bzw. eine Inhibierung.

Anhand der Microarray-Analysen zeigte sich, dass sowohl bei der ML-Methode (Abbildung 4.14, linke drei Spalten) als auch der EB-Methode (rechte zwei Spalten) die Expressionen typischer MSC-Marker deutlich erhöht und die der Pluripotenz-Marker deutlich verringert wurden. Bei dem Vergleich der beiden frühestmöglichen iPS-MSC-Proben (Passagen 45.7 und 42.1) fiel auf, dass die iPS-MSC der EB-Differenzierung deutlich stärkere Veränderungen aufwies als die der ML-Differenzierung. IPS-MSC(ML) wiesen erst zu späteren Zeitpunkten (Passage 10 oder 14) derartig starke Genexpressionsänderungen auf. Bezüglich der MSC-Markergene blieben sogar einige ML-Werte (TLR4, TGF- β 2 und 3, CD56, ITGB2, CD69, CD105) der späten Zeitpunkte hinter den Werten der EB-Differenzierung zurück. Dies stützt noch einmal die vorherigen Ergebnisse, welche zeigten, dass mit der EB-Methode sowohl schneller als auch qualitativ bessere iPS-MSC generiert werden konnten als mit der ML-Methode. Die Expression der meisten Pluripotenz-assoziierten Gene nahm unabhängig von der angewandten Methode stark ab. Die Zellen der ML-Differenzierung wiesen allerdings erst in einer späteren

Passage (Passage 45.10) eine deutliche Reduktion der Genexpression (Werte < -5) auf C-MYC und REX1 zeigten jedoch keine und KLF4 nur geringe Veränderungen.

Die iPS-MSC, die mittels ML-Methode generiert wurden, wiesen in Passage 45.12 morphologischer Veränderungen auf (vergleiche Tabelle 4.2, Seite 67). Eine Differenzierung zurück zu iPSC hätte im Rahmen der Microarray-Analysen Werte im Bereich von 1,0 bedeutet (schwarzer Bereich in Abbildung 4.14). Dies war jedoch nicht der Fall. Sowohl in der Probe vor der Morphologieänderung (Passage 45.10) als auch in der Probe danach (Passage 45.14) wurden deutliche Genexpressionsunterschiede zu den undifferenzierten Ausgangszellen (Passage 45.0) detektiert. Somit konnte eine Rückentwicklung zu iPSC ausgeschlossen werden. Wahrscheinlicher war, dass sich die Zellen weiter in mesenchymale Richtung entwickelt haben. Dafür würden auch die weiteren Expressionssteigerungen der Markergene CD44, CD45 und CD73 zwischen Passage 45.10 und 45.14 sprechen.

Neben Entwicklungen der mesenchymalen und pluripotenten Marker konnten bei beiden Differenzierungsmethoden EMT-typische Genexpressionsänderungen festgestellt werden (vergleiche Tabelle 1.1, Seite 15). So wurden z.B. CDH11, Kollagen 1 α 1, Kollagen 3 α 1, FOXC2, MMP2, SNAI2/Slug, Twist, Vimentin und ZEB2 deutlich hochreguliert. Auch hierbei fielen die Expressionssteigerungen einiger Marker (SNAI2, FOXC2, ZEB2, MMP2) in der ersten Passage der EB-Differenzierung bereits stärker aus als in den späteren Passagen der ML-Methode. Zudem zeigte sich im Vergleich beider Differenzierungsmethoden insgesamt eine stärkere Regulation der EB-differenzierten Zellen. Die Herunterregulation fiel besonders deutlich bei den Genen Claudin 3 und 7 (CLDN3/7), Occludin (OCLN), Laminin α 1 (LAMA1) und E-Cadherin (CDH1) aus. Besonders auffällig bei den EMT-assoziierten Genen waren die Genexpressionen der Keratine 8 und 18 (KRT8/18) sowie des interzellulären Verbindungsproteins Desmoplakin (DSP). Diese Gene werden normalerweise bei einer EMT herunterreguliert. Dies war bei den iPS-MSC(ML) zu beobachten, während der EB-Differenzierung wurden sie jedoch heraufreguliert. Möglicherweise wird die Suppression von DSP, KRT8 und 18 nur langsam und erst bei separiert wachsenden Zellen induziert. Dies wäre bei der ML-Methode gegeben. Bei der EB-Methode findet die Differenzierung jedoch innerhalb der EBs statt, wo zwangsläufig viele und enge Zell-Zell-Kontakte vorliegen. Da die iPS-MSC(EB) zum Zeitpunkt der Microarray-Analysen lediglich eine bzw. drei Passagen als Monolayer-Kultur kultiviert wurden, blieb eine Herunterregulation der angesprochenen Gene möglicherweise bis dahin aus. Eine Suppression während der folgenden Passagen wäre somit denkbar.

Die Microarray-Daten wurden zusätzlich mit Hilfe des Programms *Ingenuity Pathways Analysis* in Bezug auf regulierte Signalwege und mögliche Indikatoren untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Differenzierung von induzierten pluripotenten zu mesenchymalen Stammzellen unter Einfluss von Östrogenen sowie TGF- β 1 stattgefunden haben könnte. In Bezug auf Östrogene ist bekannt, dass 17 β -Estradiol eine EMT in Krebszellen induzieren kann [131, 132]. Ebenso konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass TGF- β 1 zu jenen Wachstumsfaktoren gehört, die ebenfalls eine EMT auslösen können [133–135]. Um zu überprüfen, ob die Verwendung von 17 β -Estradiol oder TGF- β 1 zu einer Beschleunigung des Differenzierungsprozesses oder zu einem verbesserten Resultat führen können, wurden im Anschluss an die Microarray-Analysen entsprechende iPS-MSC-Generierungen durchgeführt. Die Ergebnisse zu diesen Expe-

rimenten sind in Abschnitte 4.4.3 und 4.4.4 ab Seite 97 dargestellt.

4.2.2 Generierung und Charakterisierung von hFF- und hHSC-iPS-MSC

Die zuvor beschriebenen Generierungen von iPS-MSC wurden ausschließlich mit hCB-iPSC durchgeführt. Ausgehend davon wurden die Differenzierungen anschließend mit hHSC- und hFF-iPSC wiederholt. Tabelle 4.3 gibt einen Überblick über diese Experimente. Aufgrund der besseren Erfolgsquote und der schnelleren Differenzierung wurde

Tabelle 4.3: Übersicht der durchgeführten Experimente zur Generierung von iPS-MSC mittels ML- und EB-Methode.

Experiment	Ursprung der iPSC	Passage der iPSC	Erfolgreich?	Kommentar
EB7	hHSC	29.0	Ja	Kultur konnte bis Passage 29.20 kultiviert werden, wurden mit der Zeit aber etwas flächiger
EB8	hHSC	47.0	Ja	inhomogene Kultur mit wenig MSC-ähnlichen Zellen ab Passage 47.6
EB9	hFF	41.0	Ja/Nein	rhythmisch kontrahierende (Herzmuskel-)Zellen/EBs zwischen Tag 7 und 14 der EB-Phase; sehr inhomogene und langsam proliferierende Kultur sowie flächige Zellen ab Passage 41.6
ML10	hHSC	47.0	Nein	nach anfänglicher Differenzierung wuchsen Zellen in Passage 47.6 wieder in iPSC-typischen Kolonien/Klonen; plötzlicher Zelltod in Passage 47.7

zunächst nur die EB-Methode angewandt. Die erste generierte hHSC-iPS-MSC-Kultur wies direkt sehr gute Ergebnisse auf. Die Kultur konnte nach der EB-Phase über 20 Passagen kultiviert werden, was einzigartig für alle durchgeführten Differenzierungsexperimente war. Neben den extrem guten proliferativen Eigenschaften konnte zudem keine Weiterdifferenzierung oder ausgeprägte morphologische Veränderung beobachtet werden. Die Zellen wurden lediglich, vermutlich Seneszenz-bedingt, mit der Zeit geringfügig breiter und flächiger. Basierend auf diesen vielversprechenden Ergebnissen wurden in einem weiteren Experiment hHSC-iPSC parallel mittels ML- und EB-Methode differenziert. Die Differenzierung über Embryoid Bodies war wiederum erfolgreich, wobei diese Population nicht so lange stabil blieb wie die vorherige hHSC-iPS-MSC-Kultur. Bei der parallel durchgeführten ML-Differenzierung konnten jedoch keine iPS-MSC generiert werden.

Die mesenchymale Differenzierung von hFF-iPSC war nicht erfolgreich. Zum einen wurden in der EB-Phase zwischen Tag 7 und 14 (Phase der adhärennten EBs) rhythmisch

kontrahierende Zellen beobachtet. Diese erinnerten sehr stark an Herzmuskelzellen, zumal sich der Impuls von einem EB über am Gefäßboden adhärenzte Zellen zum nächsten EB fortsetzte. Vor dem ersten Passagieren wurde versucht, die EBs noch gründlicher als ohnehin schon zu entfernen. Trotz sorgfältigem Entfernen der EB war die erhaltene Kultur sehr inhomogen, obwohl einige MSC-ähnliche Zellen beobachtet wurden. Da die kontrahierenden EBs auch in einem weiteren Differenzierungsexperiment ohne Wachstumsfaktoren beobachtet wurden (Abschnitt 4.4.2, Seite 96), wurden mit dieser iPSC-Population keine weiteren Differenzierungen durchgeführt.

Die FCM- und mRNA-Analysen der Experimente mit hHSC- und hFF-iPSC wurden analog zu den Differenzierungen von hCB-iPSC durchgeführt. Die Ergebnisse der erfolgreich generierten iPS-MSC-Kulturen sind vergleichbar mit den hCB-Differenzierungen (Daten nicht gezeigt). Bei der EB-Methode wurden durchflusszytometrisch in der ersten Passage nach der EB-Phase noch wenige (< 20 %) CD24- und SSEA-4-positive Zellen detektiert. Zwei Passagen später entsprachen die hHSC-iPS-MSC aber – mit den Ausnahmen von CD106 und SSEA-4 – dem MSC-Phänotyp. Von der hFF-iPS-MSC-Kultur konnten aufgrund mangelnder Zellzahlen nach Passage 41.1 keine weiteren FCM-Messungen durchgeführt werden. Auch im Rahmen der quantitativen mRNA-Analysen wiesen die hHSC- und hFF-iPS-MSC erhöhte CD24- und CD146- sowie verminderte CD105-Expressionen auf (Daten nicht gezeigt). Vergleichbares wurde auch bei hCB-iPS-MSC beobachtet (vergleiche Abbildung 4.13, Seite 78). Die deutlich schlechtere Differenzierung von hFF-iPSC spiegelte sich in einer deutlich geringeren Genexpression von CD90 wider, diese war zwei Zehnerpotenzen geringer als bei hBMSC. Die CD90-Expression der hHSC-iPS-MSC-Kultur entsprach dem MSC-Niveau, jedoch wiesen diese Zellen im Schnitt eine 100-fach höhere LIN28-Expression auf. Von diesen Ausnahmen abgesehen besaßen die generierten hHSC- und hFF-iPS-MSC auf mRNA- und Proteinebene einen den hCB-iPS-MSC sowie den hBMSC vergleichbaren Phänotyp. Eine homogene und gut proliferierende MSC-ähnliche Kultur konnte jedoch lediglich aus hHSC-iPSC und mittels EB-Methode generiert werden.

4.3 Untersuchung der *in vitro* Differenzierungskapazität unterschiedlicher iPS-MSC im Vergleich zu hBMSC

Nach der erfolgreichen Generierung von verschiedenen iPS-MSC-Kulturen sollten deren mesodermale *in vitro*-Differenzierungskapazität überprüft und mit humanen mesenchymalen Stammzellen verglichen werden. Dazu wurden die Zellen adipogene und osteogene Differenzierung induziert. Sofern die dafür stark expandierten Kulturen weiterhin eine homogene und MSC-ähnliche Morphologie aufwiesen und die Zellzahlen ausreichten, wurde zusätzlich eine Chondrogenese induziert. Dies war allerdings nur bei drei hCB- und hHSC-iPS-MSC-Kulturen (aus ML1, EB3 und EB7) sowie den hBMSC möglich. Mit den hFF-iPS-MSC war keine mesodermale Differenzierung möglich.

Zu Beginn der Differenzierung (Tag 0) sowie alle sieben Tage wurden mRNA-Proben genommen. Diese wurden nach Abschluss des jeweiligen Experiments mittels (semi-)quantitativer RT-PCR analysiert. Zudem wurden die Zellen nach vierwöchiger Induktion fixiert und histologisch analysiert. Die histologischen Ergebnisse der einzelnen Zellpopulationen (hCB-iPS-MSC(EB), hCB-iPS-MSC(ML), hHSC-iPS-MSC(EB) und hBMSC) sind in den Abbildungen 4.15 (Adipogenese), 4.16 (Osteogenese) und 4.17

(Chondrogenese) vergleichend dargestellt.

Induktion der adipogenen Differenzierung

Eine erfolgreiche adipogene Differenzierung ist daran zu erkennen, dass sich Fettvesikel (*Lipid droplets*, LD) in den Zellen bilden. Mesenchymale Stammzellen lassen sich sehr gut zu Fettzellen differenzieren. Bei allen durchgeführten Experimenten mit hBMSC waren bereits nach einer Woche vereinzelte große LDs unter dem Mikroskop sichtbar. Nach einer vierwöchigen Differenzierung war der Großteil (schätzungsweise bis zu 95 %) dieser Zellen von mehreren sehr großen Fettvesikeln gefüllt (Abbildung 4.15⁴). Die Kontrollzellen der hBMSC waren durchweg negativ.

Verglichen mit den Ergebnissen der genuinen MSC zeigten alle iPS-MSC-Kulturen ebenfalls einen großen Anteil an differenzierten Zellen, jedoch waren die LDs nicht so groß und ausgeprägt. Vermutlich war die adipogene Differenzierung der iPS-MSC nach vier Wochen noch nicht so fortgeschritten wie bei den hBMSC. Die histologischen Untersuchungen der Kontrollzellen beider hCB-iPS-MSC-Kulturen (EB und ML) zeigten, dass keine spontane Adipogenese stattgefunden hatte. In der Kontrolle der hHSC-iPS-MSC(EB) waren jedoch einige wenige positive Zellen erkennbar (in Abbildung 4.15 mit Pfeilen markiert), so dass hier vermutlich eine spontane Differenzierung stattgefunden hat.

Neben den histologischen Daten zeigte sich auf mRNA-Ebene eine Zunahme der Genexpressionen von PPAR- γ , FABP4 und LPL (Daten nicht gezeigt). Allerdings waren diese Änderungen nicht vergleichbar mit denen der hBMSC. Während bei letzteren für PPAR- γ ΔC_T -Werte über 10^{-5} und für FABP4 über 10^{-4} erreicht wurden, bewegten sich die Maximalwerte der adipogen induzierten iPS-MSC-Kulturen im Bereich von $2 \cdot 10^{-7}$ (PPAR- γ) bzw. 10^{-6} (FABP4). Damit waren diese Expressionswerte etwa zwei Zehnerpotenzen niedriger als die der nativen hBMSC.

In Bezug auf die Kontrollen der hHSC-iPS-MSC wurde vermutet, dass eine spontane Adipogenese stattgefunden hatte. Die qRT-PCR-Analysen unterstützten diese Vermutung, da die FABP4-Expression in den Kontrollzellen meist höher war als in den adipogen induzierten Zellen. In Bezug auf PPAR- γ waren die Werte beider Kulturen (induzierte und Kontrollzellen) in den ersten beiden Wochen der Differenzierung annähernd gleich. Ab der dritten Woche nahm die Expression der Kontrollzellen schließlich ab und die der adipogen induzierten Zellen zu.

Zusammenfassend konnte somit gezeigt werden, dass hCB- und hHSC-iPS-MSC in der Lage sind, adipogen zu differenzieren. Zudem neigen hHSC-iPS-MSC auch ohne Induktion zu einer spontanen Adipogenese. Insgesamt fällt die adipogene Differenzierung in den aus iPSC generierten mesenchymalen Stammzellen deutlich geringer aus als in genuinen hBMSC.

⁴Die Fluoreszenzaufnahmen der adipogen differenzierten hBMSC sind nicht so klar, wie die der anderen Kulturen, da diese noch an einem „offenen“ Mikroskop (Olympus) mit externem Fluoreszenz-Kondensator und nicht mit dem später erhaltenen in sich geschlossenen Fluoreszenzmikroskop (Keyence) angefertigt wurden.

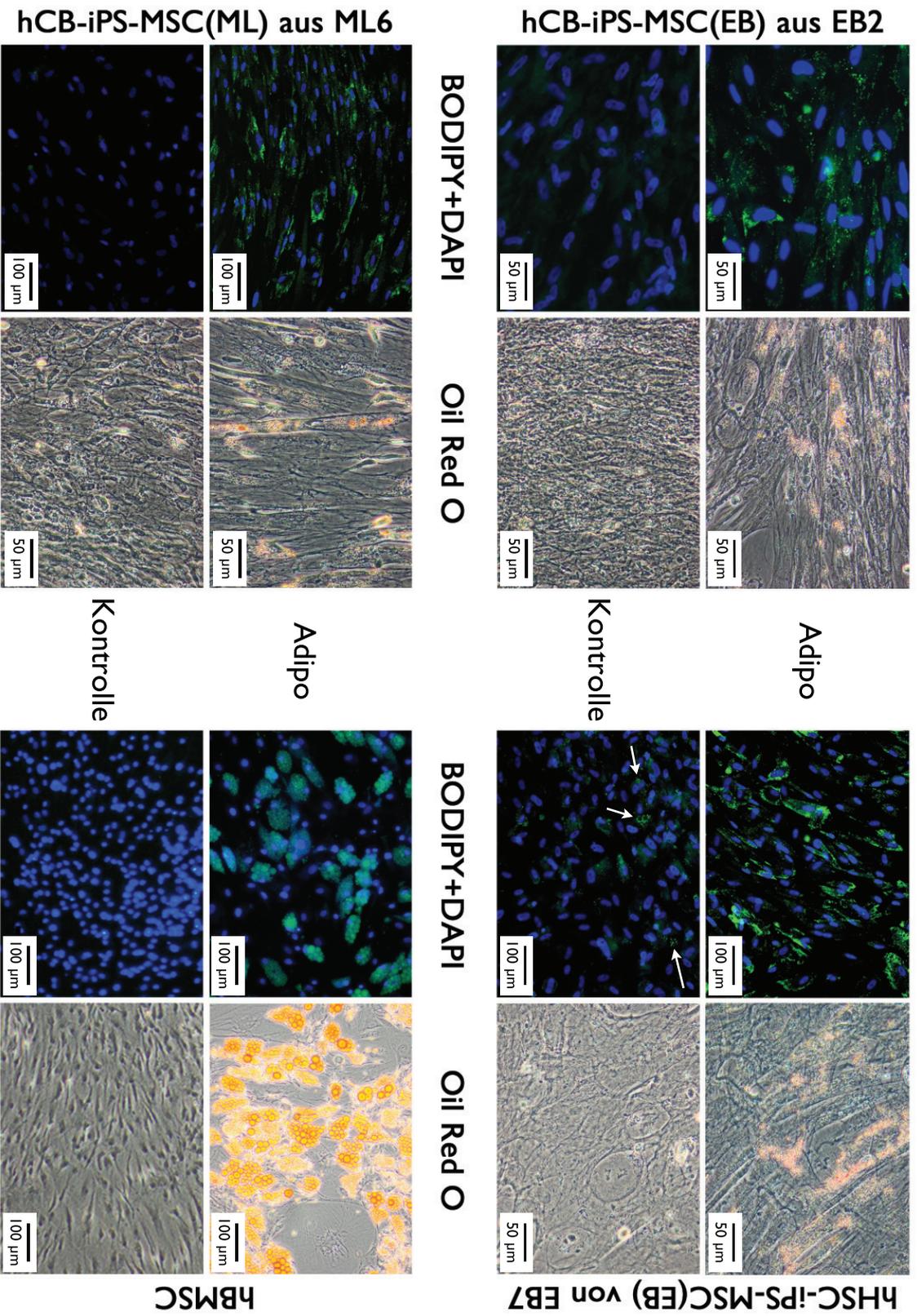


Abbildung 4.15: Histologische Analysen der adipogen induzierten hCB- und hHSC-iPS-MSC im Vergleich zu nativen hBMSC (rechts unten). Die iPS-MSC-Kulturen stammen aus den Generierungsexperimenten EB2 (hCB-iPS-MSC(EB), links oben), ML6 (hCB-iPS-MSC(ML), links unten) und EB7 (hHSC-iPS-MSC(EB), rechts oben). Dargestellt sind die Phasenkontrast-Aufnahmen der mit Oil Red O gefärbten Zellen sowie die Fluoreszenz-Overlays der BODIPY- (grün) und DAPI-(blau)Färbungen.

Induktion der osteogenen Differenzierung

Die Induktion der Osteogenese wurde über vier Wochen entweder mit Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4 , 3 mM) oder mit β -Glycerophosphat (β -GP, 10 mM) als Phosphatquelle durchgeführt. Eine erfolgreiche Bildung von Osteoblasten beinhaltet die Einlagerung von Hydroxylapatit in die extrazelluläre Matrix. Die darin enthaltenen Calcium- und Phosphat-Ionen wurden mittels Alizarin Rot- bzw. von Kossa-Färbung nachgewiesen. Abbildung 4.16 zeigt die histologischen Ergebnisse der osteogen induzierten iPS-MSC und hBMSC. Die dargestellten hBMSC-Ergebnisse stammen aus einem Experiment, in dem sowohl die Induktion mit NaH_2PO_4 als auch mit β -GP erfolgreich war. Leider war die Osteogenese sehr spenderabhängig und häufig konnte nur eine Induktion mit NaH_2PO_4 , nicht aber mit β -GP erzielt werden. Letzterer Aspekt konnte bereits innerhalb der Arbeitsgruppe verifiziert und von Frau Dr. Luisa Marilena Schäck publiziert werden [136]. Die Kontrollen der hBMSC waren durchweg negativ. Da ebenso bei den hCB- und hHSC-iPS-MSC keine spontane Osteogenese beobachtet wurde, wurde auf die Darstellung der Kontrollen verzichtet.

Die Ergebnisse der osteogenen Induktion waren bei den iPS-MSC, ähnlich den hBMSC, sehr unterschiedlich. Mit NaH_2PO_4 im Induktionsmedium gelang die Differenzierung bis auf eine Ausnahme gut oder sehr gut (Abbildung 4.16). Eine Induktion mit β -GP konnte hingegen lediglich bei den hHSC-iPS-MSC(EB) aus Versuch EB7 verzeichnet werden. HCB-iPS-MSC ließen sich innerhalb von vier Wochen mit dieser Phosphatquelle nicht zu Osteoblasten differenzieren. In einem Fall (hCB-iPS-MSC(EB) aus Experiment EB5) konnte weder mit β -GP noch mit NaH_2PO_4 ein positiver Calcium- oder Phosphat-Nachweis erzielt werden (nicht gezeigt). Dem gegenüber wurde bei der hCB-iPS-MSC-Kultur aus Experiment EB2 eine sehr ausgeprägte Calciumphosphat-Bildung beobachtet. Hier konnten bereits nach sieben Tagen Ablagerungen auf der Zellschicht der NaH_2PO_4 -induzierten Zellen beobachtet werden. Eine Woche später hatten sich diese Zellen zu Haufen zusammengezogen. Da vermutet wurde, dass dies aufgrund erhöhter Spannungen in der extrazellulären Matrix geschehen war, wurden die Zellpellets, wie nach einer Chondrogenese in Einbettmedium eingebettet, geschnitten und im Anschluss gefärbt. Sowohl die Alizarin Rot- als auch die von Kossa-Färbungen fielen positiv aus. Exemplarisch ist die von Kossa-Färbung eines solchen Schnittes in Abbildung 4.16 (Quadrat links oben, Foto in der rechten Spalte). Die β -GP-induzierten Zellen hatten sich nicht abgelöst und wurden daher wie gewohnt fixiert und gefärbt.

Eine Sonderstellung nahmen die hHSC-iPS-MSC(EB) ein. Wie eingangs beschrieben, konnte lediglich bei diesen Zellen erfolgreiche eine Osteogenese mit β -GP induziert werden. Zudem waren die histologischen Färbungsergebnisse etwas intensiver als die der NaH_2PO_4 -induzierten Zellen (Abbildung 4.16 rechts oben). Da leider keine weitere iPS-MSC-Kultur aus hHSC-iPSC zur Verfügung stand, um dieses Ergebnis zu verifizieren, konnte nicht überprüft werden, ob die osteogene Differenzierungskapazität einmalig oder spezifisch für hHSC-iPS-MSC erhöht ist.

Auf mRNA-Ebene konnte eine Korrelation zwischen den Expressionswerten und den histologischen Befunden festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Es zeigte sich sowohl bei den hBMSC als auch allen iPS-MSC-Kulturen, dass im Falle des die Zellen mit den besseren histologischen Ergebnissen durchschnittlich auch höhere Genexpressionswerte für ALPL, IBSP und Osteopontin aufwiesen. Bei dem späten Osteogenesemarker

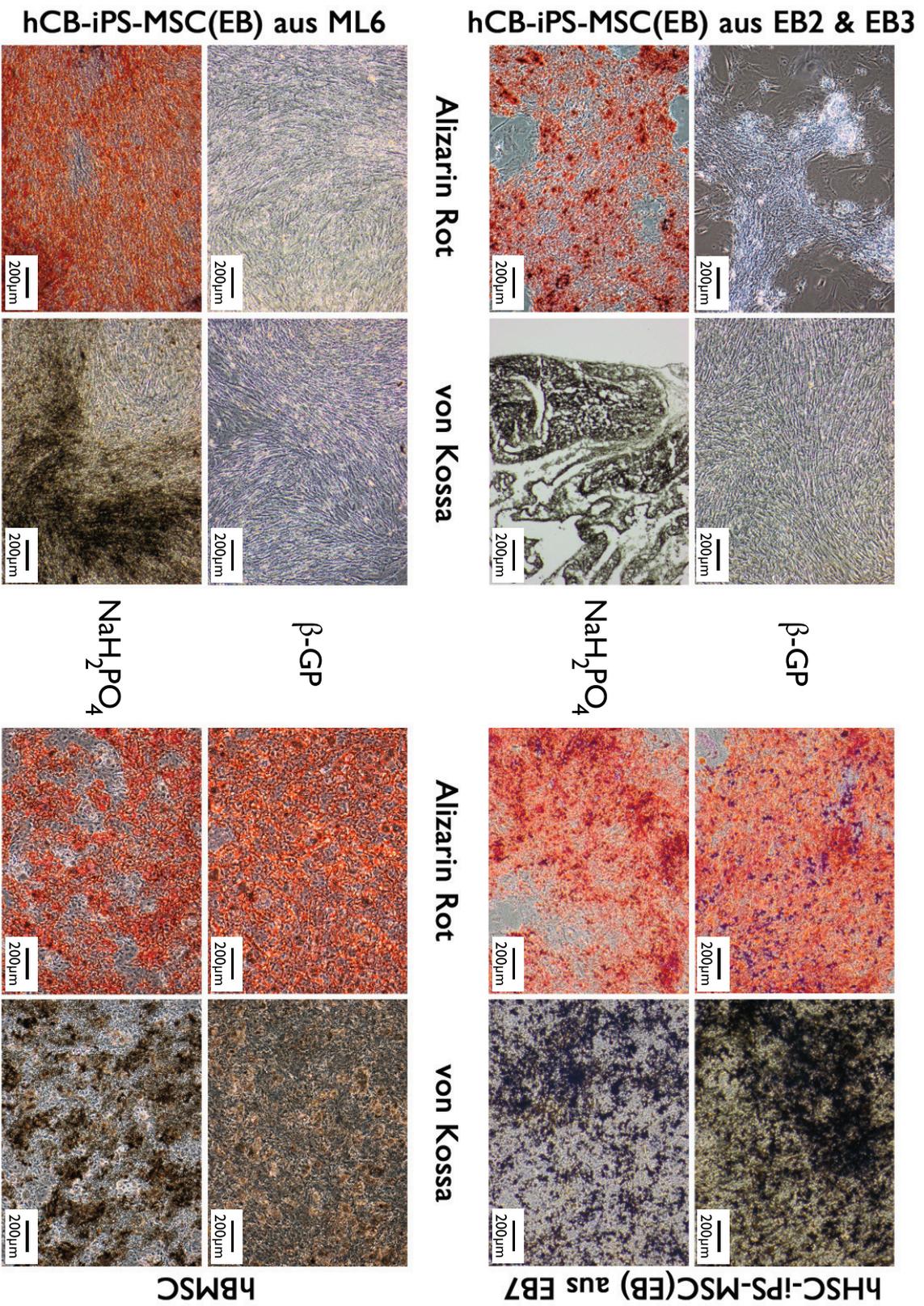


Abbildung 4.16: Histologische Analysen der osteogen induzierten hCB- und hHSC-iPS-MSC im Vergleich zu nativen hBMSC (rechts unten). Die hier dargestellten iPS-MSC-Kulturen stammen aus den Generierungsexperimenten EB2 bzw. 3 (hCB-iPS-MSC(EB), links oben), ML6 (hCB-iPS-MSC(ML), links unten) und EB7 (hHSC-iPS-MSC(EB), rechts oben). Gezeigt sind die Phasenkontrast-Aufnahmen der Alizarin Rot- und von Kossa-Färbungen.

Osteopontin fiel der Unterschied jedoch nur gering aus. Interessanterweise zeigten auch diejenigen induzierten iPS-MSC- und hBMSC-Proben, in denen keine positive histologische Färbung festgestellt wurde, eine erhöhte Genexpressionen der osteogenen Marker. Denkbar ist diesbezüglich, dass die Differenzierung auf molekularer Ebene bereits begonnen hatte, jedoch noch kein Hydroxylapatit in die Extrazellulärmatrix eingelagert wurde, wodurch die histologischen Färbungen negativ ausfielen.

Kollagen I α 1 ist ebenfalls ein typischer Marker der Osteogenese. Dieses Gen wurde jedoch in den induzierten sowie den Kontrollzellen etwa gleich stark exprimiert ($\Delta C_T \approx 10^{-3}$). Die relativen Genexpressionswerte waren eine Zehnerpotenz größer als die der hBMSC-Proben ($\Delta C_T \approx 10^{-4}$). Demgegenüber wurde IBSP in differenzierten hBMSC ($\Delta C_T \approx 10^{-5}$) etwa 100-fach stärker exprimiert als in differenzierten iPS-MSC ($\Delta C_T \approx 10^{-7}$). Osteopontin und ALPL bewegten sich bei beiden Zelltypen auf einem ähnlichen Niveau.

Da sich der Zellrasen mit den hCB-iPS-MSC aus Experiment EB2 bereits nach zweiwöchiger Differenzierung zusammengezogen hatte (siehe oben), wurde vermutet, dass schon sehr früh viel Hydroxylapatit in die extrazelluläre Matrix eingelagert wurde und dadurch starke Spannungen auf der Zelloberfläche auftraten. Auf mRNA-Niveau konnte diese These nicht bestätigt werden. Es wurden keine Auffälligkeiten, wie z.B. frühe oder extrem hohe Expressionswerte, festgestellt.

Zusammenfassend konnte die osteogene Differenzierungskapazität von iPS-MSC mit einer Ausnahme gezeigt werden. Jedoch ließen sich hCB-iPS-MSC besser nur NaH₂PO₄ induzieren. Eine Differenzierung mit β -GP als Phosphatquelle konnte nur bei hHSC-iPS-MSC beobachtet werden. Die Genexpressionen der meisten osteogenen Marker waren bei allen iPS-MSC und hBMSC auf einem ähnlichen Niveau.

Induktion der chondrogenen Differenzierung

Wie eingangs erwähnt, konnten lediglich mit den iPS-MSC aus den Versuchen ML1, EB3 und EB7 sowie den hBMSC eine chondrogene Induktion durchgeführt werden. Die Zellen wurden als Pellets über vier Wochen kultiviert, wobei die chondrogene Induktion mittels TGF- β 3 erfolgte. Bei der Differenzierung der hCB-iPS-MSC aus Versuch ML1 nahm die Größe der Pellets mit der Versuchsdauer ab, so dass die Anfertigung von Kryoschnitten als nicht sinnvoll erschien. Von diesem Experiment wurden alle Pellets für mRNA-Analysen verwendet.

Abbildung 4.17 zeigt die histologischen Ergebnisse der chondrogen induzierten iPS-MSC und hBMSC. Die intensivsten histologischen Färbungen wurden bei der Differenzierung von hBMSC beobachtet (Abbildung 4.17). Der Umfang der Pellets nahm während der vierwöchigen Induktion deutlich zu, wohingegen die Kontrollzellen klein blieben. Zudem war die Struktur im Inneren der TGF- β 3-induzierten Zellpellets deutlich dichter als in den entsprechenden Kontrollen.

Bei den iPS-MSC(EB)-Kulturen waren die Größenunterschiede zwischen induzierten und Kontrollzellen deutlich geringer als bei hBMSC (Abbildung 4.17). Die Chondrogenese-Pellets der hCB-iPS-MSC waren nur etwa doppelt so groß wie die der Kontrollen, bei den hHSC-iPS-MSC waren beide Pellets etwa gleich groß. Die Struktur der chondrogen induzierten Pellets war dennoch deutlich kompakter als bei den entsprechenden Kontrollpellets. Aufgrund der spezifischen Farbstoffbindungen bei den mit chondrogenem Medium kultivierten Zellen konnte von einer Proteoglykan-Einlagerung in die

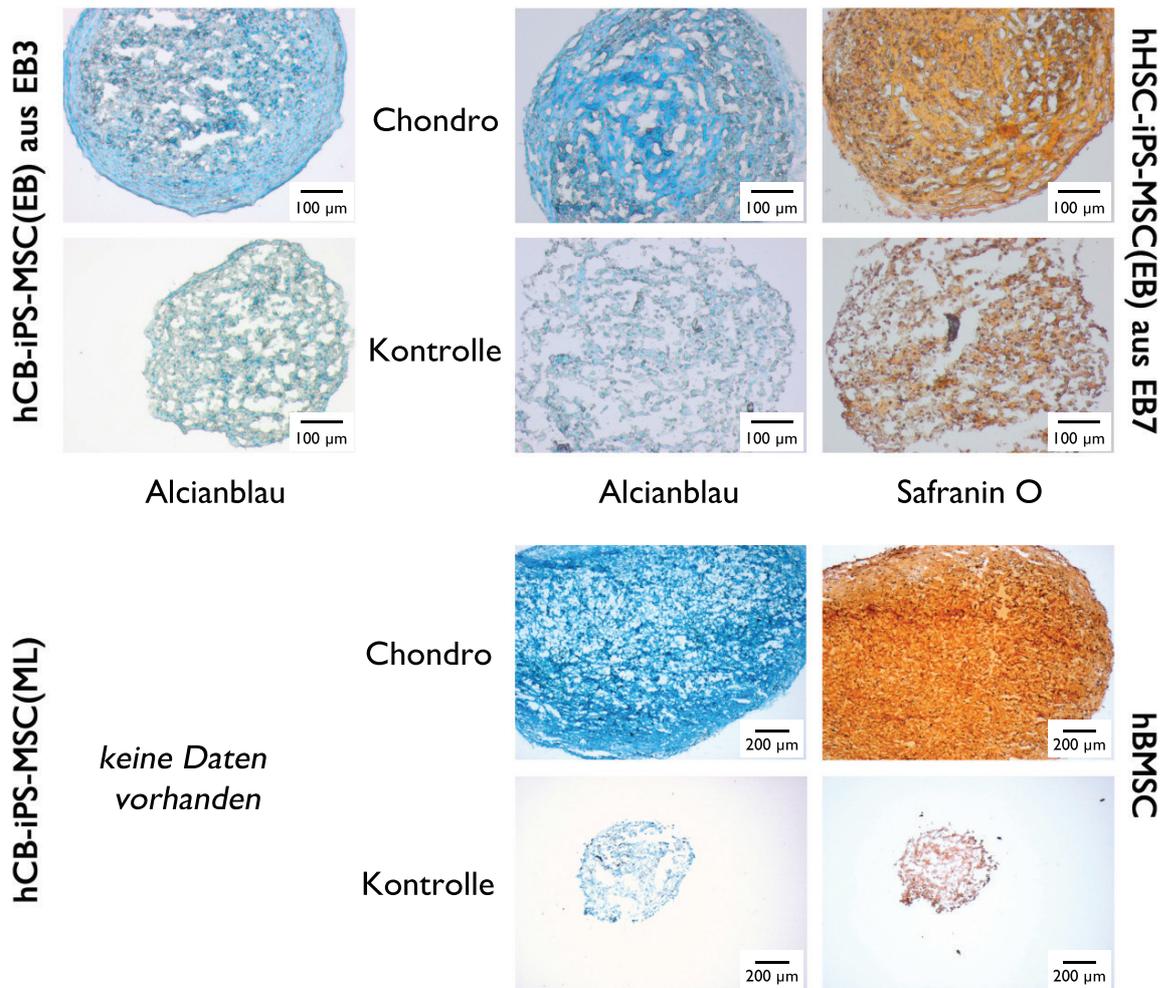


Abbildung 4.17: Histologische Analysen der chondrogen induzierten hCB- und hHSC-iPS-MSC im Vergleich zu nativen hBMSC (rechts unten). Die hier dargestellten iPS-MSC-Kulturen stammen aus den Generierungsexperimenten 3 (hCB-iPS-MSC(EB), links oben) und EB7 (hHSC-iPS-MSC(EB), rechts oben). Zu ML-generierten iPS-MSC liegen keine Daten vor. Gezeigt sind die Phasenkontrast-Aufnahmen der Alcianblau- und Safranin O-Färbungen.

Zellmatrix ausgegangen werden.

Die Genexpressionsanalysen konnten eine chondrogene Differenzierung der iPS-MSC allerdings nur bedingt verifizieren. Problematisch waren hierbei deutlich geringere mRNA-Mengen als bei hBMSC, weswegen für Kollagen 2 α 1, SOX9 und Aggrecan nur teilweise Messwerte bestimmt werden konnten. Anhand der Expressionen des Haushaltsgens (18S-rRNA) zeigte sich, dass die erhaltenen DNA-Mengen mit zunehmender Kultivierungsdauer immer mehr abnahmen. Vermutlich war ein Teil der Zellen im Laufe der (Pellet-)Kultivierung abgestorben, woraufhin weniger Templat-DNA zur Verfügung stand. Diese reichte wahrscheinlich nach drei- oder vierwöchiger Induktion nicht mehr für eine Detektion aus. Die Daten der kultivierten iPS-MSC-Pellets, die gewonnen werden konnten, zeigten eine geringfügige Expressionssteigerung von Kollagen 2 α 1, SOX9 und Aggrecan in den ersten Wochen der Kultivierung. Dies wurde allerdings nicht nur bei den chondrogen induzierten Zellen, sondern ebenfalls bei den Kontrollzellen

beobachtet. Somit konnte eine gerichtete Induktion der Chondrogenese in induzierten iPS-MSC auf mRNA-Niveau nicht nachgewiesen werden.

Expression typischer Pluripotenzmarker bei der mesodermalen Differenzierung von iPS-MSC

Ebenso wie nach der direkten mesodermalen Differenzierung von iPSC (Abschnitt 4.1.2, Seite 64 ff.) wurde auch bei den adipogen und osteogen induzierten hCB-iPS-MSC überprüft, ob die vierwöchige Induktion einen Einfluss auf die Genexpression der Pluripotenz-Marker ALPL, CD24, LIN28, NANOG, SOX2 und OCT4 hatte. Aufgrund der zu geringen RNA-Mengen der chondrogen induzierten Zellproben, konnten keine Analysen bezüglich der Pluripotenz-Marker durchgeführt werden.

Bei den adipogen und osteogen induzierten Zellen wiesen die meisten analysierten Gene keine Auffälligkeiten auf. Die Proben der Adipogenese wiesen lediglich leicht erhöhte Expressionswerte in Bezug auf CD24 und SOX2 auf. CD24 ist bis zu zehnfach und SOX2 bis zu 33-fach gegenüber den jeweiligen Kontrollen erhöht. Jedoch ist hierzu bekannt, dass sowohl CD24 als auch SOX2 in Vorläufer-Fettzellen erhöht sind bzw. die Adipogenese fördern [137–140]. In den osteogen differenzierten Zellen wurde nur ALPL verstärkt exprimiert. Dies war allerdings zu erwarten, da das Gen bei der frühen Osteogenese heraufreguliert wird und ebenfalls als Marker der Osteogenese gilt.

4.3.1 Kurzzeitadipogenese

Parallel zu den eigenen durchgeführten iPS-MSC-Experimenten zeigte sich in unserer Arbeitsgruppe, dass es zu einer Expressionssteigerung von CD34 auf der Zelloberfläche von hBMSC kam, wenn sie mit adipogenem Medium induziert wurden [141]. Nach diesem Befund sollte überprüft werden, ob iPS-MSC ein ähnliches Verhalten aufwiesen. Wie oben erläutert, fiel die Adipogenese bei den untersuchten iPS-MSC allgemein geringer aus als bei hBMSC. Daher wurde für dieses Experiment jene iPS-MSC-Kultur verwendet, die die besten adipogenen Differenzierungsergebnisse aufwies. Dies waren die Zellen, die mittels EB-Methode und mit zusätzlich 5 ng/mL TGF- β 1 im iPS-MSC-Medium generiert wurden (vergleiche Abschnitt 4.4.3). Diese iPS-MSC sowie eine hBMSC-Kultur als Referenz wurden parallel adipogen induziert differenziert. MSC-Wachstumsmedium ohne bFGF diente als Kontrollmedium. Nach 14 Tagen wurden alle Populationen fixiert und mit Oil Red O gefärbt. Beide Kontrollen wiesen keine Färbung auf. Bei hBMSC wurden wieder viele Zellen mit großen Fettvesikeln beobachtet, die induzierten iPS-MSC wiesen deutlich weniger differenzierte Zellen mit kleineren LDs auf.

Daneben wurde die Oberflächenpräsentation von CD34 an den Tagen 0, 7, 10 und 14 durchflusszytometrisch untersucht. Proben für Genexpressionsanalysen (CD34, FABP4, PPAR- γ) wurden nach 0, 1, 2, 3, 7, 10 und 14 Tagen genommen. Abbildung 4.18 und 4.19 zeigen die Ergebnisse der FCM- und qRT-PCR-Analysen.

Da die Zellen für dieses Experiment konfluent gewachsen waren und sich somit in einem sehr engen Zellverbund befanden, war es sehr schwierig, die für die FCM-Analysen notwendigen Einzelzellsuspensionen herzustellen. Die Zellen mussten durch häufiges Auf- und Abpipettieren vereinzelt werden. Durch die hohen Scherkräfte wurden viele Zellen dabei beschädigt. Bei der Dot Plot-Auftragung von SSC gegen FSC wurde

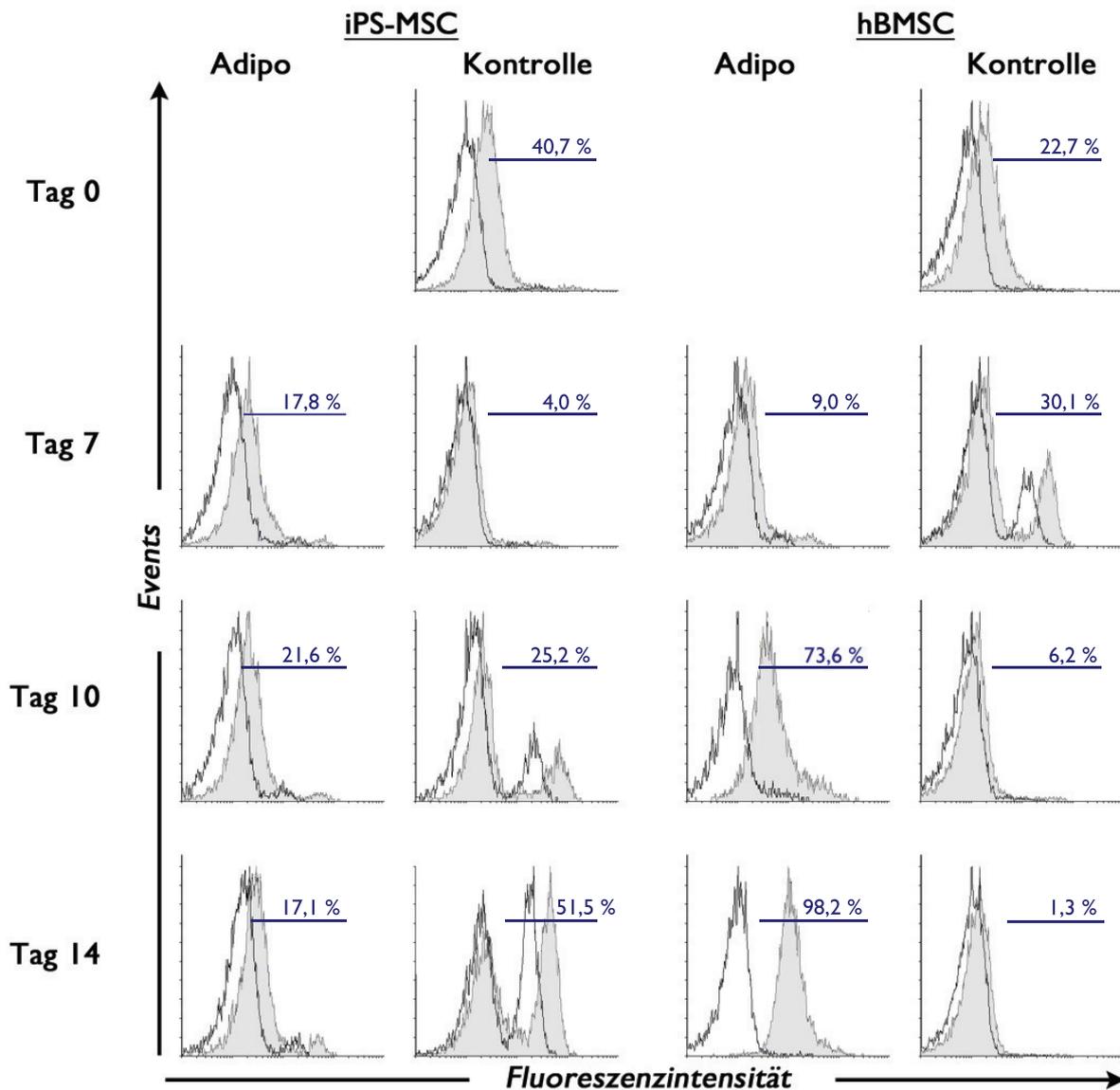


Abbildung 4.18: Histogramme der durchflusszytometrischen Analysen von CD34 auf der Oberfläche von iPS-MSC und hBMSC an Tag 0, 7, 10 und 14 der adipogenen Induktion.

dies anhand vieler toter Zellen ersichtlich. Außerdem konnten Antikörper in das Innere der Zellen mit beschädigter Membran eindringen, wodurch einige Zellen falsch-positiv detektiert wurden. In derartigen Fällen wiesen fälschlicherweise auch die Zellen, die mit Isotypkontrollantikörpern gefärbt wurden, eine positive Fraktion auf (z.B. hBMSC/Kontrolle an Tag 7 oder iPS-MSC an Tag 10 und 14, Abbildung 4.18).

Unter Berücksichtigung der falsch-positiven Fraktionen konnten in den Kontrollzellen zu keinem Zeitpunkt eine CD34-Oberflächenexpression detektiert werden. Bei den adipogen induzierten hBMSC wurde hingegen eine eindeutige Expressionssteigerung auf zunächst 73,6 % an Tag 10 und schließlich auf 98,2 % an Tag 14 beobachtet (Abbildung 4.18). Neben den Prozentzahlen wies die zwischen Tag 10 und 14 zunehmende Fluoreszenzintensität auf eine Zunahme der CD34-Oberflächenmoleküle hin (Abbildung 4.18, Verschiebung der grau hinterlegten Histogramme nach rechts).

Demgegenüber konnten bei den iPS-MSC weder bei den Kontrollzellen noch bei den

adipogen induzierten Zellen eine CD34-Oberflächenexpression detektiert werden.

Auf mRNA-Niveau zeigte sich bei den iPS-MSC, dass deren CD34-Genexpression an Tag 0 gegenüber der der hBMSC 13-fach erhöht war (Abbildung 4.19). Im Verlauf des Experiments nahm die Expression jedoch so weit ab, dass sie sich ab Tag 10 auf einem ähnlichen Niveau wie dem der hBMSC befand. Interessanterweise zeigten die qRT-PCR-Ergebnisse der adipogen induzierten hBMSC ebenfalls keine Zunahme der CD34-mRNA, obwohl zuvor eindeutig eine Steigerung der entsprechenden Oberflächenproteine detektiert worden war. Vielmehr nahm die Genexpression in den induzierten Zellen ab, wohingegen die Kontrollzellen nach einer kurzen Abnahme an Tag 1 und 2 wieder zunahmen.

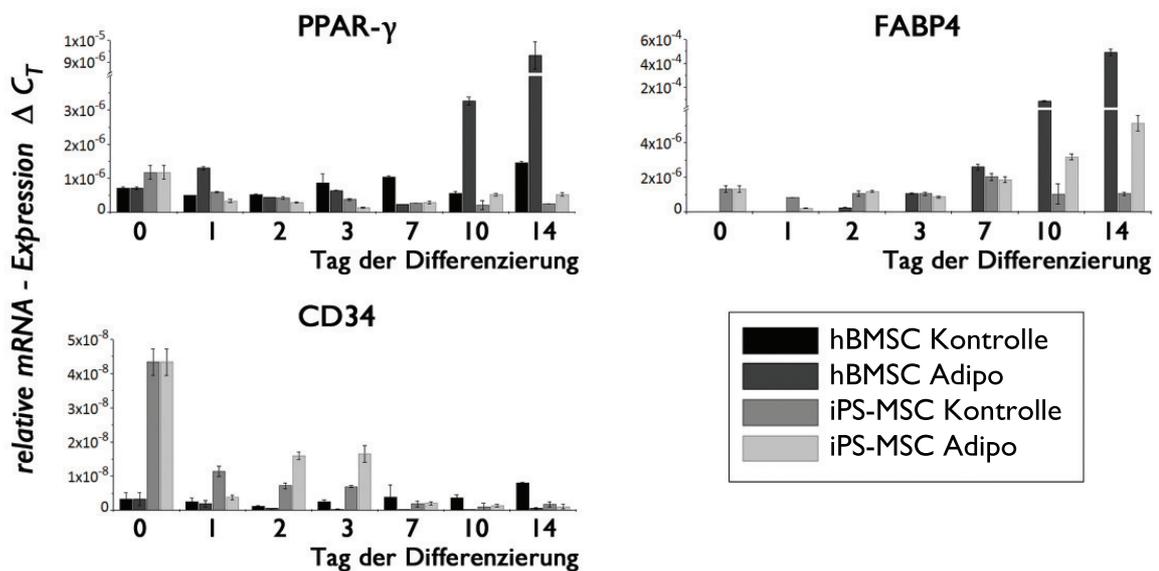


Abbildung 4.19: Genexpressionsdaten von PPAR- γ , FABP4 und CD34 während der Kurzzeitadipogenese. Für die cDNA-Synthese wurden random-Primer und als Haushaltsgen wurde 18S-rRNA verwendet.

Neben CD34 wurden auch die adipogenen Marker PPAR- γ und FABP4 analysiert (Abbildung 4.19). Es zeigte sich erneut, dass die differenzierungsspezifischen Gene in den hBMSC (spätestens ab Tag 7) deutlich stärker exprimiert wurden als in iPS-MSC (PPAR- γ : 17-fach, FABP4: 96-fach). Bei hBMSC nahmen die Genexpressionen sowohl von PPAR- γ als auch von FABP4 stark zu, in Bezug auf die iPS-MSC stieg lediglich das mRNA-Niveau von FABP4 geringfügig an. Daraus ließ sich schließen, dass die Adipogenese in den genuinen MSC vermutlich weiter fortgeschritten war als in den generierten iPS-MSC.

4.4 Modifizierungen der EB- und ML-Methoden für eine Optimierung des Differenzierungsprozesses

Um eine schnellere und stabilere Differenzierung von induzierten pluripotenten zu mesenchymalen Stammzellen zu erreichen, wurden verschiedene Modifizierungen beider

Methoden (EB und ML) getestet. Zunächst wurden bereits publizierte Varianten überprüft. Zum einen wurden unvollständig differenzierte iPSC bzw. iPS-MSK mittels FACS sortiert und zum anderen wurde eine EB-Differenzierung ohne Verwendung von Wachstumsfaktoren durchgeführt. Daneben wurden aufgrund der Erkenntnisse aus den Microarray-Analysen die Verwendung von 17β -Estradiol und TGF- β 1 untersucht. Außerdem wurde durch lentiviral-vermittelte Transduktionen der iPSC überprüft, ob ein Knock-down von CD24 oder die Überexpression von CD105 eine Beschleunigung der Differenzierung oder eine Verbesserung der generierten iPS-MSK-Kultur zur Folge hätte. Nähere Angaben zu den Variationen werden in den nachfolgenden Abschnitten 4.4.1 bis 4.4.6 gemacht und erläutert. Die Tabellen 4.4 und 4.5 geben zudem einen Überblick über die durchgeführten Experimente.

Tabelle 4.4: Übersicht der durchgeführten Experimente zur Optimierung des Generierungsprozesses von iPS-MSK. Aufgeführt sind alle Modifikationen ohne Einsatz von Lentiviren.

Experiment	Ursprung der iPSC	Passage der iPSC	Erfolgreich?	Kommentar
<i>Aufreinigung unvollständig differenzierter iPSC mittels FACS</i>				
ML11	hCB	40.0	Ja	FACS in Passage 40.7: 15,2 % sortierte Zellen; Morphologische Veränderungen drei Passagen nach dem Sortieren
ML12	hCB	42.0	Ja	FACS in Passage 42.6: 21,9 % sortierte Zellen; Morphologische Veränderungen vier Passagen nach dem Sortieren
<i>Generierung von iPS-MSK ohne Zugabe von Wachstumsfaktoren</i>				
EB10	hCB	50.0	Nein	keine MSK-ähnliche Morphologie erkennbar
EB11	hHSC	36.0	Nein	sehr inhomogene Kultur, kaum MSK-ähnliche Zellen
EB12	hFF	37.0	Nein	rhythmisch kontrahierende Zellen zwischen Tag 7 und 14 der EB-Phase; sehr inhomogene Kultur mit wenigen MSK-ähnlichen Zellen
<i>Generierung von iPS-MSK durch Zugabe von TGF-β1</i>				
EB13	hCB	61.0	Ja	2 ng/mL TGF- β 1 im Differenzierungsmedium; leicht inhomogene Kultur; flächige Zellen ab Passage 61.8
EB14	hCB	61.0	Ja	5 ng/mL TGF- β 1 im Differenzierungsmedium; flächige Zellen ab Passage 61.9
<i>Generierung von iPS-MSK durch Zugabe von 17β-Estradiol</i>				
EB15	hCB	61.0	Nein	sehr inhomogene Kultur, wenige MSK-ähnliche Zellen

Tabelle 4.5: Übersicht der durchgeführten Experimente zur Generierung von iPS-MSCs mittels lentiviraler Transduktion. Die Differenzierung wurde entweder durch den Knockdown von CD24 oder die Überexpression von CD105 angestrebt. Alle Experimente wurden mit hCB-iPSC durchgeführt.

Experiment	Passage der hCB-iPSC	Erfolgreich?	Kommentar
<i>Knockdown von CD24</i>			
ML13	61.0	Nein	wenige transduzierte Zellen, bei der Puromycin-Selektion starben alle Zellen
ML14	26.0	Nein	Schrittweise Erhöhung der Puromycin-Konzentration war erfolgreich, Zellen proliferierten jedoch nur langsam; nach dem Passagieren war keine MSC-ähnliche Morphologie mehr erkennbar
ML15	29.0	Nein	Zellen starben bei Puromycin-Selektion
ML16	35.0	Nein	dreifache Virusmenge bewirkte höhere Transduktionsrate, dennoch keine MSC-ähnlichen Zellen
ML17	35.0	Nein	Infektion an drei aufeinander folgenden Tagen bewirkte keine Steigerung der Transduktionsrate; Zellen starben bei Puromycin-Selektion
EB16	61.0	Nein	Zellen starben bei Puromycin-Selektion
EB17	26.0	Nein	nach Umsetzen der EBs wuchsen keine Zellen heraus
<i>Überexpression von CD105</i>			
ML18	41.0	Nein	keine stabile Kultur
ML19	38.0	Nein	Sortierung der transduzierten Zellen mittels MACS, dennoch keine stabile Kultur

4.4.1 Aufreinigung unvollständig differenzierter iPSC mittels FACS

Unvollständig differenzierte iPSC/iPS-MSCs-Mischkulturen wurden mittels FACS sortiert, um damit die MSC-ähnlichen Zellen aufzureinigen und so eine homogenere Population zu erhalten und den Differenzierungsprozess zu verkürzen. Die ideale Marker-Kombination sollte aus einem stark abnehmendem Pluripotenzmarker und einem stark zunehmenden (positiven) MSC-Marker bestehen. Anhand der in Abbildung 4.11 (Seite 74) dargestellten FCM-Ergebnisse eigneten sich alle Pluripotenzmarker sowie CD105. Die anderen MSC-Marker wurden aus folgenden Gründen ausgeschlossen: CD13, CD44 und CD146 wurden meist auf undifferenzierten iPSC schwach exprimiert, sodass diese Antigene trotz einer Expressionszunahme im Verlauf der Differenzierung nicht infrage kamen. CD14, CD34, CD45, CD90 und CD106 wiesen vor und nach der Differenzierung ähnliche Expressionswerte auf, sodass diese ebenfalls nicht als Sortierungsmerkmal verwendet werden konnten. CD73 wurde aufgrund starker Schwankungen, vor allem in Abhängigkeit von der Passage der iPSC (siehe Abschnitt 4.1.1, Seite 52 ff.), nicht ver-

wendet. CD105 erfüllte hingegen die Kriterien einer weitestgehend negativen Expression auf iPSC und einer starken Expressionszunahme während des Differenzierungsprozesses. Von den Pluripotenzmarkern wurde CD24 gewählt, da dieses Antigen in allen Experimenten entweder eindeutig positiv (in iPSC) oder negativ (in iPS-MS-C) war und nur sehr geringen Schwankungen unterlag. Die Kombination aus CD24⁻ und CD105⁺ zur Sortierung von iPS-MS-C aus einer unvollständig differenzierten Mischkultur wurde auch von anderen Gruppen erfolgreich angewandt [80, 95].

Die Sortierung mittels FACS wurde ausschließlich mit iPSC/iPS-MS-C durchgeführt, die über die Monolayer-Methode differenziert wurden. Bei der EB-Methode entsprachen die Zellen nach der EB-Phase bereits in der ersten Passage weitestgehend einem MS-C-Phänotyp, so dass eine Aufreinigung dieser Zellen keinen Gewinn dargestellt hätte. Somit konnten außerdem die extremen Stresseinwirkungen auf die Zellen, welche die Sortierung unausweichlich hervorruft, vermieden werden. In den ersten Passagen der ML-Differenzierung wurden die Zellen stark expandiert, so dass anschließend mehrere Millionen unvollständig differenzierte iPSC/iPS-MS-C für die Sortierung zur Verfügung standen. Als Referenz zu den sortierten Zellen wurde ein Teil der ursprünglichen und unsortierten ML-Kultur nach dem Standardprotokoll weiter differenziert.

Insgesamt wurden zwei Sortierungsexperimente durchgeführt (ML11 und ML12). Im ersten Experiment konnten 15,2 % (Passage 40.7) und im zweiten Experiment 21,9 % (Passage 42.6) CD24⁻/CD105⁺-Zellen separiert und wieder ausgesät werden. In der ersten Passage nach der Sortierung waren die Zellen in Kultur recht klein und wiesen größtenteils eine langgestreckte Morphologie auf. Damit erinnerten sie stark an hBMS-C in frühen Passagen. Exemplarische Zellkultur-Fotos der sortierten und unsortierten Zellen aus Experiment ML12 sind in Abbildung 4.20 A (obere und mittlere Reihe) gegenübergestellt. Die sortierten iPS-MS-C-Kulturen waren jedoch nicht stabil. Drei (ML11) bzw. vier (ML12) Passagen nach dem FACS wurden die Kulturen inhomogen und es traten morphologisch Veränderungen auf (Abbildung 4.20 A, untere Reihe). Eine spindelförmige Morphologie konnte nur noch stellenweise beobachtet werden. Interessanterweise verhielten sich die unsortierten Referenzkulturen vergleichbar. Eine Stabilitätssteigerung der iPS-MS-C-Kulturen konnte durch die Sortierung demnach nicht erreicht werden.

Mit Hilfe durchflusszytometrischer Untersuchungen konnte zudem gezeigt werden, dass sich die sortierten und unsortierten iPS-MS-C in der Passage nach dem FACS nicht signifikant unterschieden (Abbildung 4.20 B). In beiden Populationen waren die Expressionen der Pluripotenzmarker komplett zurück gegangen und die der MS-C-Marker außer CD106 ausgenommen hatten sich auf annähernd 100 % erhöht. CD106 und SSEA-4 wurden wie bereits in Abschnitt 4.2 beschrieben nicht auf der Zelloberfläche der iPS-MS-C präsentiert.

Neben den morphologischen und durchflusszytometrischen Analysen wurde das Genexpressionsmuster der CD24⁻/CD105⁺ sowie der CD24⁺/CD105⁻ Population analysiert. Dazu wurde eine weitere Sortierung von unvollständig differenzierten iPSC/iPS-MS-C durchgeführt, woraufhin die Zellen beider einfach-positiven Fraktionen parallel aufgefangen und anschließend deren Genexpressionen mittels qRT-PCR analysiert wurden. Dabei zeigte sich, dass die sortierten CD24-positiven Zellen noch weitestgehend den Ausgangszellen und die CD105-positiven Zellen den mesenchymalen Stammzellen entsprachen (Daten nicht gezeigt). Interessanterweise stimmten die relativen mRNA-

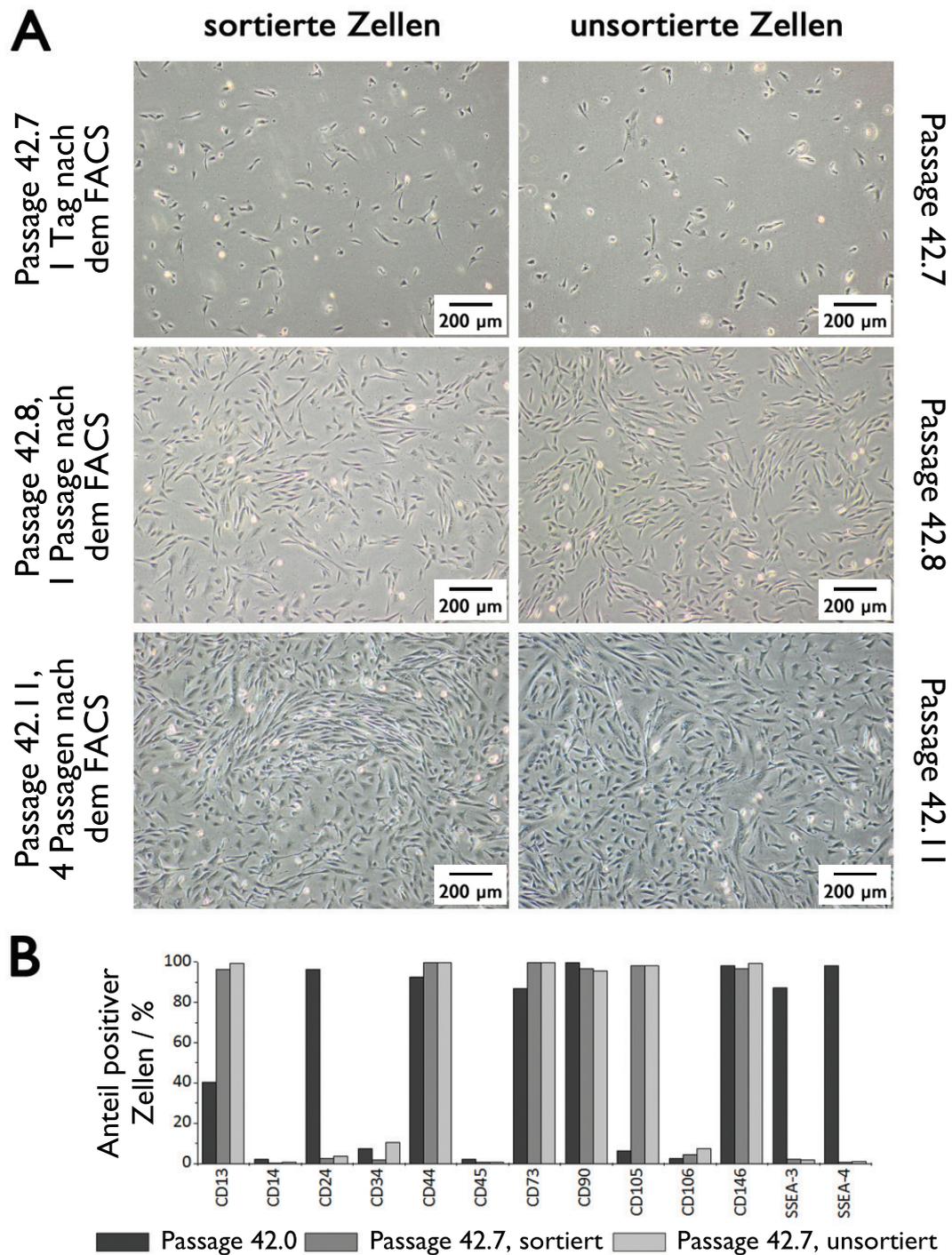


Abbildung 4.20: Vergleich von CD24⁻/CD105⁺-sortierten und unsortierten iPS-MSCs einen Tag sowie eine und vier Passagen nach dem FACS. A: Fotos der Morphologie. B: Ergebnisse der FCM-Analysen.

Expressionen der CD24⁻/CD105⁺-Zellen nur annähernd mit den durchschnittlichen Ergebnissen der iPS-MSCs(ML)-Kulturen überein. Die Pluripotenz-assoziierten Gene LIN28 und SOX2 wurden in den normal ML-differenzierten Zellen deutlich stärker, bis annähernd auf MSC-Niveau herunterreguliert. Die sortierten CD105⁺ Zellen exprimierten diese Gene jedoch noch bis zu 40-mal höher. Auch die Expression von E-Cadherin

und CD24 waren noch erhöht gegenüber derer der iPS-MS(ML). Letztere exprimierten zudem alle MSC-Marker (CD44, CD73, CD90, CD105, CD146) stärker als die Zellen der sortierten CD24⁻/CD105⁺-Fraktion. Somit schien der mesenchymale Charakter der sortierten Zellen noch nicht so weit ausgereift zu sein wie er es bei unsortierten iPS-MS(ML) war. Grund für die geringere Expression der MSC-Marker könnte die reduzierte Differenzierungsdauer durch das Sortieren sein. Auf die Präsentation der entsprechenden Oberflächenproteine hatte dieser Umstand jedoch keinen nennenswerten Einfluss (vergleiche Abbildung 4.20 B, Seite 95).

Zusammenfassend zeigte sich somit, dass die Sortierung unvollständig differenzierter iPSC/iPS-MS-Mischkulturen mittels FACS weder morphologisch noch auf Protein- oder mRNA-Niveau einen qualitativen Vorteil gegenüber unsortierten iPS-MS bietet. Lediglich eine Verkürzung der Differenzierungsdauer ist möglich, wenn in frühen Passagen sortiert wird.

4.4.2 Generierung von iPS-MS ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Differenzierung von induzierten pluripotenten zu mesenchymalen Stammzellen ohne die Zugabe der Wachstumsfaktoren bFGF, EGF und PDGF-AB beschrieben. Aufgrund einer deutlich höheren Erfolgsquote bei der Embryoid Body-Methode gegenüber der Monolayer-Methode (siehe Abschnitt 4.2) wurde ausschließlich erstere für diese Differenzierung angewandt. Zudem sind iPS-MS-Generierungen ohne Zugabe von Signalstoffen oder Verwendung anderer instruktiver Faktoren (Ko-Kulturen, Beschichtungen) lediglich für die EB-Methode bekannt [93, 94, 142].

Das Differenzierungsmedium wurde ohne die genannten Wachstumsfaktoren angesetzt, weitere Veränderungen der EB-Methode wurden nicht vorgenommen. Neben hCB-iPSC (EB10) wurden auch hHSC- (EB11) und hFF-iPSC (EB12) verwendet. Bei der Differenzierung von hFF-iPSC entstanden erneut rhythmisch kontrahierende EBs zwischen Tag 7 und 14. Dies war schon bei der Standard-EB-Methode mit Wachstumsfaktoren der Fall. Sowohl bei dieser als auch den beiden anderen Differenzierungen konnten keine homogene iPS-MS-Kultur generiert sondern lediglich einige wenige MSC-ähnliche Zellen beobachtet werden. Abbildung 4.21 zeigt exemplarische Fotos aller drei Kulturen in Passage 1.

Die Zellen der hHSC-Kultur wurden als inhomogene Kultur bis Passage 10 weiter kultiviert. Somit konnten zusätzliche Analysen der Oberflächenantigene und der Genexpression erfolgen (Daten nicht gezeigt). Trotz offenkundig fehlender MSC-ähnlicher Morphologie präsentierten diese Zellen die gleichen Oberflächenantigene wie erfolgreich generierte iPS-MS und damit wie hBMS (ohne CD106 und SSEA-4). Auch die Genexpressionsdaten zeigten eine eindeutige Reduktion der Pluripotenzmarker und eine Zunahme der mesenchymalen Marker im Verlauf der EB-Phase sowie der folgenden ML-Kultivierung (Daten nicht gezeigt). Sowohl die durchflusszytometrischen Daten der Oberflächenantigene als auch die Genexpressionsdaten zeigten somit, dass scheinbar mesenchymale Zellen generiert wurden. Aufgrund der fehlenden typischen spindelförmigen Morphologie handelte es sich dabei jedoch nicht um mesenchymale Stammzellen.

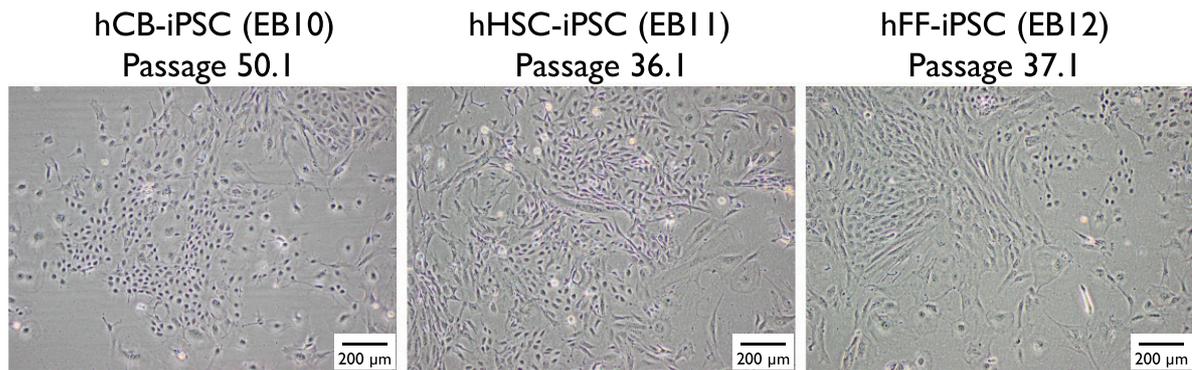


Abbildung 4.21: Exemplarische Fotos von (iPS-MSC-)Kulturen in Passage 1, welche mittels EB-Methode und ohne Wachstumsfaktoren generierte wurden.

4.4.3 Generierung von iPS-MSC durch Zugabe von TGF- β 1

Die Auswertungen der Microarray-Daten mit Hilfe des Programms *Ingenuity Pathways Analysis* zeigten, dass die Expressionsänderungen während der Differenzierung von einer TGF- β 1-Stimulation hervorgerufen worden sein könnten. Da TGF- β 1 zu diesem Zeitpunkt aber nicht verwendet wurde, wurde vermutet, dass dessen Zugabe zum Differenzierungsmedium die Generierung von iPS-MSC positiv beeinflussen könnte.

Um dies zu verifizieren, wurden zwei unterschiedliche Konzentrationen getestet: 2 ng/mL (EB13) und 5 ng/mL TGF- β 1 (EB14). Beide Versuche wurden mit hCB-iPSC und aufgrund der besseren Erfolgsquote unter Verwendung der EB-Methode durchgeführt. TGF- β 1 wurde vom ersten Tag bis einschließlich der 2. Passage zum iPS-MSC-Medium hinzu gegeben, ab der 3. Passage wurde wie zuvor MSC-GM verwendet.

Sowohl mit 2 ng/mL als auch mit 5 ng/mL TGF- β 1 konnten erfolgreich iPS-MSC generiert werden. Bei Verwendung der geringeren Konzentration war die erzeugte iPS-MSC-Kultur weniger homogen als bei der höheren Konzentration. Beide wiesen jedoch eine spindelförmige MSC-ähnliche Morphologie auf. Abbildung 4.22 zeigt exemplarische Fotos der mit TGF- β 1 generierten iPS-MSC in Passage 61.2. Vergleichend sind iPS-MSC aus Experiment EB6 dargestellt, welche ausgehend von der selben iPSC-Population aber ohne TGF- β 1 generiert wurden. In Passage 2 sahen alle drei Kulturen noch sehr ähnlich aus. Eine Passage später veränderte sich die Morphologie der Zellen ohne TGF- β 1-Einsatz (EB6) schlagartig (Abbildung 4.22, untere Reihe rechts). Die Zellen wurden breit und flächig und proliferierten zudem nur noch ganz langsam. Die mit TGF- β 1 generierten iPS-MSC blieben deutlich länger stabil (Abbildung 4.22, untere Reihe links und mitte). Die Kultur aus EB13 (2 ng/mL TGF- β 1) zeigte erst in Passage 61.8, die Kultur aus EB14 (5 ng/mL TGF- β 1) sogar erst in Passage 61.9, morphologische Veränderungen. Zudem blieb die Morphologie letzterer durchgehend homogener.

In Passage 61.3 wurden die generierten iPS-MSC aus EB13 und EB14 außerdem durchflusszytometrisch analysiert. Beide entsprachen dem Phänotyp der normal generierten iPS-MSC und mit Ausnahme von CD106 und SSEA-4 auch dem von hBMSC. Anhand der FCM-Daten konnte kein Unterschied zwischen den Zellen, die mit 2 oder 5 ng/mL TGF- β 1 differenziert wurden, festgestellt werden.

Aufgrund der höheren Homogenität und der besseren morphologischen Eigenschaften wurden die hCB-iPS-MSC(EB), die mit 5 ng/mL TGF- β 1 generiert wurden, in Passage 61.7 mesodermal (adipogen, osteogen und chondrogen) differenziert. Damit sollte

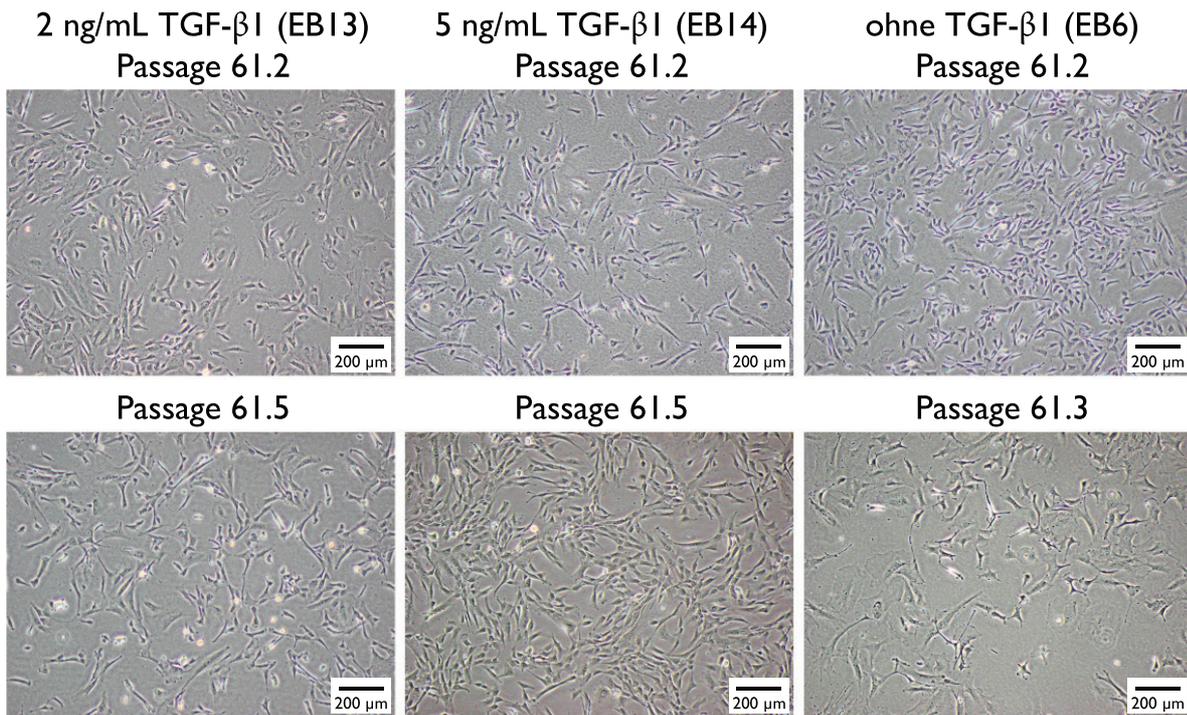


Abbildung 4.22: Exemplarische Fotos von (iPS-MSC-)Kulturen in Passage 61.2 und 61.5, welche mittels EB-Methode und mit Zugabe von 2 ng/mL (links, EB13) oder 5 ng/mL (Mitte, EB14) TGF- β 1 generiert wurden. Vergleichend ist die iPS-MSC-Kultur, die ohne TGF- β 1-Zugabe generiert wurde (rechts, EB6) in Passage 61.2 und 61.3 dargestellt.

verifiziert werden, ob der Einsatz von TGF- β 1 einen Einfluss auf die Differenzierungskapazität der generierten iPS-MSC hatte. Die Histologie fällt für alle Färbungen und alle induzierten Zellen positiv aus (Abbildung 4.23). Vergleichbar mit der Differenzierung von hHSC-iPS-MSC(EB) konnten mit β -GP und NaH_2PO_4 vergleichbare Alizarin Rot- und von Kossa-Färbungen beobachtet und somit ähnlich fortgeschrittene Osteogenesen angenommen werden. Dies wurde mit keiner standardmäßig generierten hCB-iPS-MSC-Kultur erreicht. Auch die Adipogenese schien in den TGF- β 1-behandelten iPS-MSC etwas weiter fortgeschritten zu sein, da mehr große Fettvesikel im Zellplasma vorlagen. Auffällig waren zudem die gefärbten Schnitte der Zellpellets (Chondrogenese). Einerseits waren die Kontrollpellets größer als die der induzierten Pellets. Andererseits fielen die Färbungen beider Populationen vergleichbar stark aus. Sowohl die Alcianblau- als auch die Safranin O-Färbung waren nicht nur bei den induzierten Zellen, sondern auch bei den Kontrollen positiv. Die histologischen Ergebnisse der anderen Kontrollzellen fielen überwiegend negativ aus (von Kossa, Alizarin Rot, Oil Red O). Lediglich bei der BODIPY-Färbung wurden einzelne grün fluoreszierende Zellen beobachtet, sodass bei diesen Zellen scheinbar eine spontane adipogene Differenzierung stattgefunden hatte.

Diese Befunde wurden zusätzlich auf mRNA-Niveau überprüft (Abbildung 4.24). Als osteogene Marker wurden ALPL, IBSP, Kollagen I α 1 und Osteopontin analysiert. Als Marker der Adipogenese wurden FABP4 und PPAR- γ und als Marker der Chondrogenese wurden Aggrecan, Kollagen II α 1 und SOX9 herangezogen.

Die osteogen induzierten Zellen zeigten trotz stark positiver Färbungen keine signifikante Heraufregulation der entsprechenden Gene verglichen mit den Kontrollzellen.

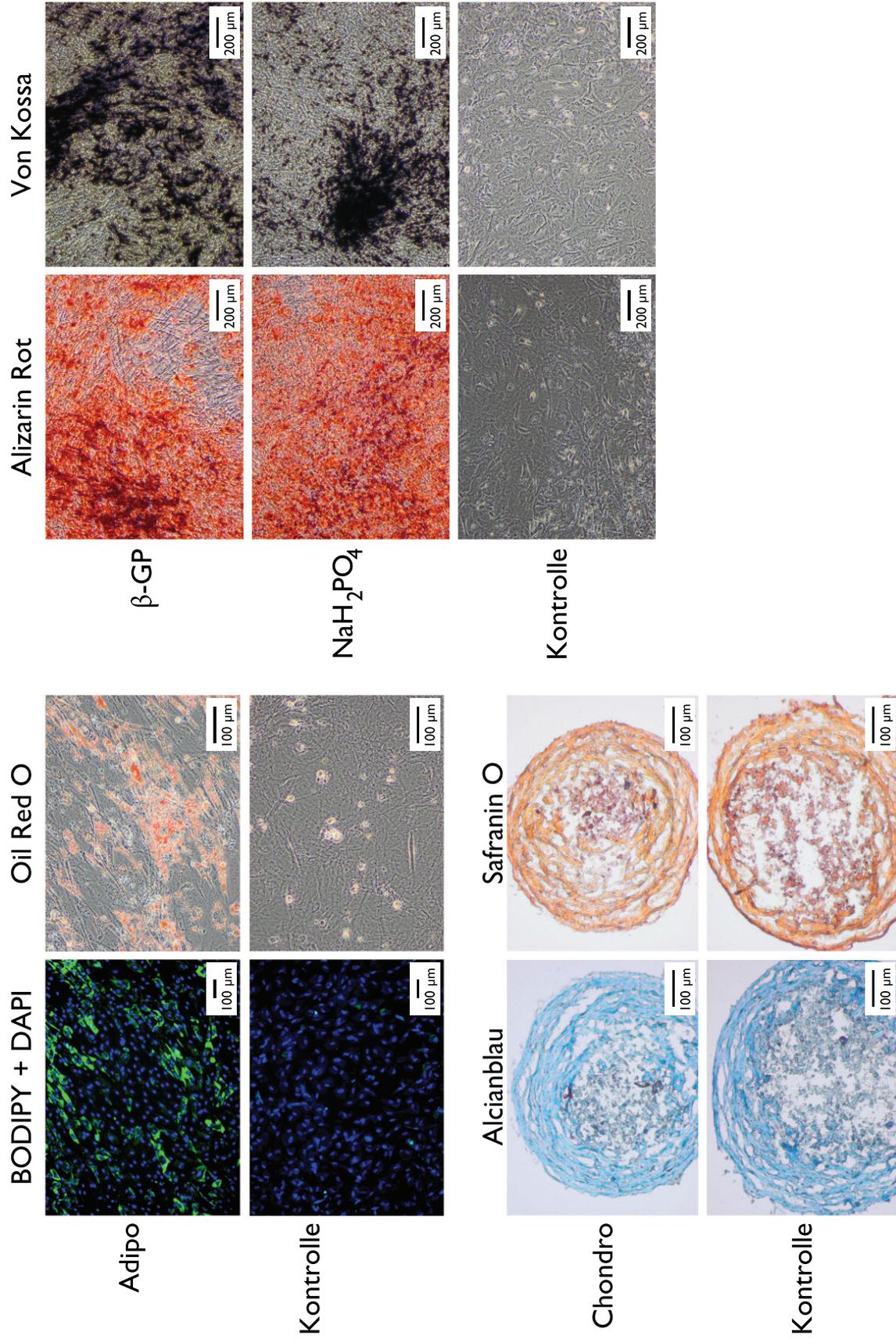


Abbildung 4.23: Ergebnisse der histologischen Färbungen nach adipogener, osteogener und chondrogener Induktion von hCB-iPS-MSC(EB) in Passage 61.7. Diese iPS-MSC wurden zuvor mit 5 ng TGF-β1 pro mL iPS-MSC-Medium generiert (Experiment EB14).

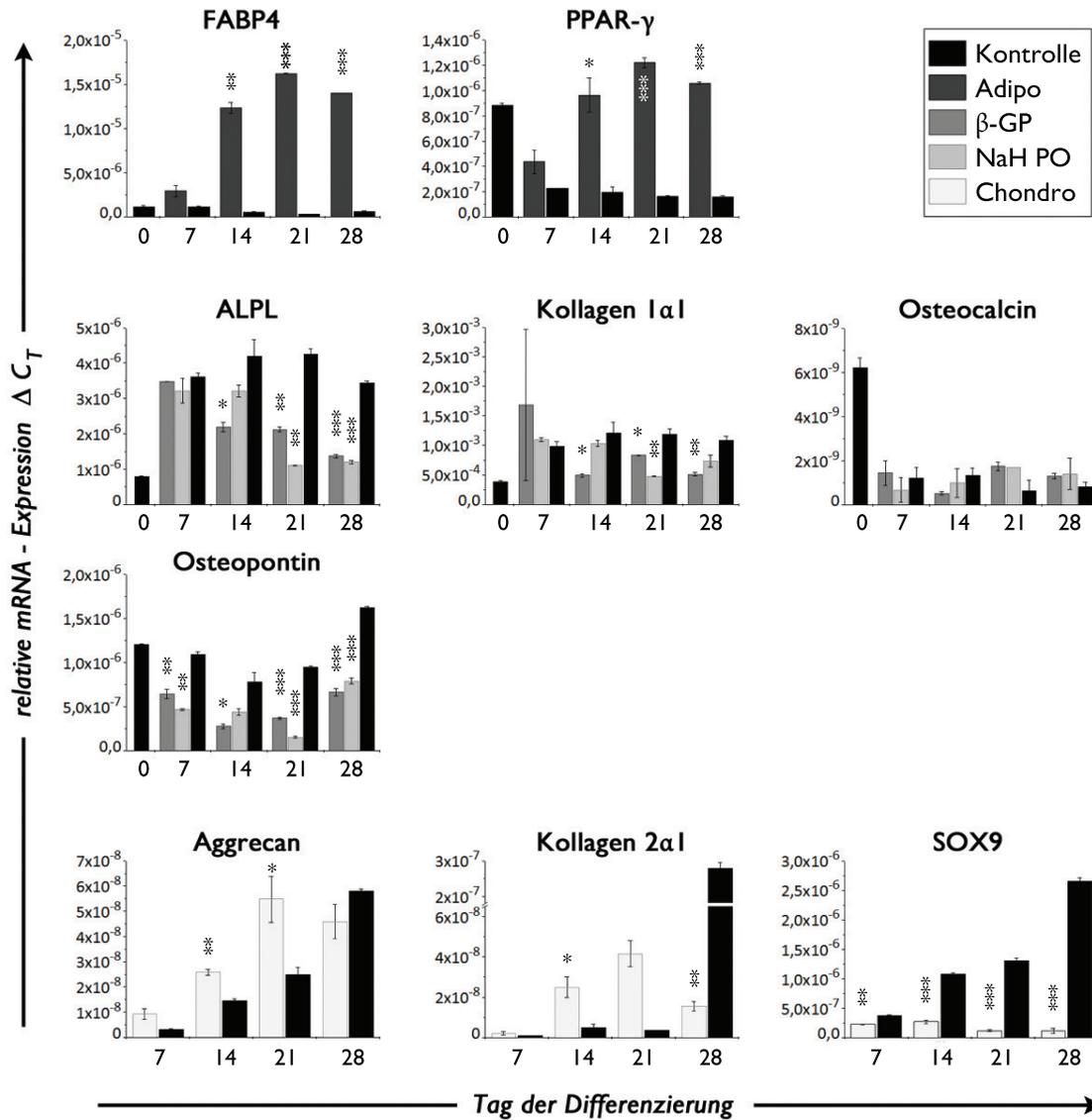


Abbildung 4.24: Ergebnisse der qRT-PCR-Analysen nach mesodermaler Differenzierung der mit 5 ng/mL TGF- β 1 generierten iPS-MSC. Dargestellt sind die relativen mRNA-Expressionen der adipogenen Marker FABP4 und PPAR- γ (oben), der osteogenen Marker ALPL, Kollagen I α 1, Osteocalcin und Osteopontin (mitte) sowie die chondrogenen Marker ACAN, COL 2 α 1 und SOX9 (unten). Für die cDNA-Synthese wurden random-Primer und als Haushaltsgen wurde 18S-rRNA verwendet. Signifikanzen wurden in Bezug auf die entsprechenden Kontrollen des jeweiligen Tages berechnet. * : $p \leq 0,05$; ** : $p \leq 0,01$; *** : $p \leq 0,001$.

Häufig lag die Expression der induzierten Zellen signifikant unter den Werten der Kontrollzellen. Unterschiede zwischen der osteogenen Induktion mit β -GP und der mit NaH_2PO_4 wurden ebenfalls nicht festgestellt.

Bei der Adipogenese waren hingegen signifikante Expressionssteigerungen ersichtlich. Die FABP4-Expression der adipogen induzierten Zellen nahm deutlich zu und war gegenüber den Kontrollen nach vierwöchiger Induktion 22-fach hochreguliert. Bei PPAR- γ wurde eine siebenfach höhere Expression in den differenzierten Zellen verzeichnet. Das Expressionsmaximum beider Gene schien nach dreiwöchiger Induktion erreicht gewesen zu sein. Ein Nachweis der oben vermuteten spontanen Adipogenese in den Kontrollzellen

len konnte nicht erbracht werden. Vermutlich war die Differenzierungsrate zu gering, um auf mRNA-Ebene detektiert zu werden.

Die Expressionen der chondrogenen Marker Aggrecan und Kollagen II α 1 stiegen ebenfalls wie die Adipogenese-Marker bis Tag 21 deutlich an und gingen in der letzten Woche wieder etwas zurück. Bei den Kontrollen nahmen die relativen mRNA-Expressionen hingegen durchgehend zu und übersiegen an Tag 28 schließlich die der induzierten Zellen. Ebenso nahm die SOX9-Expression bei den Kontrollzellen über die gesamte Zeit zu, die der induzierten Proben fiel hingegen leicht ab. Somit bekräftigten die mRNA-Daten die anhand der histologischen Ergebnisse vermutete Chondrogenese in den Kontrollpellets. Darüber hinaus schien die Differenzierung in den Kontrollen sogar fortgeschrittener zu sein als in den induzierten Zellen.

4.4.4 Generierung von iPS-MSC durch Zugabe von 17 β -Estradiol

Aufgrund der Erkenntnisse aus den Microarray-Analysen wurde ebenfalls getestet, ob das Östrogen 17 β -Estradiol einen Einfluss auf die Differenzierung von iPSC zu MSC hat (Versuch EB15). Ebenso wie bei der Differenzierung mit TGF- β 1 zuvor wurde bis einschließlich der zweiten Passage ein iPS-MSC-Medium mit 100 nM 17 β -Estradiol verwendet. Ab Passage 61.3 wurden die Zellen wie gewohnt mit MSC-GM kultiviert. Die sonstige Durchführung wurde analog zu der normalen EB-Methode beibehalten.

Bei dieser Variante der EB-Methode sahen die generierten Zellen anfangs recht vielversprechend aus. In den ersten beiden Passagen nach der EB-Phase war die Kultur zwar noch inhomogen, wies aber einige Zellen mit MSC-ähnlicher Morphologie auf (Abbildung 4.25 links). Ab der dritten Passage konnten diese allerdings nicht mehr beobachtet werden, da die Zellen viel breiter und flächiger geworden waren (Abbildung 4.25 rechts). In Passage 61.3 wurden die generierten Zellen dennoch mittels FCM analysiert (Daten

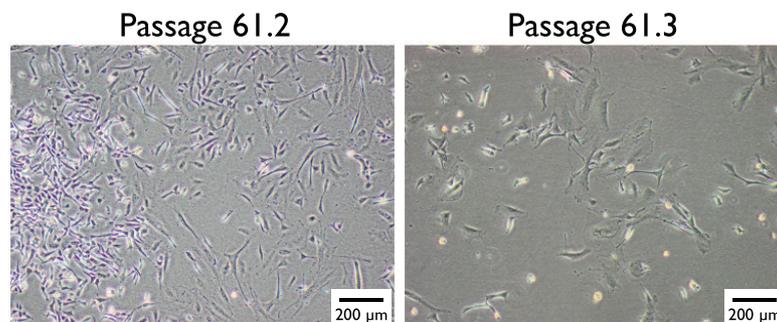


Abbildung 4.25: Exemplarische Fotos der (iPS-MSC-)Kultur in Passage 61.2 und 61.3, welche mittels EB-Methode und mit Zugabe von 100 nM 17 β -Estradiol generiert wurde.

nicht gezeigt). Trotz des Fehlens einer homogenen MSC-Morphologie entsprachen die präsentierten Oberflächenmoleküle annähernd denen der erfolgreich generierten iPS-MSC und den hBMSC (außer CD106 und SSEA-4). Lediglich CD105 wurde deutlich geringer auf der Oberfläche exprimiert als auf den zuvor generierten iPS-MSC.

4.4.5 Generierung von iPS-MSC durch Knockdown von CD24

Ausschlaggebend für den Ansatz, iPS-MSC durch den Knockdown von CD24 zu generieren, war die Erkenntnis, dass während der Differenzierung von iPSC zu MSC keine CD24⁺/CD105⁺ doppelt positiven Zellen vorkamen. Vielmehr schien die Entwicklung von CD24⁺/CD105⁻ (iPSC) zu CD24⁻/CD105⁺ (iPS-MSC) über einen

CD24⁻/CD105⁻-Übergangszustand zu verlaufen. Aus diesem Grund sollte verifiziert werden, ob durch einen Knockdown von CD24 (dieser Abschnitt) oder die Überexpression von CD105 (nächster Abschnitt 4.4.6) eine homogene MSC-ähnliche Kultur erzeugt und die Differenzierung beschleunigt werden kann.

Der Knockdown von CD24 wurde mittels lentiviral-vermittelter Transduktion induziert. Der eingesetzte Lentivirus trug eine shRNA, welche gegen CD24 gerichtet war und somit das Gen ausschaltete. Der Kontrollvirus enthielt eine shRNA ohne Zielgen, so dass ein funktioneller Effekt auf die transduzierten Zellen ausbleiben sollte. Als weitere Referenz wurden iPSC derselben Ausgangspopulation nach dem Standardprotokoll differenziert. Vor der Transfektion wurden die hCB-iPSC für die Monolayer-Versuche einmal passagiert und bis zum Erreichen der gewünschten Konfluenz kultiviert. Bei der EB-Methode wurden die Zellen in Form von EBs zwischen Tag 0 und 7 zeitgleich mit den Monolayer-Kulturen infiziert. Aufgrund der zusätzlichen GFP-kodierenden Sequenz in beiden eingesetzten shRNAs konnte unter dem Fluoreszenz-Mikroskop beobachtet werden, wie viele Zellen erfolgreich transduziert wurden. Anschließend wurden die nicht transduzierten Zellen mittels Puromycin-Selektion entfernt. Tabelle 4.5 (Seite 93) gibt einen Überblick über die durchgeführten Experimente.

In den ersten Versuchen (ML13, ML14, EB16 und EB17) wurde eine geeignete Puromycin-Konzentration zur Selektion der erfolgreich transduzierten Zellen ermittelt. In den Experimenten ML13 und EB16 wurde einen Tag nach der Infektion mit der Puromycin-Selektion begonnen (25 µg/mL). Diese Konzentration wurde bei hBMSC bereits in anderen Experimenten erfolgreich angewandt. Zwei Tage später waren allerdings alle iPSC-Zellen abgestorben. Vermutlich war das Puromycin zu hoch konzentriert oder zu früh eingesetzt worden, so dass eine Puromycin-Resistenz der erfolgreich transduzierten Zellen noch nicht aufgebaut werden konnte. Aus diesem Grund wurde im zweiten Ansatz (Experimente ML14 und EB17) nach entsprechender Infektion zunächst mit einer Puromycin-Konzentration von 5 µg/mL im Medium begonnen. Diese Konzentration war jedoch nicht ausreichend, die Zellen der Monolayer-Kultur waren trotz Puromycin-Zugabe annähernd konfluent, wobei aber nur vereinzelte Zellen fluoreszierten. Bei den EBs konnte keine Veränderung beobachtet werden. Daher wurde die Puromycin-Konzentration auf 12,5 µg/mL erhöht. Danach konnte in der EB-Kultur immer noch keine Veränderung beobachtet werden. In der ML-Kultur hatte die Anzahl der fluoreszierenden Zellen etwas zugenommen, war aber immer noch sehr gering. Zudem war der Zellrasen immer noch konfluent, so dass die Puromycin-Konzentration erneut verdoppelt wurde (25 µg/mL).

In den darauffolgenden Tagen starben viele Zellen der ML-Kultur ab, jedoch konnten auch einige adhärenzte und fluoreszierende Zellen beobachtet werden. Die Zellen, die mit der shRNA gegen CD24 transduziert wurden, wiesen eine ausgeprägte langgestreckte und zum Teil spindelförmige Struktur auf (Abbildung 4.26 A). Die Morphologie der mit dem Kontrollvirus behandelten Zellen war etwas inhomogener, zum Teil wurden aber auch hier langgestreckte und MSC-ähnliche Zellen beobachtet. CD24⁻ und Kontroll-Zellen proliferierten sehr langsam, so dass die Zellen erst 21 Tage nach der Infektion das erste mal wieder passagiert werden konnten. Zu diesem Zeitpunkt waren bei beiden Kulturen nur noch wenige MSC-ähnliche Zellen erkennbar (Abbildung 4.26 A unten). Nach dem Passagieren wuchsen nur vereinzelt Zellen an. Da diese kaum noch proliferierten, wurde der ML-Versuch an dieser Stelle beendet. Bei den parallel kultivierten Embryoid Bodies waren zwei Wochen nach dem Umsetzen in gelatinierte Zellkulturfla-

schen weder in der CD24- noch der Kontroll-Kultur Zellen am Flaschenboden adhäriert. Daher wurde dieser Teil des Experimentes ebenfalls beendet.

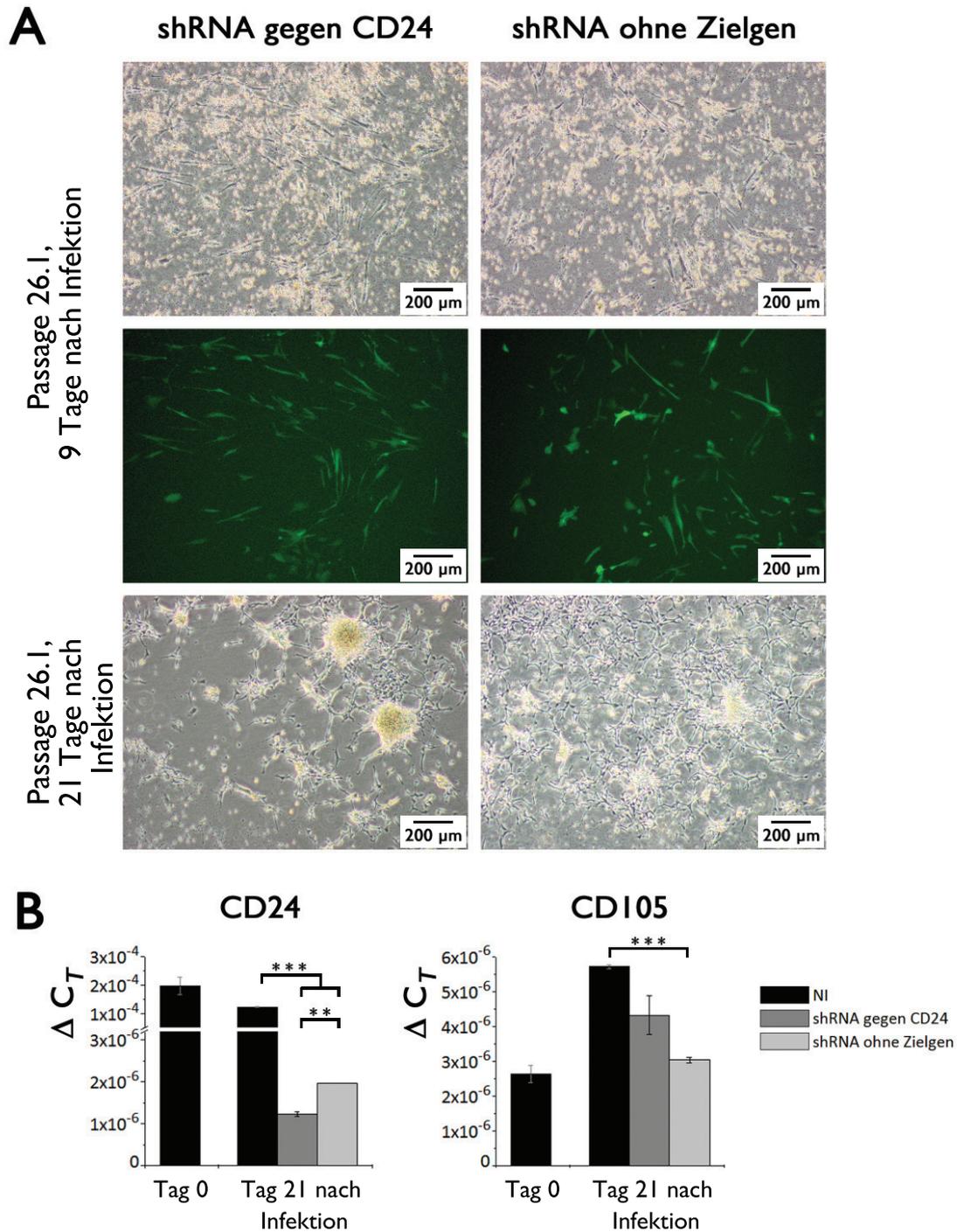


Abbildung 4.26: Ergebnisse des CD24-Knockdown. Dargestellt sind die exemplarische Phasenkontrast- (oben, unten) und Fluoreszenz-Fotos (mitte) 9 und 21 Tage nach der Lentivirus-Infektion (A). Die transduzierten Zellen fluoreszieren grün und weisen meist eine langgestreckte und spindelförmige Morphologie auf. Weiterhin zeigen die relativen Genexpressionsdaten (ΔC_T) von CD24 und CD105 vor und 21 Tage nach der Infektion, dass CD24 durch den Knockdown herunterreguliert, CD105 aber nicht gleichzeitig heraufreguliert wurde (B). Für die cDNA-Synthese wurden random-Primer und als Haushaltsgen wurde 18S-rRNA verwendet.

Vor der Passage, 21 Tage nach der Virusinfektion, wurden mRNA-Proben der CD24-, der Kontroll- und der nicht infizierten Kulturen genommen. Die Genexpressionen von CD24 und CD105 wurden mittels quantitativer RT-PCR analysiert. Dabei wurde eine signifikante Reduktion der CD24-Genexpression in beiden transduzierten Kulturen (CD24 und Kontrolle) gegenüber den nicht infizierten Zellen (NI) festgestellt (Abbildung 4.26 B). Die CD24-Reduktion war dabei in den Knockdown-Zellen nur geringfügig niedriger als bei den Zellen, in die eine shRNA ohne Zielgen eingebracht wurde. Somit schien der reduktive Effekt auf die Genexpression von CD24 hauptsächlich von der Virusinfektion selbst hervorgerufen worden zu sein. Zudem blieb die erhoffte Induktion der CD105-Expression aus.

Die weiteren Versuche wurden ausschließlich mit der Monolayer-Variante durchgeführt (ML15 - ML17), da bei der EB-Methode keine proliferierende Kultur generiert werden konnte. Die Durchführung von ML-Methode wurde insofern nochmals verändert, als dass die Puromycin-Selektion direkt mit 12,5 µg/mL im Medium gestartet und nur auf 25 µg/mL erhöht wurde, wenn die Selektion bei niedriger Konzentration nicht ausreichte. Das anschließende Experiment (ML15) ergab allerdings keine proliferierende Kultur, da nach dreiwöchiger Puromycin-Selektion (mit durchgehend 12,5 µg/mL) keine proliferierenden Zellen mehr adhärirt waren.

Da vermutlich nicht ausreichend Zellen erfolgreich infiziert wurden, wurde in den folgenden Experimenten (ML16, ML17) versucht, die Transduktionsrate zu steigern. Dies wurde zum einen mit der dreifachen Virusmenge (30 % [v/v] Viruslösung im Medium) in der Infektionslösung probiert (ML16). Zum anderen wurde an drei aufeinander folgenden Tagen mit der einfachen Virusmenge infiziert (ML17). Letzteres brachte keine erkennbare Erhöhung des Anteils an fluoreszierender Zellen. Im Gegenteil, die Zellen waren scheinbar beschädigt oder gestresst, sodass bereits eine Woche nach beginnender Puromycin-Selektion (durchgehend 12,5 µg/mL) keine Zellen mehr am Flaschenboden adhärirt waren. Mit der dreifachen Virusmenge konnten immerhin deutlich mehr Zellen transduziert werden. Diese wiesen allerdings keine MSC-ähnliche Morphologie auf, sondern wuchsen überwiegend als kleine runde Zellen in Zellverbänden, ähnlich den iPSC. Dabei war es unerheblich, ob die eingebrachte shRNA gegen CD24 gerichtet war oder Zielgen besaß. Schlussfolgernd konnte auch hierbei keine Differenzierung von iPSC zu MSC induziert werden.

4.4.6 Generierung von iPS-MSK durch Überexpression von CD105

Neben dem Knockdown von CD24 galt auch die Überexpression von CD105 als möglicher Induktionsfaktor für eine Generierung von iPS-MSK. Hierfür würde der benötigte Lentivirus zunächst erzeugt. Dazu wurden ein 3- und ein 4-Plasmid-System (PS) mit und ohne Natriumbutytrat verwendet. Dadurch ergaben sich vier unterschiedlich generierte Lentiviren mit gleicher kodierender Sequenz. Um zu bestimmen, welcher die höchste Gentransferrate aufwies, wurde zunächst eine Testinfektion mit humanen mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks durchgeführt. Das Ergebnis der Western Blot-Analyse ist in Abbildung 4.27 dargestellt.

CD105 ist ein Dimer aus zwei 90 kDa-Untereinheiten. Aufgrund der reduzierenden Denaturierung des Proteins mit 2-Mercaptoethanol und Natriumdodecylsulfat während der Probenvorbereitung wurde das Dimer aufgespalten. Somit entsprachen die intensiv

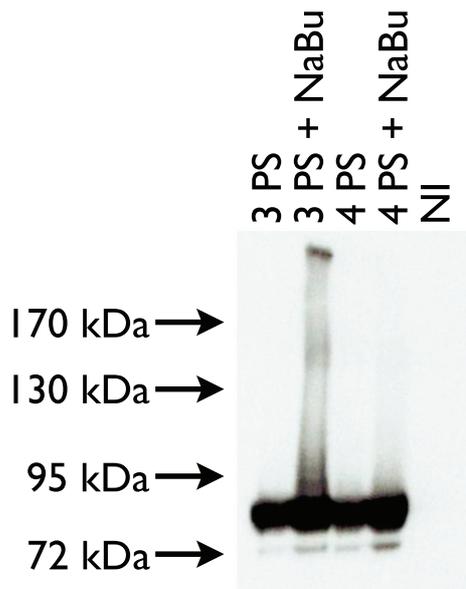


Abbildung 4.27: Western Blot-Analyse der Testinfektion von hBMSC zur Überexpression von CD105. Die Proteine wurden mit anti-HA (Kaninchen) als primärem und anti-Kaninchen als sekundärem Antikörper detektiert. Der Hyperfilm wurde 5 Sekunden belichtet. Die Bande bei etwa 90 kDa entspricht einem CD105-Monomer. 3/4-PS: 3- bzw. 4-Plasmid-System, NaBu: Natriumbutyrat, NI: Nicht infizierte Kontrollzellen.

gefärbten Banden knapp unterhalb der 95 kDa-Markierung den CD105-Untereinheiten. Die nicht infizierten Kontrollzellen zeigten wie erwartet keine Banden, so dass eine unspezifische Färbung der Antikörper ausgeschlossen werden konnte. Die Western Blot-Analysen zeigten zudem, dass die Transduktionsrate sowohl beim 3- als auch beim 4-Plasmid-System mit Natriumbutyrat gesteigert wurde. Beide Natriumbutyrat-Populationen wiesen eine ähnlich intensive CD105-Bande auf, weswegen auch von einer etwa gleich großen Infektionseffizienz ausgegangen wurde. Für die weiteren Experimente wurde schließlich der Lentivirus verwendet, welcher mittels 4-PS und Natriumbutyrat generiert wurde. Analog zu der Testinfektion wurden anschließend hCB-iPSC mit diesem Virus transduziert. Aufgrund der Erkenntnisse aus den Experimenten zum Knock-down von CD24 wurden die folgenden Experimente nur in Monolayer- und nicht in EB-Kultur durchgeführt.

Zunächst wurde überprüft, ob die lentiviral vermittelte Transduktion in iPSC ebenfalls zu einer effizienten Überexpression von CD105 führt (ML18). Als Kontrollen wurden parallel iPSC mit einem arbeitsgruppen-internen GFP-Lentivirus infiziert sowie eine Population ohne Infektion nach dem Standardprotokoll differenziert. Mit Hilfe der Zellen, die mit dem GFP-Virus transduziert worden waren, konnte die Gentransferrate abgeschätzt werden, da diese Zellen grün fluoreszierten. Diese betrug drei Tage nach der Infektion lediglich 7,8 % (10 von 129 Zellen). In den weiteren Passagen nahm die Anzahl der fluoreszierenden Zellen immer weiter ab, zwei Passagen nach der Infektion konnten nur noch vereinzelte fluoreszierende Zellen innerhalb einer Kultur beobachtet werden (CD105 und GFP). Allerdings zeigten durchflusszytometrische Analysen, dass zu diesem Zeitpunkt sowohl die mit dem CD105-Lentivirus infizierten als auch die GFP- und die nicht infizierten Kontrollzellen gleichermaßen CD105 auf der Zelloberfläche exprimierten (Daten nicht gezeigt). Zudem war die Präsentation von CD24 vermindert (etwa 30 %). Weitere drei Passagen später entsprach alle Populationen wieder einem iPSC-Phänotyp.

Mittels quantitativer RT-PCR zeigte sich allerdings, dass eine Überexpression von CD105 auf mRNA-Niveau spezifisch in den Zellen mit CD105-Lentivirus induziert wor-

den war (Abbildung 4.28). Die CD105-Genexpression stieg in der Passage der Trans-

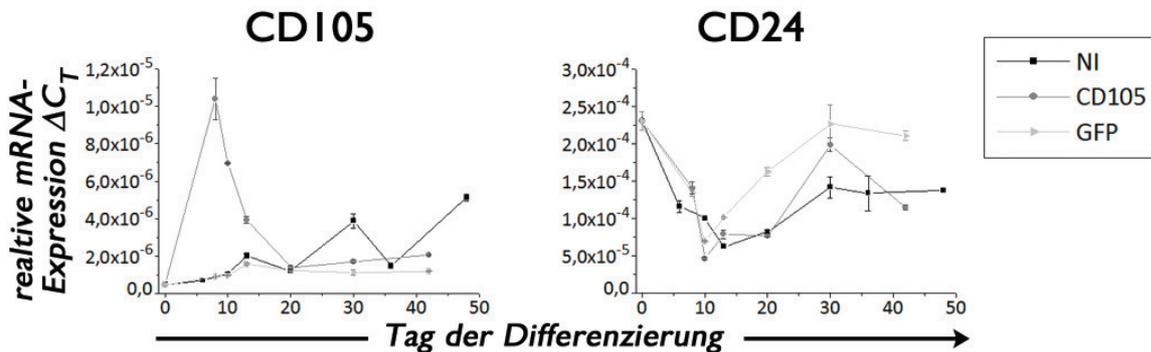


Abbildung 4.28: Genexpression von CD24 und CD105 zu verschiedenen Zeitpunkten während der Differenzierung mittels lentiviraler CD105-Überexpression. Vergleichend dargestellt sind die Messwerte der nicht infizierten (NI) iPSC sowie der Zellen nach lentiviral-vermittelter Transduktion zur Überexpression von CD105 oder GFP. Für die cDNA-Synthese wurden random-Primer und als Haushaltsgen wurde 18S-rRNA verwendet.

duktion um mehr als das 22-fache an. In beiden Kontrollpopulationen konnten hingegen keine derartigen Veränderungen detektiert werden. Die Expression von CD24 nahm zwar parallel ab, jedoch in allen drei Populationen gleichermaßen, so dass dieser Effekt nicht auf die Überexpression von CD105 zurückzuführen war. In den folgenden Passagen nahm die mRNA-Menge von CD105 wieder deutlich ab und die von CD24 wieder zu. Grund hierfür könnte eine geringere Proliferationsgeschwindigkeit der CD105-überexprimierenden Zellen gewesen sein. Bei dem Knockdown von CD24 wurde bereits festgestellt, dass erfolgreich transduzierte Zellen deutlich langsamer proliferieren als nicht transduzierte Zellen. Somit würde der Anteil an transduzierten Zellen immer weiter abnehmen.

Um diese zu verhindern, wurden die CD105-überexprimierenden Zellen im darauffolgenden Experiment mittels magnetischer Zellsortierung (MACS) aufgereinigt (ML19). Da GFP nicht auf der Oberfläche exprimiert wird und somit keine MACS-Aufreinigung anhand dieses Proteins erfolgen konnte, diente in diesem Experiment ein Lentivirus mit trunkierter CD34-Sequenz als Kontrolle [141]. Das trunkierte CD34-Protein wird auf der Zelloberfläche präsentiert, es hat jedoch keinen funktionellen Effekt, da die intrazelluläre Signaldomäne fehlt. Eine weitere Negativkontrolle stellte wiederum eine nicht infizierte iPSC-Population dar.

Die Aufreinigung mittels MACS erfolgte fünf Tage nach der Lentivirus-Infektion. Zu diesem Zeitpunkt konnten bereits einige langgestreckte MSC-ähnliche Zellen beobachtet werden (Abbildung 4.29, oberste Reihe). Insgesamt wurden 5 % der CD34(trunkiert)- und 13,8 % der CD105-Population als positiv separiert und jeweils mit etwa 2.000 Zellen pro cm^2 in gelatinisierten Zellkulturflaschen ausgesät. Bereits nach vier Tagen konnten jedoch in beiden Kulturen viele stark ausgebreitete Zellen beobachtet werden. Diejenigen, die mit dem CD105-tragenden Virus infiziert worden waren, wiesen daneben aber auch einige langgestreckte Zellen auf (markiert mit roten Pfeilen in Abbildung 4.29, 2. Reihe). In den folgenden Tagen nahm der Anteil an breiten Zellen ab, der Anteil MSC-ähnlicher Zellen nahm zu. Die CD34(trunkiert)-Kontrollpopulation wies überwiegend kleine Zellen ohne spindelförmige Morphologie auf, welche zum Teil Zellverbände bildeten und damit epithelialen Kulturen ähnelten (markiert mit roten Pfeilen in Abbildung 4.29,

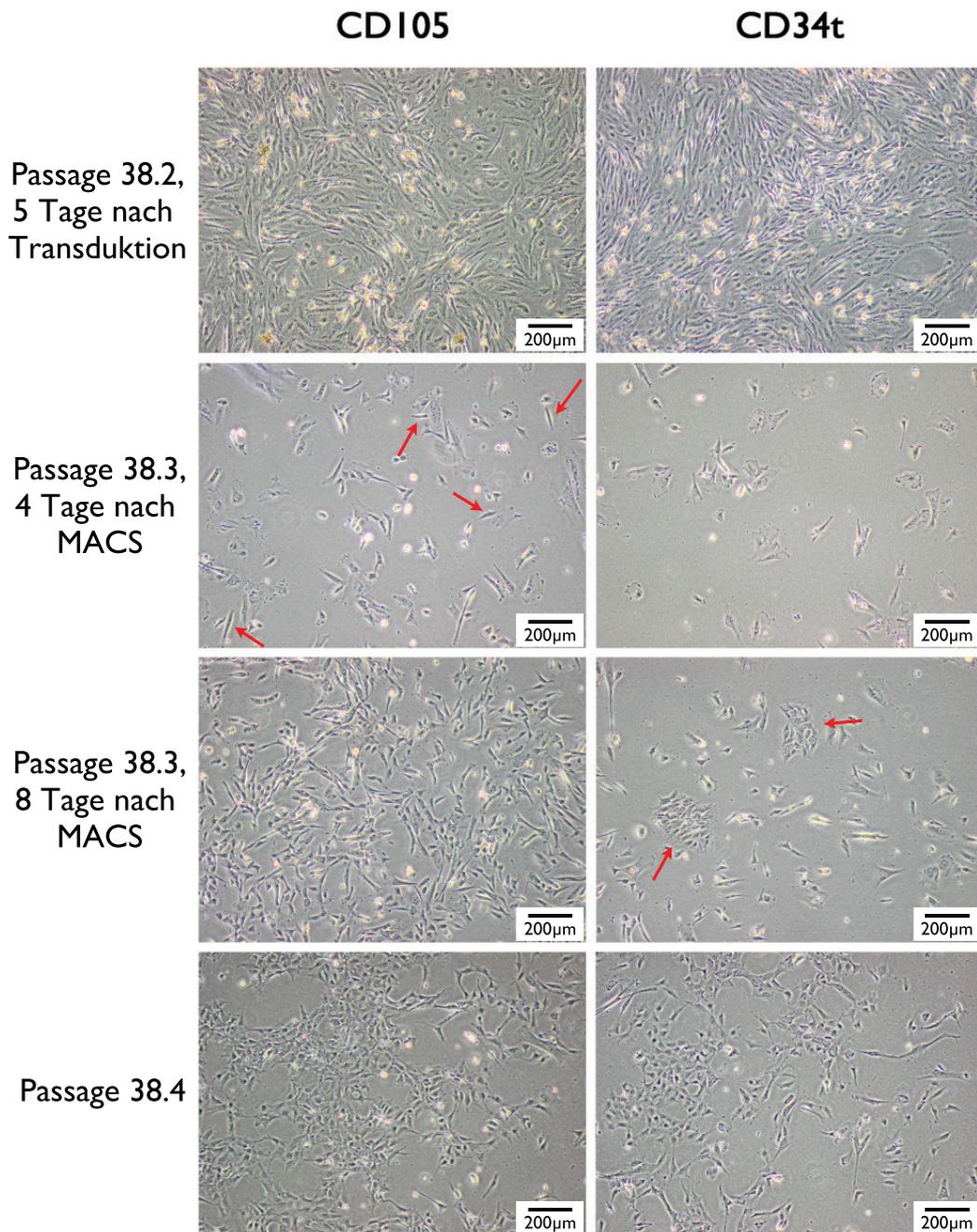


Abbildung 4.29: Zellkulturfotos der iPSC mit überexprimiertem CD105 oder trunkiertem CD34 (CD34t) vor der Sortierung mittels MACS (oben) sowie 4 bzw. 8 Tage und 2 Passagen danach.

3. Reihe). Zudem bestätigte sich der Verdacht, dass auch diese transduzierten Zellen eine reduzierte Proliferationsgeschwindigkeit aufweisen. Die Zellzahlen beider Kulturen hatten sich innerhalb von acht Tagen (nach der Sortierung) maximal verdoppelt. Ab der darauffolgenden Passage (Passage 38.4, ca. Tag 21 der Differenzierung) wiesen beide transduzierten und sortierten Populationen wieder einen einheitlichen epithelialen Charakter auf (Abbildung 4.29). Somit konnte auch mit Hilfe der MACS-Aufreinigung CD105-überexprimierender Zellen keine stabile iPSC-MSC-Kultur generiert werden.

Zusätzlich zu den morphologischen Beobachtungen wurde die Genexpressionen der transduzierten sowie der nicht infizierten iPSC mittels quantitativer RT-PCR analysiert. Exemplarisch für die Ergebnisse der Pluripotenzmarker ist CD24 in Abbildung 4.30 dargestellt. Dessen Genexpression wurde direkt nach der lentiviral-vermittelten Transduktion (von CD105 und trunkiertem CD34) herunterreguliert, stieg allerdings zwei Passagen später (Tag 19, Passage 38.4) wieder deutlich an. Ähnliche Verläufe zeigten sich auch bei beiden transduzierten Populationen in Bezug auf die Pluripotenzmarker ALPL, E-Cadherin, LIN28, OCT4 und SOX2. Entgegengesetzt dazu nahmen die Expressionen der mesenchymalen Marker CD73, CD90 und CD146 ebenfalls in beiden infizierten Populationen zunächst zu und fielen zwei Passagen später wieder ab. CD105

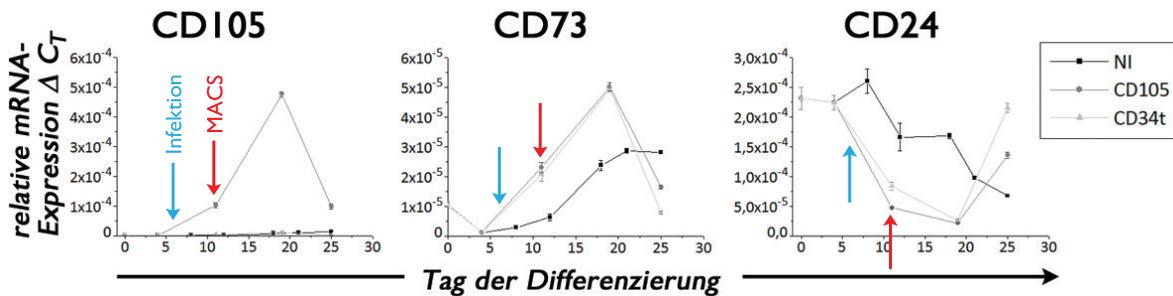


Abbildung 4.30: Relative mRNA-Expression von nicht infizierten iPSC (NI), iPSC mit überexprimiertem CD105 (CD105) oder trunkiertem CD34 (CD34t). Die Transduktion wurde an Tag 6 initiiert (blauer Pfeil) und die Sortierung mittels MACS an Tag 11 durchgeführt (roter Pfeil). Für die cDNA-Synthese wurden random-Primer und als Haushaltsgen wurde 18S-rRNA verwendet.

wurde hingegen ausschließlich in den Zellen heraufreguliert, die mit dem CD105-Virus infiziert wurden. In beiden Kontrollpopulationen blieb die Expression durchgehend auf einem sehr niedrigen Niveau. Neben CD105 ist in Abbildung 4.30 exemplarisch für den Verlauf der anderen MSC-Marker CD73 dargestellt.

Kongruent mit den morphologischen Beobachtungen nahmen somit in den ersten beiden Passagen nach der Transduktion die mesenchymalen Eigenschaften der Zellen zu. Darauf folgend entwickelten sich die Zellen aber wieder zurück zu solchen mit pluripotent-epithelialem Charakter. Aufgrund der schlechten proliferativen Eigenschaften konnten diese Erkenntnisse nicht mittels FCM verifiziert werden.

5 Diskussion

5.1 Analyse und Bewertung von iPSC als gleichbleibende Zellquelle und zur Erzeugung mesenchymaler Zelltypen

5.1.1 Bewertung verschiedener iPSC-Populationen als gleichbleibende Zellquelle

Zunächst wurden die verwendeten induzierten pluripotenten Stammzellen dahingehend analysiert, ob sie als gleichbleibende Zellquelle zur Erzeugung mesenchymaler Zelltypen geeignet sind. Eine konstante Qualität ist besonders für die Reproduzierbarkeit wissenschaftlicher Experimente sowie für einen potentiellen klinischen Einsatz von höchster Bedeutung. Neben dem Einfluss des Kultivierungsuntergrunds (Matrigel oder Feeder-Zellen) wurden humane iPSC unterschiedlichen Ursprungs (Endothelzellen aus dem Nabelschnurblut, Hämatopoetische Stammzellen, Vorhautfibroblasten) und in verschiedenen Passagen analysiert. Diesbezüglich wurden die Oberflächenantigene und mRNA-Genexpressionen typischer pluripotenter und mesenchymaler Marker untersucht. Anhand dieser Analysen ist ein Einfluss der Kultivierungsdauer, der Kultivierungsbedingungen und des Ursprungsgewebes auf die iPSC sehr wahrscheinlich.

Einfluss der Kultivierungsdauer

Anhand der durchflusszytometrischen Daten zeigte sich, dass große Schwankungen bei der Präsentation typischer Pluripotenzmarker (SSEA-3, SSEA-4, SSEA-5, TRA-1-60) sowie einiger positiver MSC-Marker (CD13, CD44, CD73, CD105, CD146, CD271) in Abhängigkeit der Passage der Zellen auftraten. Die mit Pluripotenz assoziierten Antigene wurden zudem häufig nicht zu 100 % auf den iPSC exprimiert, wie es üblicherweise publiziert ist [25, 143, 144]. Lediglich CD24 stellte mit durchgehenden Expressionswerten von annähernd 100 % einen konstanten pluripotenten Marker auf allen iPSC dar, unabhängig von Passage, Ursprung und Kultivierung. Annähernd konstante Oberflächenpräsentationen konnten für die Antigene CD14 (<1 %), CD34 (<4 %), CD45 (<1 %), CD90 (>90 %) und CD106 (<5 %) beobachtet werden. Auf mRNA-Niveau fielen die Schwankungen bei NANOG, CD44, CD73, CD105 und CD146 sehr stärker aus (bis zu einem Faktor von 210 bei CD73, ansonsten unter 25).

Die besonders großen Schwankungen konnten für die meisten Oberflächenmoleküle und exprimierten Gene im Rahmen einer Langzeitkultivierung von hCB-iPSC genauer analysiert werden. In dieser Studie wurden die Zellen innerhalb von 28 Passagen (Passage 34 bis 61) bzw. fünf Monaten mehrfach analysiert (Abbildung 4.3). Es zeigte sich eine Abnahme von CD13, CD44, CD56, CD73, CD146, CD271, SSEA-3 und TRA-1-60 mit zunehmender Kultivierungsdauer auf Protein- und/oder mRNA-Ebene. Gleichzeitig nahm die Genexpression der Pluripotenzmarker OCT4, E-Cadherin, LIN28 und SOX2 über diese Zeit zu.

Mögliche technische oder methodische Gründe für die Schwankungen konnten ausgeschlossen werden, da vergleichbare Resultate z.B. für CD44, CD73 und CD146 auf Protein- und auf mRNA-Niveau beobachtet und dafür zwei unabhängige Messmethoden angewandt wurden. Eine weitere mögliche Ursache könnten kultivierungsbedingte Einflüsse gewesen sein. Diese wurden jedoch so gering wie möglich gehalten, indem eine mRNA-Probennahme bzw. FCM-Messung der Zellen immer bei möglichst einheitlicher Konfluenz erfolgte. Somit ist ein direkter Einfluss der Kultivierungsdauer bzw. des Alters der iPSC auf die Oberflächenantigene sowie die Genexpression sehr wahrscheinlich.

Die anschließend durchgeführten Differenzierungsexperimente von iPSC zu MSC (Abschnitt 4.2) zeigten, dass die unterschiedlichen Genexpressionen und Oberflächenmarker keinen messbaren Einfluss auf die Differenzierungskapazität in mesenchymale Richtung hatten. Es konnten hCB-iPSC zwischen Passage 42.0 und 61.0 erfolgreich mittels EB-Methode zu MSC differenziert werden. Unter Verwendung der ML-Methode ist dies lediglich mit iPSC der Passagen 42.0 und 45.0 geglückt. Weitere Differenzierungsversuche mit Zellen in ähnlichen Passagen (41.0, 42.0, 48.0) gelangen jedoch nicht. Somit kann kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Alter der iPSC und einer erfolgreichen Differenzierung hergestellt werden.

Einfluss der Kultivierungsbedingungen

Für eine längere Kultivierung werden iPSC sehr häufig auf murinen Fibroblasten als Feeder-Zellen kultiviert. Diese sind aber problematisch im Hinblick auf eine klinische Anwendung, in der xenogene (artfremde) Zellen nicht eingesetzt werden dürfen. Zudem kann ein Einfluss der Feeder-Zellen auf die Forschungsergebnisse nicht ausgeschlossen werden, wodurch die Vergleichbarkeit von Forschungsergebnissen verschiedener Arbeitsgruppen erschwert wird. Als Alternative für die Anwendung *in vitro* hat sich in den letzten Jahren das Matrigel, ein Basalmembran-Präparat, herauskristallisiert [145, 146]. Dessen Einfluss auf die *in vitro*-Kultur induzierter pluripotenter Stammzellen wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

Es zeigte sich, dass innerhalb einer iPSC-Population Unterschiede zwischen den Zellen, die auf Feeder-Zellen und jenen die auf Matrigel kultiviert wurden, bestehen. Sowohl bei den präsentierten Oberflächenantigenen als auch den Genexpressionsdaten wurden typische Positivmarker für mesenchymale Zellen (CD44, CD73, CD90, CD105, CD146, CD271) durchschnittlich stärker in den Matrigel-Populationen exprimiert. Demgegenüber waren die Werte der Pluripotenz-assoziierten Oberflächenmarker (SSEA-3, -4, -5 und TRA-1-60) in den Feeder-Populationen erhöht.

Diese Ergebnisse können damit erklärt werden, dass pluripotente Stammzellen in Feeder-freier Kultur dazu neigen, spontan eine epithelial-mesenchymale Transition einzugehen [107, 111]. Untersuchungen haben gezeigt, dass dies vor allem in den Randbereichen wachsender iPSC-Klone geschieht und dabei Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften auftreten.

Einfluss des Ursprungsgewebes

Mit der Möglichkeit induzierte pluripotente Stammzellen zu generieren, war es gelungen, theoretisch jede beliebige somatische Zelle wieder in einen undifferenzierten Zustand zurück zu versetzen. Zunächst wurde angenommen, dass alle iPSC gleich sind. Mit den

Jahren kristallisierte sich jedoch immer mehr heraus, dass dem nicht so ist [147]. Die für diese Arbeit verwendeten iPSC-Populationen wurden aus unterschiedlichen somatischen Zellen (Endothelzellen aus dem Nabelschnurblut, hämatopoetische Stammzellen, Vorhaut-Fibroblasten) viral unter Verwendung der Thomson-Faktoren (OCT4, SOX2, NANOG und KLF4) generiert.

Bei dem Vergleich dieser iPSC-Populationen fiel auf, dass hFF-iPSC deutlich weniger Pluripotenz-assoziierte Marker auf der Zelloberfläche präsentierten als die anderen beiden Populationen. Auf molekularer Ebene konnten diese Unterschiede allerdings nicht beobachtet werden, da die Genexpressionswerte sowohl bei den Pluripotenz- als auch den MSC-Markern bei allen Populationen auf einem vergleichbaren Niveau waren. Ob die geringere Präsentation der pluripotenten Oberflächenantigene einen Einfluss auf die Pluripotenz der Zellen hatte, kann nicht beurteilt werden, da keine Untersuchungen bezüglich der Differenzierbarkeit in Zellen aller drei Keimblätter durchgeführt wurden (z.B. Induktion von Teratomen). Allerdings wurden derartige Tests, nach bestem Wissen der Autorin, in der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Ulrich Martin und Dr. Robert Zweigerdt nach der Generierung der iPSC durchgeführt, sodass von einer guten Qualität dieser Zellen ausgegangen werden konnte. In den später durchgeführten Generierungsexperimenten von iPSC-MSC konnte jedoch mit den hFF-iPSC keine Differenzierung zufriedenstellend abgeschlossen werden. Bei beiden durchgeführten Differenzierungen (mit und ohne Wachstumsfaktoren) traten während der EB-Phase rhythmisch kontrahierende Zellen auf. Derartiges wurde bei hCB- und hHSC-iPSC nicht beobachtet. Insgesamt wurden die besten Differenzierungsergebnisse mit hHSC-iPSC erzielt. Bei deren Generierung war es in einem Fall gelungen, die iPSC-MSC über 20 Passagen zu kultivieren, ohne dass großflächige morphologische Veränderungen oder ein Verlust der Homogenität auftraten. Bei den meisten hCB-iPSC-MSC wurden derartige Veränderungen drei bis neun Passagen nach erfolgreicher Generierung beobachtet.

Werden all diese Erkenntnisse resümierend betrachtet, kann nicht davon ausgegangen werden, dass jede iPSC-Zelllinie gleich ist. Dabei spielen sowohl das Alter und die Kulturbedingungen als auch das Ursprungsgewebe der iPSC eine Rolle. Diese können die Zelleigenschaften auf molekularer oder Proteinebene beeinflussen. In den durchgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, dass selbst iPSC einer Zelllinie als vergleichbare, aber nicht exakt gleiche Zellquellen angesehen werden können.

In diesem Zusammenhang konnten Gaoyang Liang und Yi Zhang 2013 zeigen, dass genetische und epigenetische Unterschiede zwischen iPSC verschiedener Zelllinien, aber auch zwischen Zellen innerhalb einer Population oder in verschiedenen Passagen bestehen [147]. Des Weiteren hat sicherlich auch die Reprogrammierungsmethode und die Wahl der Reprogrammierungsfaktoren einen Einfluss auf die Eigenschaften der iPSC. Kim *et al.* zeigten beispielsweise, dass die DNA-Methylierung in frühen Passagen der iPSC an das charakteristische Muster der Ausgangszellen erinnert, wenn eine Faktor-basierte Reprogrammierung angewandt wird [43]. Dies wird auch als „*epigenetic memory*“ bezeichnet und kann zu veränderten Zelleigenschaften führen. Da die lenti-virale Reprogrammierung zu diesen Faktor-basierten Methoden gehört, ist es durchaus möglich, dass die ermittelten Unterschiede zwischen hCB-, hHSC- und hFF-iPSC auf diesen „*epigenetic memory*“-Effekt zurückzuführen sind. Diese Vermutung sollte in zukünftigen Experimenten durch die Analyse und Verwendung unterschiedlich generierter iPSC untersucht werden. Daneben wäre auch eine Spenderabhängigkeit (z.B.

durch Mutationen im Genom mit zunehmendem Alter) denkbar. Allgemein betrachtet ist die Vielfalt der bestehenden iPSC-Zelllinien sowie der Reprogrammierungsmethoden schon jetzt sehr groß und sie wächst stetig weiter. Daher ist es schwer, allgemeingültige Aussagen für alle iPSC-Populationen zu treffen.

5.1.2 Direkte mesodermale in vitro-Differenzierung von hCB-iPSC

Um das Potential von iPSC zur direkten Erzeugung mesenchymaler Zelltypen zu beurteilen, wurden hCB-iPSC von Feeder-Zellen und von Matrigel über vier Wochen adipogen, osteogen und chondrogen induziert. Die adipogenen und osteogenen Differenzierungen wurden in Monolayerkultur, die Chondrogenese als dreidimensionaler Pelletkultur durchgeführt. Anschließend wurden histologische Analysen durchgeführt sowie Änderungen der Genexpression in Bezug auf die jeweilige induzierte Differenzierung und typische Pluripotenzmarker ermittelt.

Bei der chondrogenen Induktion war auffällig, dass sich die Zellen nicht ausreichend abrundeten, sodass hierbei keine Untersuchungen der Histologie möglich waren. Dieser Befund deutete darauf hin, dass die Differenzierung in chondrogene Richtung bei den verwendeten hCB-iPSC nicht gut funktioniert. Diese Vermutung wurde durch Genexpressionsanalysen bekräftigt, da lediglich eine beginnende Chondrogenese bei den Zellen von Matrigel vermutet werden konnte. Die adipogenen und osteogenen Differenzierungen beider iPSC-Kulturen (Matrigel, Feeder) zeigten sowohl bei den histologischen als auch den mRNA-Analysen positive Ergebnisse. Allgemein sind iPSC demnach in der Lage, sich direkt zu Adipozyten oder Osteoblasten zu entwickeln. Das Problem hierbei stellte allerdings die Tatsache dar, dass offenkundig nur ein geringer Anteil der Zellen nach vier Wochen erfolgreich differenziert war. Die qRT-PCR-Daten aller Differenzierungen zeigten einen Rückgang typischer Pluripotenzmarker, sodass von einem weitestgehenden Verlust der pluripotenten Eigenschaften ausgegangen werden kann.

Für einen klinischen Einsatz sind die direkt mesodermal differenzierten Zellen jedoch nicht geeignet. Da keine (chondrogen) oder nur wenige (adipogen und osteogen) differenzierte Zellen auftraten, müssten diese Zellen aufgereinigt werden. Die Transplantation nicht identifizierter oder gar verbliebener pluripotenter und damit onkogener Stammzellen kann zu großen gesundheitlichen Schäden des Patienten führen und muss daher ausgeschlossen werden. Eine Separation der erfolgreich differenzierten Zellen ist allerdings schwierig, da diese meist im Verbund und nicht als isolierte Zellen wachsen. Dies ist bisher noch nicht zufriedenstellend gelungen. Aus diesem Grund ist es sinnvoll, die iPSC zunächst zu MSC zu differenzieren [148, 149].

5.2 Generierung und Charakterisierung von iPSC-MSc mittels EB- und ML-Methode

Für die Differenzierung von iPSC zu MSC werden von den meisten Forschergruppen entweder eine Monolayer- oder eine Embryoid Body-Methode verwendet. Um zu ermitteln, welche dieser Differenzierungsmethoden geeigneter ist, wurden zunächst hCB-iPSC von Matrigel mittels ML- und EB-Methode zu mesenchymalen Zellen differenziert. In späteren Experimenten wurden zudem hHSC- und hFF-iPSC zu MSC differenziert, um zu überprüfen, ob mit diesen Ausgangszellen ähnliche Ergebnisse erzielt werden

können. Zusammenstellungen der Ergebnisse sind in den Tabellen 4.2 (Seite 67) und 4.3 (Seite 81) zu finden.

Vergleich der Differenzierungsmethoden zur Generierung von iPS-MSC

Bei der allgemeinen Untersuchung der beiden Differenzierungsmethoden mit hCB-iPSC zeigte sich, dass die EB-Methode geeigneter war als die Monolayer-Methode. Dafür sprechen vor allem

- die deutlich kürzere Generierungszeit bis zum Erreichen einer (annähernd) homogenen und fibroblastoiden MSC-ähnlichen Morphologie (EB: ca. 3 Wochen, ML: ca. 6 Wochen),
- die ausgesprochen bessere Erfolgsquote (EB: 83 %, ML: 22 %) und
- eine morphologisch homogenere iPS-MSC-Kultur.

Ausschlaggebend für die kürzere und erfolgreichere Generierung mittels EB-Methode war vermutlich die EB-Phase selbst. Die abgerundeten Zellaggregate erinnern stark an die natürliche embryonale Entwicklung. *In vivo* werden die Zellen aller drei Keimblätter in der Blastozyste unter hypoxischen Bedingungen (<6 % Sauerstoff) gebildet, welche nachweislich auch die Differenzierungen *in vitro* fördern können [150–153]. Gerade für die Entwicklung der Zellen des Mesenchyms, welche in den inneren Bereichen der Blastozyste entstehen [96], ist eine sauerstoffarme Umgebung wichtig. Die für diese Arbeit durchgeführten Differenzierungen wurden allerdings unter normoxischen Bedingungen (21 % Sauerstoff) durchgeführt. Durch Bildung der EBs entsteht im Inneren der Zellaggregate ein hypoxischer Bereich, in dem vermutlich die Generierung mesenchymaler Stammzellen – aufgrund der physiologischeren Bedingungen – begünstigt wird [63, 84, 150, 154]. Bei der Kultivierung der iPSC als Monolayer hingegen sind alle Zellen gleichermaßen den normoxischen Bedingungen ausgesetzt. Die Selektion der Plastik-adhärenenten Zellen am Ende der EB-Phase kann zudem als eine Aufreinigung der entstandenen mesenchymalen Zellen angesehen werden. Dieser Schritt ähnelt der Isolierung von genuinen MSC aus verschiedenen Geweben. Bei der ML-Methode findet kein derartiger Aufreinigungsschritt statt, wodurch möglicherweise inhomogenere iPS-MSC-Kulturen generiert wurden.

Daneben sprachen zusätzlich die einfachere Handhabung der iPSC als Embryoid Bodies und eine kostengünstigere Durchführung für die EB-Methode. Während der ersten Passagiervorgänge der ML-Differenzierungen waren die Zellen so empfindlich, dass dem Medium ROCK-Inhibitor zugesetzt werden musste. Dieser stabilisiert die Zellen in Suspension und minimiert das Risiko einer spontanen Apoptose [126], ist allerdings auch sehr kostspielig. Während der Embryoid Body-Differenzierung bestand diese Gefahr nicht, weswegen auf den ROCK Inhibitor verzichtet werden konnte.

Die Analyse des Differenzierungsprozesses von iPSC zu MSC zeigte eine Reduktion der Pluripotenz-assoziierten und eine Erhöhung der MSC-assoziierten Gene und Oberflächenproteine. Die mRNA-Analysen konnten zudem die Vermutung, dass der entscheidende Prozess zur Generierung von iPS-MSC in bzw. von der EB-Phase begünstigt wurde, bestätigen. Während dieser Phase wurden starke Expressionsabnahmen der Pluripotenzmarker detektiert. In den ersten beiden Passagen der anschließenden Monolayer-

Phase stiegen zudem die Expressionen der MSC-Marker stark an. Die Oberflächenantigene entsprachen bereits in der ersten Passage nach der EB-Phase weitestgehend einen MSC-typischen Phänotyp. Die molekularen Veränderungen während der ML-Differenzierung fanden hingegen über mehrere (> 7) Passagen statt. Die Analysen der Genexpressionen zeigten eine Reduktion der Pluripotenz-Marker sowie eine Steigerung der MSC-Marker über einen längeren Zeitraum als bei der EB-Differenzierung. Entsprechendes konnte auch bei den entsprechenden Oberflächenantigenen beobachtet werden. Mit Hilfe der durchflusszytometrisch ermittelten Daten konnten zudem zwei Populationen innerhalb der noch unvollständig differenzierten Zellkulturen detektiert werden. Die eine Population ähnelte dem Phänotyp der iPSC, die andere jenem der iPS-MSC. Dabei überwog in den ersten Passagen der Differenzierung die iPSC-ähnliche Fraktion und in den späteren Passagen nahmen die MSC-ähnlichen Zellen immer mehr zu. Daraus ließ sich schließen, dass die Differenzierung vermutlich ein Prozess ist, welcher eventuell spontan, aber auf jeden Fall innerhalb weniger Tage oder Stunden durchlaufen wird und sich die Zellen nicht langsam über mehrere Passagen einem MSC-Phänotyp annähern. Diese Vermutung wurde durch die nähere Analyse von CD24 und CD105 auf der Zelloberfläche bestärkt (Abbildung 4.10). Es zeigte sich, dass überwiegend CD24⁺/CD105⁻ (iPSC-Fraktion) oder CD24⁻/CD105⁺ Zellen (iPS-MSC-Fraktion) innerhalb der Kulturen vorlagen. Am Anfang der Differenzierung überwog die CD24-positive, am Ende die CD105-positive Fraktion. Zwischendurch konnte zudem eine kleine doppelt negative Fraktion (CD24⁻/CD105⁻) nachgewiesen werden, welche vermutlich einen Übergangszustand darstellt.

Des Weiteren zeigte sich, dass die Generierung von iPS-MSC reversibel war, solange der Prozess nicht vollständig abgeschlossen war. Ähnliche Beobachtungen konnten auch bei der Reprogrammierung von Fibroblasten zu induzierten pluripotenten Stammzellen gemacht werden [155]. Die Forscher postulierten dabei einen „*point of no return*“. Vor diesem Punkt kann eine rückläufige Entwicklung der unvollständig reprogrammierten Zellen wieder zurück zu den somatischen Ausgangszellen führen. Nach dem Punkt gibt es allerdings nur die Möglichkeit, dass die Reprogrammierung abgeschlossen wird oder die Zellen in einem Zwischenstadium hängen bleiben [155]. Ein ähnliches Szenario wäre auch bei der Generierung von iPS-MSC denkbar, wenn die Zellen der nicht erfolgreich abgeschlossenen Differenzierungen in einem vergleichbaren Zwischenstadium verblieben sind, in dem sie keine iPSC mehr, aber auch noch keine iPS-MSC sind (Abbildung 5.1).

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde ein Differenzierungsverlauf-Modell entwickelt, welches unabhängig von der angewandten Methode ist. Dieses ist in Abbildung 5.1 dargestellt. Bei der EB-Methode finden die mittleren beiden Zustände, bei denen mehrere Zelltypen nebeneinander vorliegen, vermutlich innerhalb der Embryoid Bodies statt. Wie oben vermutet, scheint die Differenzierung von iPSC zu iPS-MSC so lange reversibel zu sein, bis eine (annähernd) homogene MSC-ähnliche Kultur entstanden ist (Doppelpfeile in Abbildung 5.1). Konnten jedoch keine iPS-MSC generiert werden, oder entwickelte sich die bestehende iPS-MSC-Kultur weiter, so konnte keine (erneute) Entstehung MSC-ähnlicher Zellen beobachtet werden. Daher wird vermutet, dass letztere Prozesse irreversibel sind (einfach Pfeile in Abbildung 5.1). Sehr wahrscheinlich ist zudem, dass einige dieser Schritte durch externe Faktoren beeinflusst bzw. begünstigt werden können. In den durchgeführten Experimenten wurden zum einen dem Medium Wachstumsfaktoren (bFGF, EGF und PDGF) zugegeben und zum anderen Embryoid Bodies geformt, um die Differenzierung in mesenchymale Richtung zu forcieren. Dies

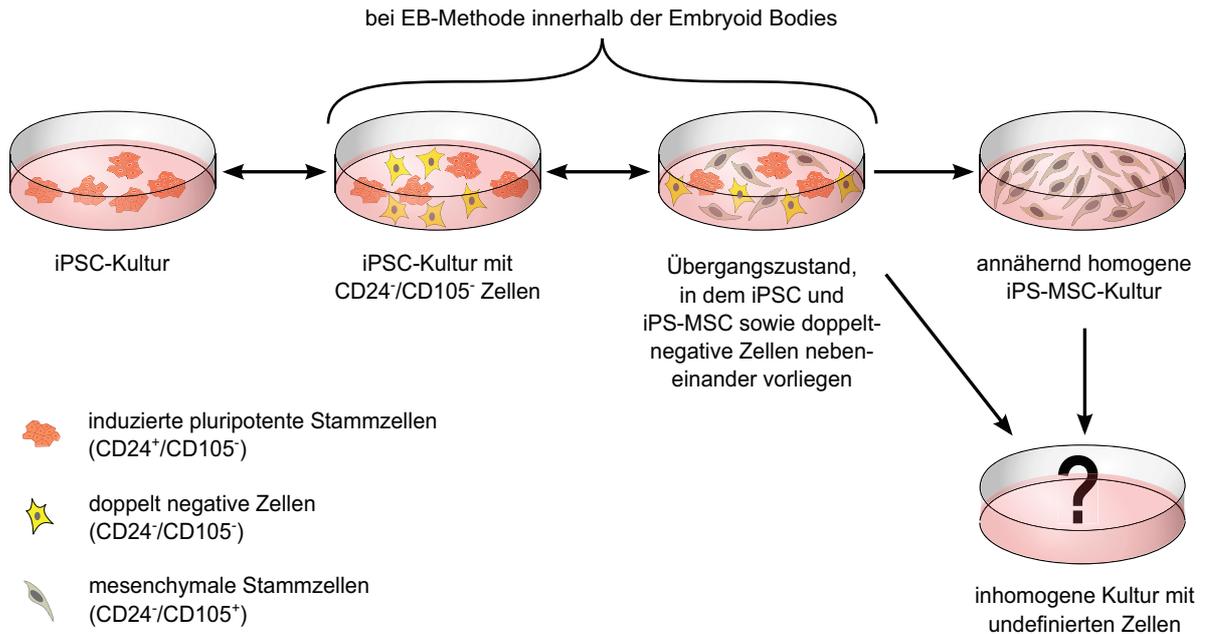


Abbildung 5.1: Postuliertes Modell zur Differenzierung von iPSC zu MSC.

sind zwei der am häufigsten verwendeten Ansätze, daneben sind aber weitere bekannt. Beispielsweise verwendeten Liu *et al.* eine faserartige Kollagen-Beschichtung, auf der nach einigen Tagen MSC-ähnliche Zellen beobachtet wurden [89]. Andere Forschergruppen nutzten das Molekül SB431542, welches den TGF- β -Signalweg inhibiert, um so die Generierung von mesenchymalen Stammzellen zu fördern [79, 104, 156]. Die eigenen Optimierungsexperimente des Differenzierungsprozesses werden in Abschnitt 5.4 diskutiert.

Der Differenzierungsprozess von pluripotenten zu mesenchymalen Stammzellen wird häufig auch als epithelial-mesenchymale Transition angesehen. Anhand der Microarray-Analysen konnte dies bestätigt werden. Zum einen wurden die Pluripotenz-Marker herunter- und die MSC-Marker heraufreguliert, zum anderen konnten EMT-spezifische Genexpressionsänderungen beobachtet werden. Allgemein zeigte sich, dass die Genexpressionsänderungen während der EB-Methode deutlich stärker ausfielen als während der ML-Methode. Dies bestätigte noch einmal die bessere Generierung von iPSC-MSC mittels EB-Methode. Eine Zuordnung des Differenzierungsprozesses zu einem der EMT-Subtypen war jedoch schwierig. Wie in Abschnitt 1.4 (Seite 12 bereits erläutert, treten die meisten Genexpressionsänderungen bei allen drei Subtypen auf. Aufgrund der Ähnlichkeit des iPSC-MSC-Generierungsprozesses und der embryonalen Entwicklung ist eine Zuordnung zum Typ 1 EMT am wahrscheinlichsten [104].

Abschließend betrachtet, konnten mit beiden Differenzierungsmethoden Kulturen mit typischen spindelförmigen Zellen generiert werden. Leider wurden daneben immer auch vereinzelte Zellen mit andersartiger Morphologie beobachtet, so dass keine 100 %ig homogenen iPSC-MSC-Kulturen entstanden sind. Zudem waren die iPSC-MSC beider Methoden sehr instabil. Die erfolgreich generierten iPSC-MSC entwickelten sich nach drei bis neun Passagen weiter, die Kulturen wurden sehr inhomogen und wiesen zum Teil

gar keine MSC-ähnliche Zellen mehr auf. Manche Kulturen zeigten breite flächige Zellen ähnlich seneszenten hBMSC, andere wiesen kleine runde oder im Verbund wachsende Zellen auf. Bei Letzteren wäre eine Rückentwicklung zu epithelialen Zellstrukturen, z.B. über eine mesenchymale-epitheliale Transition, oder eine Weiterdifferenzierung zu mesenchymalen Gewebezellen denkbar. Vermuten lässt sich in diesem Zusammenhang, dass die unphysiologischen normoxischen Kulturbedingungen (21 % O₂) der iPS-MSC dazu geführt haben. *In vitro* Experimente mit nativen MSC haben bereits gezeigt, dass die multipotenten Zelleigenschaften unter hypoxischen Bedingungen länger aufrecht erhalten bleiben als unter normoxischen Bedingungen [157, 158]. Eine Rückentwicklung zu iPSC konnte allerdings ausgeschlossen werden, da die analysierten Pluripotenz-assoziierten Marker sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene nach erfolgreicher iPS-MSC-Generierung auf einem sehr niedrigen Niveau blieben.

Generierung von hHSC- und hFF-iPSC

Nachdem festgestellt wurde, dass die EB-Methode besser für die Generierung von iPS-MSC geeignet ist als die ML-Methode, wurde erstere auch zur Differenzierung von hHSC- und hFF-iPSC verwendet. Mit beiden Populationen konnten iPS-MSC generiert werden, allerdings mit unterschiedlichem Erfolg. Im Vergleich aller iPS-MSC(EB)-Populationen war die Generierung von hHSC-iPSC am erfolgreichsten. Eine hHSC-iPS-MSC konnten über 20 Passagen kultiviert werden und wies lediglich geringe Seneszenzbedingte morphologische Veränderungen auf. In einer zweiten identisch durchgeführten Generierung mit hHSC-iPSC blieb die Kultur allerdings nur über sechs Passagen morphologisch stabil. Dies war vergleichbar mit den meisten hCB-iPS-MSC-Kulturen. Aus welchen Gründen die erste hHSC-iPS-MSC-Kultur solch eine überdurchschnittlich hohe Stabilität aufwies, konnte nicht geklärt werden. Eine Auswirkung des „*epigenetic memory*“-Effekts wäre allerdings denkbar, da sich die Ausgangs-iPSC erst in Passage 29.0 befanden und zudem eine Ähnlichkeit zwischen hämatopoetischen und mesenchymalen Stammzellen besteht.

Ganz im Gegensatz zu den hCB- und vor allem hHSC-iPSC konnten hFF-iPSC nicht gut zu MSC differenziert werden. In der EB-Phase entstanden rhythmisch kontrahierende EBs und Zellen, die stark an Kardiomyozyten erinnerten. Die erhaltene iPS-MSC-Kultur war überdurchschnittlich inhomogen und proliferierte nur langsam. In einem späteren modifizierten Differenzierungsexperiment ohne Wachstumsfaktoren traten ebenso kontrahierende Zellen auf. Außerdem ist bekannt, dass die EB-Methode besonders häufig verwendet wird, um pluripotente Stammzellen zu Kardiomyozyten zu differenzieren [69, 159, 160]. Wei *et al.* berichteten sogar von einer parallelen Generierung von Herzmuskelzellen und MSC-ähnlichen Zellen [161]. Scheinbar besitzen die verwendeten hFF-iPSC in Kombination mit der EB-Differenzierung die Präferenz, sich besonders leicht zu Kardiomyozyten zu entwickeln. Aus diesem Grund wurden mit diesen Zellen keine weiteren Experimente durchgeführt.

Vergleich der iPS-MSC mit hBMSC

Alle generierten iPS-MSC-Kulturen wurden, sofern möglich, mittels FCM und quantitativer RT-PCR nach Erreichen einer (annähernd) homogenen MSC-ähnlichen Morphologie analysiert und mit nativen hBMSC verglichen. Tabelle 5.1 fasst die durchflusszy-

tometrischen Ergebnisse von undifferenzierten iPSC, generierten hCB- und hHSC-iPS-MS-C sowie nativen hBMS-C noch einmal kurz zusammen. Aufgrund der inhomogenen und qualitativ unzureichenden hFF-iPS-MS-C-Kulturen wurden diese Zellen in der Auflistung nicht berücksichtigt.

Tabelle 5.1: Zusammenfassung der FCM-Daten typischer positiver und negativer MS-C-Marker von iPSC, hCB-iPS-MS-C(ML/EB), hHSC-iPS-MS-C(EB) und hBMS-C. ++: stark positiv, +: schwach positiv, -: negativ

	iPSC	hCB-iPS-MS-C(ML)	hCB-iPS-MS-C(EB)	hHSC-iPS-MS-C(EB)	hBMS-C
CD13	+	++	+	++	++
CD14	-	-	-	-	-
CD24	++	-	-	-	-
CD34	-	-	-	-	-
CD44	-/+	++	++	++	++
CD45	-	-	-	-	-
CD73	-/+	++	++	++	++
CD90	++	+ / +++	+	+ / +++	+ / +++
CD105	-/+	+	+	+	++
CD106	-	-	-	-	++
CD146	+	+	+	+	+
SSEA-3	+	-	-	-	-
SSEA-4	++	-	-	-	++
SSEA-5	++	-	-	-	-
TRA-1-60	++	-	-	-	-

Die generierten iPSC-MS-C wiesen ein Oberflächenexpressionsmuster auf, welches dem hBMS-C-Phänotyp sehr stark ähnelte, aber nicht mit ihm identisch war. Dabei war es unerheblich, welchen Ursprung die iPSC hatten und welche Differenzierungsmethode verwendet wurden. Abweichend von dem hBMS-C-Phänotyp konnten das Antigen CD106 und das Glykosphingolipid SSEA-4 nicht auf iPSC-MS-C exprimiert werden. Seit einigen Jahren ist allerdings bekannt, dass SSEA-4 auf mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks, der Plazenta, der Zähne und der Synovialmembran (Gelenkkapsel), nicht aber auf MS-C anderer gängiger Quellen (z.B. Fett, Nabelschnur, Nabelschnurblut) exprimiert wird [19, 129]. Ähnlich stellt es sich bei CD106 dar. Dieses Antigen wird in den verschiedensten Publikationen sowohl als positiver als auch als negativer Marker in Bezug auf mesenchymale Stammzellen beschrieben. Dabei schwanken die Angaben sogar in Bezug auf das gleiche Ursprungsgewebe, wie z.B. dem Fettgewebe [21, 90, 130]. Einigkeit scheint bei MS-C aus dem Knochenmark und der Nabelschnur zu herrschen, erstere

werden überwiegend positiv, letztere negativ für CD106 beschrieben [162, 163]. Somit stellen die Oberflächenmarker SSEA-4 und CD106 keine zwingenden MSC-Kriterien dar und deren Fehlen schließt eine erfolgreiche Generierung von iPS-MSCs nicht aus. Jedoch zeigten die Ergebnisse, dass die im Rahmen dieser Arbeit generierten iPS-MSCs nicht vollständig genuinen hBMSC entsprachen. Eine Übereinstimmung mit MSC aus der Nabelschnur wäre möglich, müsste aber in weiteren Untersuchungen näher verifiziert und beide Zelltypen parallel analysiert und miteinander verglichen werden. Auch wäre ein Zusammenhang mit dem Ursprungsgewebe der iPSC aufgrund des „epigenetic memory“-Effektes denkbar (siehe oben). Denn nicht nur für Nabelschnur-Zellen, sondern auch für (neonatale) Vorhautfibroblasten und hämatopoetische Stammzellen wurde eine „fehlende“ Expression von SSEA-4 und CD106 berichtet [162, 164].

Auf mRNA-Ebene zeigten sich ebenfalls geringe Unterschiede zwischen iPS-MSCs und hBMSC. Die Expressionen der Pluripotenz-assoziierten Gene waren in generierten und genuinen MSC auf einem vergleichbaren Niveau. Bei den mesenchymalen Markern zeigte sich allerdings, die CD105-Expression aller iPS-MSCs-Populationen (ML und EB) durchschnittlich nur ein Viertel der Expression in hBMSC betrug. Zudem wurde das hBMSC-Expressionsniveau von CD73 nur von den EB-differenzierten iPS-MSCs erreicht. Diese Erkenntnisse stimmen sehr gut mit den kürzlich publizierten Ergebnissen von Diederichs *et al.* überein. Die Forscher konnten zeigen, dass native hBMSC und iPS-MSCs des gleichen Spenders nicht identisch sind [94]. Vergleichbar mit den eigenen Daten wurden typischer MSC-Marker (CD105, CD13, CD73) in iPS-MSCs deutlich geringer exprimiert (CD105 ebenfalls nur zu 25 % verglichen mit hBMSC). Zudem reagierten die iPS-MSCs deutlich träger auf für MSC etablierte Differenzierungsprotokolle. Dieser Aspekt wurde mit den eigenen iPS-MSCs-Populationen ebenfalls überprüft und im folgenden Abschnitt diskutiert.

5.3 Beurteilung der *in vitro* Differenzierungskapazität unterschiedlicher iPS-MSCs im Vergleich zu hBMSC

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die generierten iPS-MSCs adipogen, osteogen und chondrogen differenziert, um zu überprüfen, ob diese Zellen eine mit genuinen hBMSC vergleichbare *in vitro*-Differenzierungskapazität besitzen. Die Tabelle 5.2 fasst die Ergebnisse noch einmal zusammen. Die Experimente zeigten, dass sich die meisten iPS-MSCs-Populationen *in vitro* in adipogene und osteogene, sowie, wenn induziert, in chondrogene Richtungen differenzieren ließen. In einem Experiment (iPS-MSCs aus ML1) konnte keine mesodermale Differenzierung induziert werden und in einem weiteren (iPS-MSCs aus EB5) konnten die Zellen nur adipogen und chondrogen, nicht aber osteogen, differenziert werden.

Verglichen mit hBMSC wiesen alle Populationen eine deutlich verminderte adipogene Differenzierungskapazität auf. Es wurden zwar sehr viele Fetttröpfchen im Zytoplasma gebildet, diese waren allerdings extrem klein und ohne eine histologische Färbung meist nicht erkennbar. In hBMSC waren die LD hingegen durchgehend so groß, dass die einzelnen Tropfen unter dem Mikroskop auch ohne Färbung und oft schon nach siebentägiger Induzierung zu sehen waren. Auf mRNA-Ebene zeigte sich entsprechend in den induzierten iPS-MSCs eine etwa 100-fach geringere Expression Adipogenese-typischer Gene (FABP4, PPAR- γ) als in hBMSC.

Die Induktion der Chondrogenese fiel bei allen iPS-MSC-Kulturen ebenfalls schwächer aus als bei hBMSC. Die histologischen Färbungen wurden dennoch spezifisch für die induzierten Zellen beobachtet. Die iPS-MSC-Pellets wurden während der vierwöchigen Experimente nur geringfügig größer, vermutlich weil einige Zellen innerhalb der Pellets abstarben und die Differenzierung nicht sehr stark ausgeprägt war. Damit einhergehend nahmen die mRNA-Mengen mit zunehmender Kultivierungszeit ab und es konnten vor allem für die späten Zeitpunkte (Tag 21 und 28) nur selten Genexpressionsdaten erhoben werden. Ein Vergleich mit den Daten der hBMSC sowie die Bestätigung einer erfolgreichen chondrogenen Differenzierung war auf mRNA-Niveau daher nicht möglich.

Die Ergebnisse der osteogenen Differenzierungen fielen bei iPS-MSC sowohl histologisch als auch bei der Analyse der Genexpression ähnlich gut oder sogar besser aus als die der hBMSC. Mit β -GP als Phosphat-Quelle konnte nur in hHSC-, nicht aber in hCB-iPS-MSC eine Osteogenese induziert werden, wohingegen mit NaH_2PO_4 in fast allen Experimenten ein gutes bis sehr gutes Ergebnis erzielt werden konnte. Vergleichbar unterschiedlich waren auch die Ergebnisse nativer MSC, was auf eine Spenderabhängigkeit zurückzuführen ist. Besonders unter Verwendung eines β -GP-haltigen Differenzierungsmediums war die Differenzierungskapazität der hBMSC sehr eingeschränkt [136].

Tabelle 5.2: Ergebnis der histologischen Analysen der mesenchymalen *in vitro*-Differenzierungen verschiedener hCB-, hFF- und hHSC-iPSC-MSC-Kulturen und isolierte hBMSC. + = schwach positive Färbung, ++ = stark positiv Färbung, - = keine Färbung/negativ, * keine Daten vorhanden.

Generierungsversuch	Adipo- genese	Osteo- genese	Chondro- genese
<i>hCB-iPS-MSC</i>			
ML1	-	β -GP: - NaH_2PO_4 : -	*
ML6	+	β -GP: - NaH_2PO_4 : ++	*
EB2	+	β -GP: - NaH_2PO_4 : ++	*
EB3	+	β -GP: - NaH_2PO_4 : +	+
EB5	+	β -GP: - NaH_2PO_4 : -	+
<i>hHSC-iPS-MSC</i>			
EB7	+	β -GP: ++ NaH_2PO_4 : ++	+
<i>hBMSC</i>			
	++	β -GP: -/+ / ++ NaH_2PO_4 : -/+ / ++	++

Bezüglich der verminderten Adipogenese in iPS-MSC wurden ähnliche Ergebnisse von anderen Forschergruppen beobachtet. Deren induzierte iPS- oder ES-MSC wiesen im Vergleich zu nativen MSC entweder kleinere Fettvesikel oder nur eine geringere Anzahl an differenzierten Zellen auf [79, 89, 110, 156, 165]. Ausschlaggebend dafür könnten verschiedene Gründe sein. Zum einen wäre es möglich, dass generierte iPS-MSC im Vergleich zu hBMSC allgemein schlechter in adipogene Richtung differenzieren und damit qualitativ nicht mit den genuinen Zellen mithalten können. Zum anderen unterscheiden sich native MSC unterschiedlichen Ursprungs ebenfalls in ihrem Differenzierungsverhalten. Diesbezüglich konnte gezeigt werden, dass junge MSC (z.B. aus dem Nabelschnurgewebe oder -blut, der Plazenta oder fetale MSC) *in vitro* schlechter zu Adipozyten differenzieren als adulte MSC [104]. Mit dem Hintergrund, dass pluripotente Stammzellen nur während der embryonalen und fetalen Entwicklung auftreten, ist ein Vergleich dieser Zellen sowie der generierten iPS- oder ES-MSC mit jungen MSC naheliegend.

Gemessen an den durchlaufenen Zellzyklen können die verwendeten iPS-MSC jedoch nicht mehr als „jung“ bezeichnet werden. Für diese Arbeit wurden iPSC verwendet, die bereits über mindestens 29 Passagen kultiviert worden waren. Die Zellen wurden alle fünf bis sechs Tage (meist) 1:6 gesplittet. Ausgehend von fünf Tagen Kultivierungsdauer pro Passage ergibt sich eine Verdopplungszeit von 46,4 Stunden. Diese ist vergleichbar mit Verdopplungszeiten für pluripotente Stammzellen anderer Forschergruppen (41 bis 49 Stunden) [25, 126]. Daneben wurde aber auch von Verdopplungen alle 20 bis 33 Stunden berichtet [46, 149, 166]. Dabei wurde vermutlich berücksichtigt, dass nach der Passage zunächst viele Zellen sterben, wodurch die tatsächliche Ausgangszellzahl deutlich geringer ist, als die theoretisch ausgesäte. Somit ist die effektive Verdopplungszeit pro Passage auch deutlich kürzer. Insgesamt kann daher von einer Zellteilung alle ein bis zwei Tage ausgegangen werden, woraus sich eine Verdopplungsrate von 2,5 bis 5 pro Passage ergibt. Das bedeutet wiederum, dass sich die zur Generierung von iPS-MSC verwendeten iPSC (Passage 29 oder höher) bis zu dessen Verwendung mindestens 72,5 bis 145 mal geteilt hatten. Möglicherweise lassen sich daher die generierten iPS-MSC – ähnlich wie MSC von älteren Spendern – nicht mehr in alle Richtungen gleich gut differenzieren.

Damit einhergehend ist das von Muraglia *et al.* postulierte Hierarchie-Modell eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die verminderte adipogene und chondrogene Differenzierungskapazität [167]. Nach diesem Modell verlieren MSC mit zunehmenden Zellteilungen als erstes die Eigenschaft, zu Adipozyten zu differenzieren. Danach nimmt das chondrogene Differenzierungspotential ab, aber eine Osteogenese ist auch nach vielen Zellteilungen noch problemlos möglich. Im Hinblick auf die vielen Zellteilungen während und vor allem vor der Generierung der iPS-MSC ist es durchaus denkbar, dass die verwendeten iPSC und iPS-MSC bereits einen Teil ihrer Differenzierungskapazität verloren hatten. Gegen das Hierarchie-Modell von Muraglia *et al.* spricht jedoch die Tatsache, dass bei den adipogenen Differenzierungsexperimenten annähernd alle iPS-MSC Fetttöpfchen enthielten, diese allerdings nur sehr klein geblieben sind. Somit ist das Potential, in Adipozyten zu differenzieren, durchaus vorhanden, der Vorgang verläuft im Vergleich zu hBMSC jedoch deutlich langsamer und schwächer ausgeprägt. Zukünftige Analysen müssen diesbezüglich zeigen, ob das Hierarchie-Modell auch auf iPS-MSC angewandt werden kann.

Neben den jeweiligen Differenzierungsmerkmalen wurde zudem überprüft, ob sich

während der Differenzierungen iPS-MSC zu iPSC zurück entwickelt haben. Es zeigte sich, dass die Genexpressionen der meisten Pluripotenz-assoziierten Gene innerhalb der vierwöchigen Induktionen auf gleichem Niveau blieb oder weiter abnahm. Die Werte der Alkalischen Phosphatase stiegen zwar mit zunehmender Differenzierungsdauer an, dieses Gen wird jedoch allgemein während einer Osteogenese hochreguliert. Außerdem wiesen SOX2 und CD24 nach vierwöchiger adipogener Differenzierung erhöhte Werte gegenüber den Kontrollen auf. Hierzu ist seit wenigen Jahren bekannt, dass CD24 in Vorläufer-Fettzellen erhöht ist [137, 138] und SOX2 die Adipogenese fördert, indem es PPAR- γ induziert [139, 140]. Da keine anderen Pluripotenz-Marker erhöht reguliert waren, konnte ausgeschlossen werden, dass die Zellen wieder zu pluripotenten Stammzellen zurück differenziert waren. Es konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass einzelne iPSC in der Kultur enthalten waren, da diese bei den durchgeführten Messungen nicht identifiziert worden wären.

Wie in Abschnitt 1.2 (Seite 6 ff.) angesprochen, besitzen iPSC und iPS-MSC besonders für die Regenerative Medizin ein großes Potential. Die durchgeführten Differenzierungsexperimente zeigten, dass iPS-MSC deutlich besser zur Erzeugung mesenchymaler Zelltypen geeignet sind als ihre Ausgangszellen (iPSC). Da allerdings nicht garantiert werden kann, dass nach erfolgter Adipo-, Osteo- oder Chondrogenese keine pluripotenten Zellen mehr in der Kultur vorhanden waren, ist eine klinische Anwendung auch mit diesen Zellen nicht möglich. Um die Gefahr einer Tumorbildung durch den Einsatz von nicht 100 %ig homogenen iPS-MSC-Kulturen zu minimieren, ist ein Aufreinigungsschritt der mesenchymalen Stammzellen vor der mesodermalen Differenzierung unabdingbar (vergleiche Abschnitt 5.4).

5.3.1 Kurzzeitadipogenese

Im Rahmen arbeitsgruppeninterner Forschungen zeigte sich, dass die adipogene Induktion von hBMSC nach zwei Wochen zu einer 100 %igen Oberflächenexpression von CD34 führt. Der gleiche Versuch wurde mit iPS-MSC wiederholt. Dazu wurde jene Population verwendet, welche unter Zugabe von TGF- β 1 generiert wurde, da diese Zellen am besten adipogen differenzierten. Nach zweiwöchiger adipogener Induktion konnten auf den iPS-MSC allerdings keine CD34-Proteine detektiert werden. Dies zeigte erneut, dass iPS-MSC in ihren Eigenschaften nicht vollständig den nativen hBMSC entsprechen.

5.4 Modifizierungen der EB- und ML-Methode für eine Optimierung des Differenzierungsprozesses

Nach der Beurteilung und dem Vergleich der beiden Differenzierungsmethoden (EB und ML) wurde durch Modifizierungen beider Methoden eine Optimierung des Prozesses angestrebt. Einen Überblick über alle Optimierungsexperimente geben die Tabellen 4.4 und 4.5 auf den Seiten 92 und 93.

Aufreinigung von iPS-MSC mittels FACS

Da pluripotente Stammzellen onkogen sind, müssen iPS-MSC und andere iPSC-abgeleitete Zellen, die eine Anwendung in der Regenerativen Medizin finden sollen, aufgereinigt

werden. Mit Hilfe der Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung steht dafür eine sehr zuverlässige und schnelle Methode zur Verfügung. Da die Zellen lebend sortiert werden, ist eine anschließende Weiterkultivierung der sortierten Zellen möglich. Für FACS müssen die Zellen jedoch als Einzelzellsuspension vorliegen, wodurch die Anwendbarkeit etwas eingeschränkt wird. Zellen die in einem festen Verbund wachsen (z.B. Gewebezellen) können nur schwer vereinzelt werden. Dafür ist eine mechanische Vereinzelnung der Zellen notwendig. Diese kann allerdings dazu führen, dass die Zellwände durchlässig werden und die Zellen sterben. Dies zeigte sich im Rahmen der eigenen Arbeiten bei der Kurzzeitadipogenese: Die adipogen differenzierten Zellen wurden mittels FCM analysiert und mussten dafür unter großem mechanischen Aufwand vereinzelt werden. Die Histogramme zeigten anschließend deutlich, dass viele tote Zellen in der Suspension vorhanden waren. Zudem waren teilweise, aufgrund beschädigter Zellwände, Antikörper in die noch lebenden Zellen eingedrungen. Wurden Einzelzellsuspensionen von hBMSC oder iPS-MS-C analysiert, so bestanden diese Probleme nicht, da mesenchymale Stammzellen *in vitro* vergleichsweise separiert wachsen. Aus diesem Grund ist es sinnvoller, eventuell verbliebene pluripotente Stammzellen bereits nach der Differenzierung zu MSC zu entfernen, anstatt dies erst nach einer Weiterdifferenzierung in z.B. mesenchymale Gewebezellen zu tun.

Anhand der FCM-Analysen vor, während und nach der iPS-MS-C-Generierung zeigte sich, dass die Kombination der Antigene CD24 und CD105 für die Separation der mesenchymalen von den pluripotenten Stammzellen äußerst geeignet ist. Besonders vorteilhaft war dabei, dass sowohl die hCB- als auch die hHSC- und hFF-iPSC einen CD24⁺/CD105⁻-Phänotyp, alle generierten iPS-MS-C-Populationen jedoch einen CD24⁻/CD105⁺-Phänotyp besaßen. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Zellen, die während der Differenzierung in Kultur vorlagen, überwiegend entweder einen pluripotenten (CD24⁺ und CD105⁻) oder einen mesenchymalen Charakter (CD24⁻ und CD105⁺) aufwiesen (vergleiche Abschnitt 5.2). Aufgrund der stark konträren Antigenexpressionen auf den Zelloberflächen war mit der Kombination von CD24 und CD105 eine gute Isolierbarkeit der gewünschten Zellen möglich. Auch in anderen Forschergruppen konnten aus pluripotenten Stammzellen generierte MSC erfolgreich nach CD24⁻/CD105⁺ sortiert [80, 95] werden. Abweichende Sortierungskriterien wie z.B. CD73⁺/CD90⁺, CD44⁺/CD146⁺ oder nur CD73⁺ finden ebenfalls Anwendung [79, 90, 161]. Für die iPSC, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, waren die zuletzt genannten Antigenkombinationen allerdings nicht geeignet. CD44, CD73, CD90 und CD146 wurden bereits zum Teil sehr stark auf den undifferenzierten iPSC exprimiert, so dass eine positive Sortierung nach diesen Antigenen nicht ratsam war. Vor allem die Oberflächenproteine CD90 und CD146 wurden auf den verwendeten iPSC und den daraus generierten iPS-MS-C in ähnlichem Maße exprimiert. Auch andere Forschergruppen konnten zeigen, dass deren iPSC stark positiv für diese beiden Antigene sind [94, 104, 168, 169]. Bei einer Sortierung nach CD90⁺ oder CD146⁺ würden demnach auch undifferenzierte iPSC in die aufgereinigte Kultur übergehen. CD44 und CD73 gelten häufig als negativ-Marker für iPSC bei der Reprogrammierung von Fibroblasten und die meisten publizierten Daten zeigen einen CD44⁻/CD73⁻-Phänotyp [168, 170]. Dennoch konnte in den eigenen Experimenten gezeigt werden, dass die Expressionen von CD44 und CD73 in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer der iPSC stark variierten. Daher sind CD44⁺ und CD73⁺ als generelle Sortierungskriterien nicht geeignet.

In den meisten Publikationen werden keine durchflusszytometrischen Analysen von

CD105 und CD24 in undifferenzierten humanen iPSC gezeigt. Somit ist schwer einzuschätzen, ob sich ein Sortieren nach $CD24^-/CD105^+$ für alle iPSC-MSK-Populationen eignet. Würden jedoch Daten von CD24 oder CD105 gezeigt, so waren die Zellen stets positiv für CD24 und negativ für CD105 [95, 104, 168, 169]. In Kombination mit den eigenen Daten lässt sich somit vermuten, dass $CD24^-/CD105^+$ als generell geeignete Kriterien für die Aufreinigung von iPSC-MSK in Frage kommen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden unvollständig differenzierte iPSC/iPSC-MSK-Kulturen in Passage 6 oder 7 sortiert. Es wurden ausschließlich Zellen verwendet, die mittels ML-Methode differenziert wurden, da die EB-differenzierten Zellen bereits in der ersten sortierfähigen Passage einem einheitlichen MSC-ähnlichen Phänotyp entsprachen und eine Sortierung somit keinen Zeitgewinn erbracht hätte. Vielmehr hätte dies unnötigen Stress für die Zellen bedeutet. Nach der Aufreinigung der iPSC-MSK mit $CD24^-/CD105^+$ -Phänotyp wurden annähernd homogene Kulturen erhalten, die allerdings sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Niveau dem Phänotyp unsortierter iPSC-MSK entsprachen. Wenige Passagen nach der Aufreinigung wurden aber auch bei diesen Zellen morphologische Veränderungen bzw. Weiterdifferenzierungen zu undefinierten Zelltypen beobachtet. Diese waren vergleichbar mit denen, die bei nicht sortierten iPSC-MSK-Kulturen auftraten. Somit ist eine Aufreinigung der gewünschten iPSC-MSK mittels FACS nach $CD24^-/CD105^+$ zwar möglich, stabilere oder qualitativ bessere Kulturen konnten damit jedoch nicht generiert werden.

Generierung von iPSC-MSK ohne Wachstumsfaktoren

Es ist bekannt, dass eine Differenzierung von pluripotenten zu mesenchymalen Stammzellen mittels EB-Methode auch ohne Zugabe dirigierender Agenzien spontan verlaufen kann [93, 94, 142]. Wie bereits erläutert, ähnelt die EB-Differenzierung der natürlich vorkommenden embryonalen Entwicklung. Im Inneren eines EBs differenzieren die pluripotenten Stammzellen vermutlich aufgrund der engen Zell-Zell-Kontakte und der hypoxischen Umgebung spontan zu Zelltypen aller drei Keimblätter (Ektoderm, Endoderm, Mesenchym) [84, 85]. Aufgrund dessen wurde die EB-Differenzierung ohne Zugabe der Wachstumsfaktoren bFGF, PDGF-AB und EGF mit allen drei iPSC-Populationen (hCB-, hHSC-, hFF-iPSC) getestet. Allerdings konnte mit keiner Population eine homogene iPSC-MSK-Kultur generiert werden. Stattdessen trat eine spontane Differenzierung der hFF-iPSC zu kontrahierenden (Herzmuskel-)Zellen ein.

Anderen Forschern gelang eine derartige Generierung von iPSC-MSK ohne Einsatz von Wachstumsfaktoren [94, 142]. Bei näherer Betrachtung stellte sich jedoch heraus, dass in diesen Experimenten iPSC verwendet wurden, die aus Knochenmarks-MSK generiert waren. Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass die verwendeten Zellen aufgrund des „*epigenetic memory*“-Effektes leichter zurück zu MSC differenziert werden konnten als die eigenen hCB-, hHSC- und hFF-iPSC. Eine Generierung von iPSC-MSK ohne Wachstumsfaktoren ist demnach nur eingeschränkt zu empfehlen und für die meisten iPSC-Populationen nicht geeignet. Allerdings bestätigt diese Tatsache die eigenen Erkenntnisse dahingehend, dass das Ursprungsgewebe einen Einfluss auf die Eigenschaften und Differenzierungsverhalten der reprogrammierten iPSC zu haben scheint.

Generierung von iPS-MSC mit TGF- β 1

Aufgrund der Microarray-Analysen wurde vermutet, dass die Generierung von iPS-MSC durch die Zugabe von TGF- β 1 optimiert werden könnte. Zudem ist bekannt, dass TGF- β 1 eine EMT und damit die Differenzierung von epithelialen, hier iPSC, zu mesenchymalen Zellen induzieren kann [133, 135, 171]. Daneben induziert TGF- β 1 auch die Expression von CD105 [172, 173]. Nach obigem postulierten Differenzierungsmechanismus, welcher CD24⁺/CD105⁺-doppelt positive Zellen ausschließt, würde dies die Differenzierung von einem pluripotenten zu einem mesenchymalen Phänotyp begünstigen. Aus diesem Grund wurden EB-Differenzierungen von hCB-iPSC unter Zugabe von TGF- β 1 zum Differenzierungsmedium (2 ng/mL und 5 ng/mL).

Ein positiver Einfluss des Wachstumsfaktors konnte bestätigt werden. Diese iPS-MSC-Populationen wiesen eine homogenere Morphologie auf und waren deutlich stabiler als die parallel (ohne TGF- β 1) generierten iPS-MSC. Morphologische Veränderungen traten erst fünf (2 ng/mL TGF- β 1) bzw. sechs (5 ng/mL TGF- β 1) Passagen später auf.

Die generierten hCB-iPS-MSC konnten adipogen, osteogen und chondrogen differenziert werden. Auffällig war hierbei, dass die Differenzierungen in alle drei Richtungen deutlich ausgeprägter verliefen als bei hCB-iPS-MSC, die ohne TGF- β 1 generiert wurden. Dies zeigte sich sowohl histologisch als auch auf mRNA-Niveau. Zudem war die Osteogenese nicht nur mit NaH₂PO₄, sondern auch mit β -GP erfolgreich. Dies ist ohne TGF- β 1-Einsatz nur bei hHSC-iPS-MSC geglückt. Bei der Chondrogenese konnte außerdem ein verstärktes Wachstum der Zellpellets beobachtet werden. Dies traf jedoch auch auf die Kontrollpellets zu, welche zum Teil größer waren als die induzierten Pellets. Außerdem zeigten die Kontrollzellen größere Expressionssteigerungen der Markergene Aggrecan, Kollagen 2 α 1 und SOX9. Daraus konnte geschlossen werden, dass die Chondrogenese in den Kontrollen ausgeprägter verlaufen ist als in den eigentlichen induzierten Pellets.

Grund dafür könnte die Verwendung von TGF- β 1 bei der Generierung der iPS-MSC gewesen sein. Der Wachstumsfaktor gehört zur TGF- β -Superfamilie und ist ebenso wie TGF- β 3 in der Lage, bei mesenchymalen Stammzellen eine Chondrogenese zu induzieren. Daher wird er von vielen Forschergruppen für die *in vitro*-Differenzierung genutzt [174–176]. Da TGF- β 1 sich in Monozyten und Makrophagen nach anfänglicher äußerer Stimulation selbst intrazellulär hochregulieren kann [173], wäre ein ähnliches Verhalten auch in anderen Zelltypen wie den iPS-MSC möglich. Eventuell bewirkte eine solche positive Rückkopplung in den iPS-MSC, dass die intrazelluläre TGF- β 1-Konzentration in Kombination mit der Pelletbildung und der Umstellung auf das chondrogene Kontrollmedium ausreichten, um eine Chondrogenese zu induzieren. Neben der chondrogenen Induktion hat TGF- β 1 auch die Eigenschaft die Osteogenese positiv zu beeinflussen [177, 178]. Dies könnte ausschlaggebend dafür gewesen sein, dass auch mit β -GP eine osteogene Differenzierung induziert werden konnte.

Generierung von iPS-MSC mit 17 β -Estradiol

Die Microarray-Analysen ließen ebenfalls vermuten, dass eine Optimierung der Generierung von iPS-MSC durch die Zugabe von 17 β -Estradiol möglich ist. 17 β -Estradiol ist ein Östrogen, welches durch Herunterregulation von E-Cadherin eine epithelial-mesen-

chymale-Transition induzieren kann [131, 132]. Um einen möglichen Einfluss auf die Generierung von iPS-MSCs zu verifizieren, wurde während der (EB-)Differenzierung das Medium mit 100 nM 17 β -Estradiol versetzt. Es stellte sich jedoch heraus, dass das Östrogen keine verbessernde Wirkung ausübte. Zwar konnten einige MSC-ähnliche Zellen generiert werden, jedoch war die Kultur zu inhomogen und nur für zwei Passagen stabil. Zudem war die Oberflächenpräsentation von CD105 gegenüber den standardmäßig generierten iPS-MSCs verringert. Somit konnte die Differenzierung von pluripotenten zu mesenchymalen Stammzellen mit 17 β -Estradiol nicht verbessert werden.

Einsatz von Lentiviren für den Knockdown von CD24 und die Überexpression von CD105

In dem oben gezeigten Differenzierungsmodell (Abbildung 5.1) wird davon ausgegangen, dass die Differenzierung von iPSC (CD24⁺/CD105⁻) zu MSC (CD24⁻/CD105⁺) über einen CD24⁻/CD105⁻-doppelt negativen Übergangszustand verläuft und CD24⁺/CD105⁺-doppelt positive Zellen ausgeschlossen sind. Durch eine Überexpression von CD105 (siehe unten) oder einen Knockdown von CD24 wurde überprüft, ob damit die Expression des jeweils anderen Gen inhibiert bzw. induziert und die Differenzierung beschleunigt werden kann.

Der Knockdown von CD24 wurde mittels lentiviral transduzierter shRNA durchgeführt und die infizierten Zellen im Anschluss mit Puromycin selektiert. Die Infektion erfolgte sowohl bei der EB-Methode (in der EB-Phase) als auch der ML-Methode. Es stellte sich heraus, dass die EB-Methode nicht für die Virusinfektion geeignet war, da im Anschluss keine Zellen aus den EBs herausgewachsen waren, so dass keine weitere Kultivierung möglich war. Die Analysen der ML-Differenzierung zeigten schließlich, dass Zellen mit MSC-ähnlicher spindelförmiger Morphologie in der Knockdown-Kultur auftraten. Auf mRNA-Niveau konnte zudem eine signifikante Herunterregulation von CD24 in den infizierten gegenüber den nicht infizierten Zellen nachgewiesen werden. Die Population, welche mit einem Kontrollvirus ohne Zielgen transduziert wurde, wies jedoch ebenfalls eine signifikante Reduktion der CD24-Expression auf. Diese fiel nur geringfügig schwächer aus als die der Zellen mit CD24-Knockdown. Dies zeigte, dass scheinbar die Virusinfektion und/oder die Puromycin-Selektion eine starke Abnahme der CD24-Genexpression bewirkten. Zudem blieb die erhoffte CD105-Expressionssteigerung aus. Zwar konnte in den Knockdown-Zellen eine leicht erhöhte CD105-Expression gegenüber den Zellen, welche mit Kontrollvirus infiziert wurden, detektiert werden, gegenüber den nicht infizierten Zellen war diese jedoch vermindert.

Zusätzlich stellte die Puromycin-Selektion ein großes Problem dar. Die infizierten Zellen (Knockdown und Kontrolle) wurden entweder nicht vollständig selektiert oder es blieben keine adhärennten transduzierten Zellen in der Kultur zurück. Somit konnte keine stabile MSC-ähnliche Population generiert werden. Dies kann zwei Gründe haben: Einerseits wäre es möglich, dass auch die transduzierten Zellen durch den Einsatz von Puromycin, welches eine Zellgift ist, gestorben sind. Wahrscheinlicher ist, dass durch den CD24-Knockdown Zellen mit einem CD24⁻/CD105⁻ doppelt negativen Phänotyp entstanden sind (CD105 wurde nicht hochreguliert). Da auch bei einer regulären ML-Differenzierung immer nur ein sehr geringer Anteil derartiger Zellen detektiert wurden, handelt es sich hierbei vermutlich um einen sehr instabilen Übergangszustand. Während bei der Standardmethode inter- oder intrazelluläre Signa-

le dazu führen, dass sich die Zellen zu einem MSC-ähnlichen Zustand weiter entwickeln (entsprechend dem CD24⁻/CD105⁺-Phänotyp), fehlen diese Signale möglicherweise nach erfolgtem CD24-Knockout. Da sich die transduzierten Zellen somit nicht zu iPSC mit einem CD24⁺/CD105⁻-Phänotyp zurückentwickeln können und der Übergangszustand vermutlich zu instabil war, folgte die Apoptose.

Kongruent mit dieser Theorie und dem postulierten Differenzierungsmodell trat bei der lentiviral vermittelten Überexpression von CD105 keine Apoptose ein. Nach erfolgter Transduktion wurden in den Kulturen einige spindelförmige und MSC-ähnliche Zellen beobachtet. Jedoch wurden diese Zellen aufgrund einer deutlich verlangsamten Proliferation schnell von den nicht transduzierten iPSC überwachsen. Aus diesem Grund wurden die infizierten Zellen in einem weiteren Experiment mittels magnetischer Zellsortierung separiert, wodurch eine homogene Kultur mit MSC-ähnlicher Morphologie erzielt werden konnte. Auf mRNA-Niveau konnte zudem gezeigt werden, dass parallel zu der Expressionssteigerung von CD105 alle Pluripotenz-assoziierten Gene herunterreguliert und weitere MSC-Marker heraufreguliert wurden. Dieser MSC-ähnliche Zustand war allerdings nur für zwei Passagen stabil. Danach entwickelten sich die Zellen wieder zurück zu einer Population mit pluripotent-epitheliale Charakter. Möglicherweise wurde die eingebrachte Gensequenz nicht stabil in das Genom eingebaut, wodurch es mit der Zeit von den Zellen wieder abgebaut wurde. Somit konnte die CD105-Überexpression nicht lange aufrecht erhalten bleiben.

Vergleichbare Experimente, in denen iPSC mit Hilfe eines Lentivirus differenziert wurden, sind bisher nur wenige bekannt [112, 179]. Wei *et al.* konnten beispielsweise zeigen, dass eine direkte Chondrogenese von iPSC möglich ist, indem in diesen Zellen TGF- β 1 lentiviral überexprimiert wurde [179]. Bajpai *et al.* überexprimierten in ihren iPSC hingegen ACTA2, um vaskuläre glatte Muskelzellen zu generieren [112]. Dabei stellten sie fest, dass der Differenzierungsprozess über einen mesenchymalen Zustand verläuft, in dem die Zellen eine fibroblastoide Morphologie aufweisen sowie Pluripotenz- und MSC-Marker herunter- bzw. heraufreguliert worden sind. Kongruent mit den eigenen Beobachtungen konnten sie die Differenzierung der iPSC zu einem MSC-ähnlichen Zustand zusätzlich als eine EMT identifizieren.

Insgesamt konnte mit den durchgeführten Experimenten gezeigt werden, dass eine Differenzierung von pluripotenten zu mesenchymalen Stammzellen mittels lentiviraler Überexpression von CD105 möglich ist. Außerdem hat sich ein direkter Zusammenhang zwischen den Genexpressionen von CD105 und CD24 bestätigt. Zellen, die beide Gene nur geringfügig exprimierten, waren sehr instabil und traten höchstens in Übergangszuständen auf. Die Expression beider Gene war hingegen nicht möglich, da eine Überexpression von CD105 gleichzeitig zu einer verminderten Expression von CD24 führte. Umgekehrt konnte Frau Dr. Luisa Marilena Schäck im Rahmen ihrer Doktorarbeit zeigen, dass eine Überexpression von CD24 in hBMSC zu einer Reduktion von CD105 führt [141]. Wenn es gelingt, den CD24^{gering}/CD105^{hoch}-Expressionszustand zu stabilisieren, wäre es möglich, innerhalb von drei Wochen iPS-MSC mittels lentiviraler Transduktion zu generieren. Dies entspricht der Zeit, die auch für die EB-Methode benötigt wurde, könnte aber aufgrund der genetischen Veränderungen zu stabileren iPS-MSC-Kulturen führen. Dies muss in weiteren Experimenten geklärt werden.

Für den klinischen Einsatz ist diese Differenzierungs-Variante aufgrund des Virusein-

satzes allerdings nicht geeignet. Alternativ könnte möglicherweise eine Protein-vermittelte Überexpression von CD105, wie sie auch bei der Reprogrammierung somatischer Zellen zu iPSC eingesetzt wird, angewandt werden. Damit könnte das Risiko einer Insertionsmutagenese, welches bei viralvermittelten Transduktionen besteht, minimiert und eine klinische Anwendung ermöglicht werden.

6 Ausblick

Die durchgeführten Experimente haben gezeigt, dass iPSC ganz allgemein als Zellquelle für mesodermale Zelltypen sowie zur Generierung von MSC geeignet sind. Eine gleichbleibende Qualität der pluripotenten Stammzellen, die in diesem Zusammenhang häufig vorausgesetzt wird, konnte allerdings nicht bestätigt werden. Die qRT-PCR- und FCM-Analysen zeigten eine eindeutige Abhängigkeit von Ursprungsgewebe, Passagenzahl/Alter und Kulturbedingungen auf molekularer sowie auf Protein-Ebene. Ein zusätzlicher Einfluss der Reprogrammierungsmethode wäre ebenfalls denkbar. Alle iPSC, die für die vorliegende Arbeit verwendet wurden, wurden durch lentivirale Transduktion der Thomson-Faktoren (OCT4, SOX2, NANOG, LIN28) generiert. Durch vergleichende iPSC-Generierungen z.B. mittels retroviraler, adenoviraler sowie Protein-vermittelter Induktion ausgehend von derselben somatischen Zellpopulation könnte diese Vermutung überprüft werden. Möglicherweise verändert sich dadurch nicht nur der Phänotyp der jeweiligen iPSC-Population, sondern auch ihr Differenzierungsverhalten. Eventuell könnte dadurch zusätzlich eine Reprogrammierungsmethode ausfindig gemacht werden, die die reprogrammierten iPSC besonders empfänglich für eine mesenchymale Induktion macht und somit eine Generierung von iPS-MSC erleichtert. Bei der Generierung von iPS-MSC konnte zumindest gezeigt werden, dass das Ursprungsgewebe der iPSC einen Einfluss auf die entsprechende Differenzierung zu MSC hat. So konnten beispielsweise ausgehend von iPSC, die aus Vorhaut-Fibroblasten generiert wurden, keine stabile MSC-ähnliche Population erzeugt werden. Vielmehr wurde eine spontane Differenzierung zu kontrahierenden (Herzmuskel-)Zellen beobachtet. Dies trat bei der Verwendung von iPSC aus Zellen des Nabelschnurblutes oder aus hämatopoetischen Stammzellen nicht auf.

Generell kann induzierten pluripotenten Stammzellen das Potential, zu mesenchymalen Stammzellen zu differenzieren, zugesprochen werden. Allerdings waren nur 22 % der ML-Differenzierungen sowie 83 % der EB-Differenzierungen erfolgreich. Dieses Ergebnis hat gezeigt, dass die EB-Methode generell besser geeignet ist als die ML-Methode, zumal erstere homogenere Kulturen erzeugte und im Schnitt 19 Tage schneller verlief als letztere (EB: ca. 21 Tage, ML: ca. 40 Tage). Zusätzlich war die EB-Methode kostengünstiger, da kein teurer ROCK-Inhibitor eingesetzt werden musste. Besonders im Hinblick auf eine klinische Anwendung ist dies von großer Bedeutung. Als nachteilig stellte sich jedoch bei beiden Methoden heraus, dass die generierten iPS-MSC-Kulturen meist nur wenige Passagen stabil blieben. Die Zellen veränderten sich morphologisch mit zunehmender Passage bis häufig keine MSC-ähnlichen Zellen mehr vorhanden waren.

Eine Optimierung des Differenzierungsprozesses ist demnach unerlässlich. Mit Hilfe verschiedener Modifizierungen wurden erste Experimente in diese Richtung durchgeführt. Im Rahmen der eigenen Experimente konnte schließlich gezeigt werden, dass TGF- β 1 sowie die Überexpression von CD105 eine Optimierung des Differenzierungsprozesses darstellen können. Der Einsatz von TGF- β 1 bietet sich an, wenn die iPS-MSC-Kultur weiter zu mesodermalen Zellen differenziert werden sollen, da sie im Vergleich zu iPS-MSC, die ohne TGF- β 1 generiert wurden, eine gesteigerte Differenzierungskapazität aufwiesen. Zudem blieb die MSC-ähnliche Kultur mindestens fünf Passagen länger

stabil als die parallel generierte Population ohne TGF- β 1-Zugabe. Eine dauerhaft stabile Kultur konnte allerdings auch hierbei nicht generiert werden.

Neben TGF- β 1 bietet die Überexpression von CD105 ebenfalls ein großes Optimierungspotential. Es konnte nachgewiesen werden, dass ein direkter Zusammenhang zwischen der Expression von CD105 und CD24, und somit auch zwischen einem mesenchymalen (CD24⁻/CD105⁺) und pluripotenten (CD24⁺/CD105⁻) Phänotyp besteht. Dies hatte zur Folge, dass durch erfolgreiche Überexpression von CD105 CD24 herunterreguliert wurde. Damit einhergehend nahmen die mesenchymalen Eigenschaften (Genexpression, Oberflächenantigene und Morphologie) immer mehr zu. Auch bei dieser modifizierten Differenzierung von iPSC zu MSC bedarf es weiterer Forschungen. In den durchgeführten Experimenten konnte eine Überexpression von CD105 nur für etwa zwei Passagen aufrecht erhalten werden. Wenn es gelingt, einen derartigen Zustand dauerhaft zu generieren, wäre es erstmals möglich, durch genetische Manipulation eine mesenchymale Differenzierung von pluripotenten Stammzellen zu erreichen. Zudem sollte eine Virus-freie Alternative, z.B. durch Protein-vermittelte Induktion, angestrebt werden, um einen klinischen Einsatz dieser iPS-MSC potentiell zu ermöglichen.

Trotz der vielversprechenden Ergebnissen wird die Hauptaufgabe für weitere Forschungen nach wie vor sein, die Differenzierungsmethoden sowie die Kulturbedingungen weiter zu optimieren, so dass homogenere und stabilere iPS-MSC-Kulturen generiert werden können. Eine Möglichkeit scheint die Differenzierung und Kultivierung von iPSC zu MSC unter Hypoxie, das heißt bei verminderter Sauerstoffzufuhr (5 % O₂), zu sein. Ein Einfluss der Sauerstoffkonzentration ließ sich aufgrund der besseren Differenzierung mittels EB-Methode vermuten, da im Inneren der Embryoid Bodies hypoxische Bedingungen vorherrschen [149]. Erste wissenschaftliche Ergebnisse in diesem Bereich haben gezeigt, dass durch hypoxische Bedingungen eine EMT induziert bzw. *in vitro*-Differenzierungen gefördert werden können [150–153, 180]. Eine Hypoxie-Differenzierung stellt aber nicht nur ein großes Optimierungspotential für die Generierung der iPS-MSC dar, sondern auch für deren Kultivierung. Es konnte gezeigt werden, dass Stammzellen bei einer verminderten Sauerstoffzufuhr (ca. 5 % O₂) länger im undifferenzierten Zustand kultiviert werden können als unter normoxischen Bedingungen (21 % O₂) [157, 158]. Daher sollte in weiterführenden Experimenten geklärt werden, ob eine Generierung und Kultivierung von iPS-MSC-Kulturen unter Hypoxie zu homogenen und vor allem stabileren iPS-MSC-Kulturen führen würde.

Unerlässlich für weitere Optimierungsmöglichkeiten wird eine tiefgreifende Analyse des Überganges vom pluripotenten zum mesenchymalen Zustand sein. Anhand der eigenen Ergebnisse konnte ein Differenzierungsmodell postuliert werden. Der genaue Prozess ist allerdings noch nicht bekannt und bietet viel Spielraum für weitere Forschungsansätze. Beispielsweise sollte analysiert werden, was für Zellen entstehen, wenn die Differenzierung missglückt oder die iPS-MSC nach einigen Passagen weiterdifferenzieren. Eine Rückentwicklung zu pluripotenten Zellen konnte aufgrund fehlender charakteristischer Genexpressionswerte und Oberflächenproteinen ausgeschlossen werden. Viel wahrscheinlicher wäre eine Entwicklung zu ausdifferenzierten Gewebezellen des Mesenchyms, da typische mesenchymale Markergene wie CD105, CD146, CD44, CD73 weiterhin exprimiert und die Proteine auf der Zelloberfläche präsentiert wurden. Dafür würde es sich anbieten, die entstandenen Zellen mit verschiedenen Gewebezellen zu ver-

gleichen. Die Erkenntnisse aus umfangreichen Analysen des Differenzierungsprozesses könnten eventuell auch neue Möglichkeiten aufdecken, wie die Differenzierung durch einen Eingriff von außen beeinflusst werden kann. Möglicherweise kann die Generierung von iPS-MSK somit weiter optimiert und hoffentlich unter geringem Zeitaufwand eine langzeitstabile Kultur erzeugt werden. Wenn dies erreicht ist, wird der Einsatz von – vor allem autologen – iPS-MSK als Alternative zu adulten MSK in der Regenerativen Medizin vermutlich noch deutlich interessanter werden.

Literaturverzeichnis

- [1] CZYŻ, J.; WIESE, C.; ROLLETSCHEK, A.; BLYSZCZUK, P.; CROSS, M. ; WOBUS, A. M.: Potential of embryonic and adult stem cells in vitro. *Biol. Chem.* 384 (2003), S. 1391–1409
- [2] MA, T.; GRAYSON, W. L.; FRÖHLICH, M. ; VUNJAK-NOVAKOVIC, G.: Hypoxia and stem cell-based engineering of mesenchymal tissues. *Biotechnol. Prog.* 25 (2009), S. 32–42
- [3] MOORE, K. A.; LEMISCHKA, I. R.: Stem cells and their niches. *Science* 311 (2006), Nr. 5769, S. 1880–5
- [4] FRENETTE, P. S.; PINHO, S.; LUCAS, D. ; SCHEIERMANN, C.: Mesenchymal stem cell: keystone of the hematopoietic stem cell niche and a stepping-stone for regenerative medicine. *Annu. Rev. Immunol.* 31 (2013), S. 285–316
- [5] HUANG, G. T.-J.; GRONTHOS, S. ; SHI, S.: Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J. Dent. Res.* 88 (2009), Nr. 9, S. 792–806
- [6] WATT, F. M.; HOGAN, B. L.: Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* 287 (2000), S. 1427–1430
- [7] TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S.: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126 (2006), Nr. 4, S. 663–76
- [8] FRIEDENSTEIN, A. J.: Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J. Embryol. exp. Morph.* 16 (1966), S. 381–390
- [9] CAPLAN, A. I.: Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* 9 (1991), Nr. 5, S. 641–50
- [10] PITTENGER, M. F.; MACKAY, A. M.; BECK, S. C.; JAISWAL, R. K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J. D.; MOORMAN, M. A.; SIMONETTI, D. W.; CRAIG, S. ; MARSHAK, D. R.: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284 (1999), S. 143–147
- [11] ZUK, P. A.; ZHU, M.; ASHJIAN, P.; DE UGARTE, D. A.; HUANG, J. I.; MIZUNO, H.; ALFONSO, Z. C.; FRASER, J. K.; BENHAIM, P. ; HEDRICK, M. H.: Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell* 13 (2002), S. 4279–4295
- [12] YOUNG, H. E.; STEELE, T. A.; BRAY, R. A.; HUDSON, J.; FLOYD, J. A.; HAWKINS, K.; THOMAS, K.; AUSTIN, T.; EDWARDS, C.; CUZZOURT, J.; DUENZL, M.; LUCAS, P. A. ; BLACK, A. C.: Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *Anat. Rec.* 264 (2001), S. 51–62

- [13] KASSIS, I.; ZANGI, L.; RIVKIN, R.; LEVDANSKY, L.; SAMUEL, S.; MARX, G. ; GORODETSKY, R.: Isolation of mesenchymal stem cells from G-CSF-mobilized human peripheral blood using fibrin microbeads. *Bone Marrow Transplant.* 37 (2006), S. 967–976
- [14] ZVAIFLER, N. J.; MARINOVA-MUTAFCHIEVA, L.; ADAMS, G.; EDWARDS, C. J.; MOSS, J.; BURGER, J. A. ; MAINI, R. N.: Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res.* 2 (2000), S. 477–488
- [15] TROYER, D. L.; WEISS, M. L.: Wharton’s jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells* 26 (2008), S. 591–599
- [16] KARAHUSEYINOGLU, S.; CINAR, O.; KILIC, E.; KARA, F.; AKAY, G. G.; DEMIRALP, D. O.; TUKUN, A.; UCKAN, D. ; CAN, A.: Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. *Stem Cells* 25 (2007), S. 319–331
- [17] ROGERS, I.; CASPER, R. F.: Umbilical cord blood stem cells. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 18 (2004), S. 893–908
- [18] DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, a.; PROCKOP, D. ; HORWITZ, E.: Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8 (2006), Nr. 4, S. 315–7
- [19] LV, F.-J. F.; TUAN, R. S. R.; CHEUNG, K. M. C. ; LEUNG, V. V. Y. L.: Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 32 (2014), S. 1408–19
- [20] BIANCO, P.; CAO, X.; FRENETTE, P. S.; MAO, J. J.; ROBEY, P. G.; SIMMONS, P. J. ; WANG, C.-y.: The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. *Nat. Med.* 19 (2013), Nr. 1, S. 35–42
- [21] MAFI, P.; HINDOCHA, S. ; MAFI, R.: Adult mesenchymal stem cells and cell surface characterization - A systematic review of the literature. *Open Orthop. J.* 5 (2011), S. 253–60
- [22] SCHÄCK, L. M.; NOACK, S.; WEIST, R.; JAGODZINSKI, M.; KRETTEK, C.; BUETTNER, M. ; HOFFMANN, A.: Analysis of surface protein expression in human bone marrow stromal cells: new aspects of culture-induced changes, inter-donor differences and intracellular expression. *Stem Cells Dev.* 22 (2013), Nr. 24, S. 3226–35
- [23] EVANS, M. J.; KAUFMAN, M. H.: Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292 (1981), S. 154–156
- [24] GINIS, I.; LUO, Y.; MIURA, T.; THIES, S.; BRANDENBERGER, R.; GERECHT-NIR, S.; AMIT, M.; HOKE, A.; CARPENTER, M. K.; ITSKOVITZ-ELDOR, J. ;

- RAO, M. S.: Differences between human and mouse embryonic stem cells. *Dev. Biol.* 269 (2004), S. 360–380
- [25] TAKAHASHI, K.; TANABE, K.; OHNUKI, M.; NARITA, M.; ICHISAKA, T.; TOMODA, K.; YAMANAKA, S.: Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131 (2007), Nr. 5, S. 861–72
- [26] WERNIG, M.; MEISSNER, A.; FOREMAN, R.; BRAMBRINK, T.; KU, M.; HOCHEDLINGER, K.; BERNSTEIN, B. E.; JAENISCH, R.: In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 448 (2007), Nr. 7151, S. 318–24
- [27] JAENISCH, R.; YOUNG, R.: Stem Cells, the Molecular Circuitry of Pluripotency and Nuclear Reprogramming. *Cell* 132 (2008), S. 567–582
- [28] GURDON, J. B.: The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 10 (1962), S. 622–640
- [29] GURDON, J. B.: From nuclear transfer to nuclear reprogramming: the reversal of cell differentiation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22 (2006), S. 1–22
- [30] YU, J.; VODYANIK, M. A.; SMUGA-OTTO, K.; ANTOSIEWICZ-BOURGET, J.; FRANE, J. L.; TIAN, S.; NIE, J.; JONSDOTTIR, G. A.; RUOTTI, V.; STEWART, R.; SLUKVIN, I. I.; THOMSON, J. A.: Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* (80-.). 318 (2007), S. 1917–1920
- [31] DALLA-FAVERA, R.; BREGNI, M.: Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79 (1982), S. 7824–7827
- [32] WERNIG, M.; MEISSNER, A.; CASSADY, J. P.; JAENISCH, R.: c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* 2 (2008), Nr. 1, S. 10–2
- [33] NAKAGAWA, M.; KOYANAGI, M.; TANABE, K.; TAKAHASHI, K.; ICHISAKA, T.; AOI, T.; OKITA, K.; MOCHIDUKI, Y.; TAKIZAWA, N.; YAMANAKA, S.: Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat. Biotechnol.* 26 (2008), Nr. 1, S. 101–6
- [34] HUANGFU, D.; OSAFUNE, K.; MAEHR, R.; GUO, W.; EIJKELENBOOM, A.; CHEN, S.; MUHLESTEIN, W.; MELTON, D. A.: Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat. Biotechnol.* 26 (2008), S. 1269–1275
- [35] HESTER, M. E.; SONG, S.; MIRANDA, C. J.; EAGLE, A.; SCHWARTZ, P. H.; KASPAR, B. K.: Two factor reprogramming of human neural stem cells into pluripotency. *PLoS One* 4 (2009), Nr. 9, S. e7044
- [36] KIM, J. B.; GREBER, B.; ARAÚZO-BRAVO, M. J.; MEYER, J.; PARK, K. I.; ZAEHRES, H.; SCHÖLER, H. R.: Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. *Nature* 461 (2009), Nr. 7264, S. 649–3

- [37] KIRCHHOF, N.; CARNWATH, J. W.; LEMME, E.; ANASTASSIADIS, K.; SCHÖLER, H. ; NIEMANN, H.: Expression pattern of Oct-4 in preimplantation embryos of different species. *Biol. Reprod.* 63 (2000), S. 1698–1705
- [38] ZHOU, W.; FREED, C. R.: Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 27 (2009), Nr. 11, S. 2667–74
- [39] STADTFELD, M.; NAGAYA, M. ; UTIKAL, J.: Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science (80-.).* 322 (2008), S. 945–949
- [40] JUDSON, R. L.; BABIARZ, J. E.; VENERE, M. ; BLELLOCH, R.: Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency. *Nat. Biotechnol.* 27 (2009), S. 459–461
- [41] ANOKYE-DANSO, F.; TRIVEDI, C. M.; JUHR, D.; GUPTA, M.; CUI, Z.; TIAN, Y.; ZHANG, Y.; YANG, W.; GRUBER, P. J.; EPSTEIN, J. A. ; MORRISEY, E. E.: Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* 8 (2011), Nr. 4, S. 376–88
- [42] ZHOU, H.; WU, S.; JOO, J. Y.; ZHU, S.; HAN, D. W.; LIN, T.; TRAUGER, S.; BIEN, G.; YAO, S.; ZHU, Y.; SIUZDAK, G.; SCHÖLER, H. R.; DUAN, L. ; DING, S.: Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 4 (2009), Nr. 5, S. 381–4
- [43] KIM, D.; KIM, C.; MOON, J. ; CHUNG, Y.: Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* 4 (2009), Nr. 6, S. 472–476
- [44] KAJI, K.; NORRBY, K.; PACA, A.; MILEIKOVSKY, M.; MOHSENI, P. ; WOLTJEN, K.: Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature* 458 (2009), S. 771–775
- [45] WOLTJEN, K.; MICHAEL, I. P.; MOHSENI, P.; DESAI, R.; MILEIKOVSKY, M.; HÄMÄLÄINEN, R.; COWLING, R.; WANG, W.; LIU, P.; GERTSENSTEIN, M.; KAJI, K.; SUNG, H.-K. ; NAGY, A.: piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 458 (2009), S. 766–770
- [46] OKITA, K.; ICHISAKA, T. ; YAMANAKA, S.: Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448 (2007), S. 313–317
- [47] YAMANAKA, S.: Elite and stochastic models for induced pluripotent stem cell generation. *Nature* 460 (2009), Nr. 7251, S. 49–52
- [48] MINUTH, W. W.; STREHL, R. ; SCHUMACHER, K.: *Von der Zellkultur zum Tissue engineering.* Pabst Science Publ., 2002
- [49] REDDI, A.: Morphogenesis and Tissue Engineering of Bone and Cartilage: Inductive Signals, Stem Cells, and Biomimetic Biomaterials. *Tissue Eng.* 6 (2000), Nr. 4, S. 351–359

- [50] YANG, S.; LEONG, K. F.; DU, Z. ; CHUA, C. K.: The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue Eng.* 7 (2001), Nr. 6, S. 679–689
- [51] FRÖHLICH, M.; GRAYSON, W. ; WAN, L.: Tissue engineered bone grafts: biological requirements, tissue culture and clinical relevance. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 3 (2008), Nr. 4, S. 254–264
- [52] MIMEAULT, M.; BATRA, S. K.: Concise review: recent advances on the significance of stem cells in tissue regeneration and cancer therapies. *Stem Cells* 24 (2006), Nr. 11, S. 2319–45
- [53] ALONSO, L.; FUCHS, E.: Stem cells of the skin epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 Suppl (2003), S. 11830–5
- [54] NISHIDA, K.; YAMATO, M.; HAYASHIDA, Y.; WATANABE, K.; MAEDA, N.; WATANABE, H.; YAMAMOTO, K.; NAGAI, S.; KIKUCHI, A.; TANO, Y. ; OKANO, T.: Functional bioengineered corneal epithelial sheet grafts from corneal stem cells expanded ex vivo on a temperature-responsive cell culture surface. *Transplantation* 77 (2004), Nr. 3, S. 379–85
- [55] HEINE, W.; CONANT, K.; GRIFFIN, J. W. ; HÖKE, A.: Transplanted neural stem cells promote axonal regeneration through chronically denervated peripheral nerves. *Exp. Neurol.* 189 (2004), Nr. 2, S. 231–40
- [56] SEMERARO, R.; CARDINALE, V.: The fetal liver as cell source for the regenerative medicine of liver and pancreas. *Ann. Transl. Med.* 1 (2012), Nr. 2
- [57] DAZZI, F.; KRAMPERA, M.: Mesenchymal stem cells and autoimmune diseases. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 24 (2011), Nr. 1, S. 49–57
- [58] JONES, B. J.; MCTAGGART, S. J.: Immunosuppression by mesenchymal stromal cells: from culture to clinic. *Exp. Hematol.* 36 (2008), Nr. 6, S. 733–41
- [59] AGGARWAL, S.; PITTINGER, M. F.: Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 105 (2005), Nr. 4, S. 1815–22
- [60] CHAMBERLAIN, G.; FOX, J.; ASHTON, B. ; MIDDLETON, J.: Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 25 (2007), Nr. 11, S. 2739–49
- [61] KÜHL, S.; KÜHL, M.: *Stammzellbiologie*. Stuttgart : Eugen Ulmer KG, 2012
- [62] RASTEGAR, F.; SHENAQ, D.; HUANG, J.; ZHANG, W.; ZHANG, B.-Q.; HE, B.-C.; CHEN, L.; ZUO, G.-W.; LUO, Q.; SHI, Q.; WAGNER, E. R.; HUANG, E.; GAO, Y.; GAO, J.-L.; KIM, S. H.; ZHOU, J.-Z.; BI, Y.; SU, Y.; ZHU, G.; LUO, J.; LUO, X.; QIN, J.; REID, R. R.; LUU, H. H.; HAYDON, R. C.; DENG, Z.-L. ; HE, T.-C.: Mesenchymal stem cells: Molecular characteristics and clinical applications. *World J. Stem Cells* 2 (2010), S. 67–80

- [63] CONLEY, B. J.; TROUNSON, A. O. ; MOLLARD, R.: Human embryonic stem cells form embryoid bodies containing visceral endoderm-like derivatives. *Fetal Diagn. Ther.* 19 (2004), S. 218–223
- [64] AASEN, T.; RAYA, A.; BARRERO, M. J.; GARRETA, E.; CONSIGLIO, A.; GONZALEZ, F.; VASSENA, R.; BILIĆ, J.; PEKARIK, V.; TISCORNIA, G.; EDEL, M.; BOUÉ, S. ; IZPISÚA BELMONTE, J. C.: Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat. Biotechnol.* 26 (2008), S. 1276–1284
- [65] MORIZANE, A.; DOI, D.; KIKUCHI, T.; OKITA, K.; HOTTA, A.; KAWASAKI, T.; HAYASHI, T.; ONOE, H.; SHIINA, T.; YAMANAKA, S. ; TAKAHASHI, J.: Direct comparison of autologous and allogeneic transplantation of iPSC-derived neural cells in the brain of a nonhuman primate. *Stem Cell Reports* 1 (2013), Nr. 4, S. 283–292
- [66] BOYD, A. S.; RODRIGUES, N. P.; LUI, K. O.; FU, X. ; XU, Y.: Concise review: Immune recognition of induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 30 (2012), Nr. 5, S. 797–803
- [67] ALONSO-ALONSO, M. L.: Current focus of stem cell application in retinal repair. *World J. Stem Cells* 7 (2015), Nr. 3, S. 641–648
- [68] KANEMURA, H.; GO, M. J.; SHIKAMURA, M.; NISHISHITA, N.; SAKAI, N.; KAMAO, H.; MANDAI, M.; MORINAGA, C.; TAKAHASHI, M. ; KAWAMATA, S.: Tumorigenicity studies of induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived retinal pigment epithelium (RPE) for the treatment of age-related macular degeneration. *PLoS One* 9 (2014), Nr. 1, S. 1–11
- [69] ZHANG, J.; WILSON, G. F.; SOERENS, A. G.; KOONCE, C. H.; YU, J.; PALECEK, S. P.; THOMSON, J. A. ; KAMP, T. J.: Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Circ. Res.* 104 (2009), Nr. 4, S. e30–41
- [70] TATEISHI, K.; HE, J.; TARANOVA, O.; LIANG, G.; D’ALESSIO, A. C. ; ZHANG, Y.: Generation of insulin-secreting islet-like clusters from human skin fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 283 (2008), Nr. 46, S. 31601–7
- [71] WERNIG, M.; ZHAO, J.-P.; PRUSZAK, J.; HEDLUND, E.; FU, D.; SOLDNER, F.; BROCCOLI, V.; CONSTANTINE-PATON, M.; ISACSON, O. ; JAENISCH, R.: Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson’s disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008), S. 5856–5861
- [72] SUNDBERG, M.; BOGETOFTE, H. ; LAWSON, T.: Improved cell therapy protocols for Parkinson’s disease based on differentiation efficiency and safety of hESC-, hiPSC-, and non-human primate iPSC-derived dopaminergic neurons. *Stem Cells* 31 (2013), S. 1548–1562
- [73] XU, D.; ALIPIO, Z.; FINK, L. M.; ADCOCK, D. M.; YANG, J.; WARD, D. C. ; MA, Y.: Phenotypic correction of murine hemophilia A using an iPS cell-based therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2008), S. 808–813

- [74] ILLICH, D. J.; DEMIR, N.; STOJKOVIĆ, M.; SCHEER, M.; ROTHAMEL, D.; NEUGEBAUER, J.; HESCHELER, J. ; ZÖLLER, J. E.: Concise review: induced pluripotent stem cells and lineage reprogramming: prospects for bone regeneration. *Stem Cells* 29 (2011), Nr. 4, S. 555–63
- [75] LEVI, B.; HYUN, J. S.; MONTORO, D. T.; LO, D. D.; CHAN, C. K. F.; HU, S.; SUN, N.; LEE, M.; GROVA, M.; CONNOLLY, A. J.; WU, J. C.; GURTNER, G. C.; WEISSMAN, I. L.; WAN, D. C. ; LONGAKER, M. T.: In vivo directed differentiation of pluripotent stem cells for skeletal regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012), Nr. 50, S. 20379–84
- [76] PARK, I. H.; ARORA, N.; HUO, H.; MAHERALI, N.; AHFELDT, T.; SHIMAMURA, A.; LENSCH, M. W.; COWAN, C.; HOCHEDLINGER, K. ; DALEY, G. Q.: Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 134 (2008), S. 877–886
- [77] KIM, C.: Disease modeling and cell based therapy with iPSC: Future therapeutic option with fast and safe application. *Blood Res.* 49 (2014), S. 7–14
- [78] JUNG, Y.; BAUER, G. ; NOLTA, J. A.: Concise review: Induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells: progress toward safe clinical products. *Stem Cells* 30 (2012), Nr. 1, S. 42–7
- [79] SÁNCHEZ, L.; GUTIERREZ-ARANDA, I.; LIGERO, G.; RUBIO, R.; MUNOZ-LÓPEZ, M.; GARCÍA-PÉREZ, J. L.; RAMOS, V.; REAL, P. J.; BUENO, C.; RODRÍGUEZ, R.; DELGADO, M. ; MENENDEZ, P.: Enrichment of human ESC-derived multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive and anti-inflammatory properties capable to protect against experimental inflammatory bowel disease. *Stem Cells* 29 (2011), Nr. 2, S. 251–62
- [80] LAI, R. C.; CHOO, A. ; KIANG, L. S.: Derivation and Characterization of Human ESC-Derived Mesenchymal Stem Cells. VEMURI, M. (Hrsg.); CHASE, L. G. (Hrsg.) ; RAO, M. S. (Hrsg.): *Methods Mol. Biol.* Bd. 698. Totowa, NJ : Humana Press, 2011, Kapitel 11, S. 141–150
- [81] LIAN, Q.; LYE, E.; SUAN YEO, K.; KHIA WAY TAN, E.; SALTO-TELLEZ, M.; LIU, T. M.; PALANISAMY, N.; EL OAKLEY, R. M.; LEE, E. H.; LIM, B. ; LIM, S.-K.: Derivation of clinically compliant MSCs from CD105+, CD24- differentiated human ESCs. *Stem Cells* 25 (2007), Nr. 2, S. 425–36
- [82] MILTENYI, S.; MÜLLER, W.; WEICHEL, W. ; RADBRUCH, A.: High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 11 (1990), S. 231–238
- [83] DAVID, R.; GROEBNER, M. ; FRANZ, W.-M.: Magnetic cell sorting purification of differentiated embryonic stem cells stably expressing truncated human CD4 as surface marker. *Stem Cells* 23 (2005), S. 477–482
- [84] ITSKOVITZ-ELDOR, J.; SCHULDINER, M.; KARSENTI, D.; EDEN, A.; YANUKA, O.; AMIT, M.; SOREQ, H. ; BENVENISTY, N.: Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Mol. Med.* 6 (2000), S. 88–95

- [85] HWANG, N.; VARGHESE, S. ; ELISSEEFF, J.: Controlled differentiation of stem cells. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60 (2008), Nr. 2, S. 199–214
- [86] VILLA-DIAZ, L. G.; BROWN, S. E.; LIU, Y.; ROSS, a. M.; LAHANN, J.; PARENT, J. M. ; KREBSBACH, P. H.: Derivation of mesenchymal stem cells from human induced pluripotent stem cells cultured on synthetic substrates. *Stem Cells* 30 (2012), Nr. 6, S. 1174–81
- [87] BROWN, S. E.; TONG, W. ; KREBSBACH, P. H.: The derivation of mesenchymal stem cells from human embryonic stem cells. *Cells. Tissues. Organs* 189 (2009), Nr. 1-4, S. 256–60
- [88] MAHMOOD, A.; HARKNESS, L.; SCHRØ DER, H. D.; ABDALLAH, B. M. ; KASSEM, M.: Enhanced differentiation of human embryonic stem cells to mesenchymal progenitors by inhibition of TGF-beta/activin/nodal signaling using SB-431542. *J. Bone Miner. Res.* 25 (2010), Nr. 6, S. 1216–33
- [89] LIU, Y.; GOLDBERG, A. J.; DENNIS, J. E.; GRONOWICZ, G. A. ; KUHN, L. T.: One-step derivation of mesenchymal stem cell (MSC)-like cells from human pluripotent stem cells on a fibrillar collagen coating. *PLoS One* 7 (2012), Nr. 3, S. e33225
- [90] BARBERI, T.; WILLIS, L. M.; SOCCI, N. D. ; STUDER, L.: Derivation of multipotent mesenchymal precursors from human embryonic stem cells. *PLoS Med.* 2 (2005), Nr. 6, S. e161
- [91] TRIVEDI, P.; HEMATTI, P.: Simultaneous generation of CD34+ primitive hematopoietic cells and CD73+ mesenchymal stem cells from human embryonic stem cells cocultured with murine OP9 stromal cells. *Exp. Hematol.* 35 (2007), Nr. 1, S. 146–54
- [92] LIU, X.; SUN, H.; QI, J.; WANG, L.; HE, S.; LIU, J.; FENG, C.; CHEN, C.; LI, W.; GUO, Y.; QIN, D.; PAN, G.; CHEN, J.; PEI, D. ; ZHENG, H.: Sequential introduction of reprogramming factors reveals a time-sensitive requirement for individual factors and a sequential EMT-MET mechanism for optimal reprogramming. *Nat. Cell Biol.* 15 (2013), Nr. 7, S. 829–38
- [93] LEE, E. J.; LEE, H.-N.; KANG, H.-J.; KIM, K.-H.; HUR, J.; CHO, H.-J.; LEE, J.; CHUNG, H.-M.; CHO, J.; CHO, M.-Y.; OH, S.-K.; MOON, S.-Y.; PARK, Y.-B. ; KIM, H.-S.: Novel embryoid body-based method to derive mesenchymal stem cells from human embryonic stem cells. *Tissue Eng. Part A* 16 (2010), Nr. 2, S. 705–15
- [94] DIEDERICHS, S.; TUAN, R.: Functional comparison of human-induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal cells and bone marrow-derived mesenchymal stromal cells from the same donor. *Stem Cells Dev.* 23 (2014), Nr. 14, S. 1594–1610
- [95] LIAN, Q.; ZHANG, Y.; ZHANG, J.; ZHANG, H. K.; WU, X.; ZHANG, Y.; LAM, F. F.-Y.; KANG, S.; XIA, J. C.; LAI, W.-H.; AU, K.-W.; CHOW, Y. Y.; SIU, C.-W.; LEE, C.-N. ; TSE, H.-F.: Functional mesenchymal stem cells derived from human

- induced pluripotent stem cells attenuate limb ischemia in mice. *Circulation* 121 (2010), Nr. 9, S. 1113–23
- [96] KALLURI, R.; WEINBERG, R.: The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* 119 (2009), Nr. 6, S. 1420–1428
- [97] GREENBURG, G.; HAY, E. D.: Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J. Cell Biol.* 95 (1982), S. 333–339
- [98] HAY, E. D.: An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat. (Basel)*. 154 (1995), S. 8–20
- [99] ACLOQUE, H.; ADAMS, M. S.; FISHWICK, K.; BRONNER-FRASER, M. ; NIETO, M. A.: Review series Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *J. Clin. Invest.* 119 (2009), Nr. 6, S. 1438–1449
- [100] ZEISBERG, M.; NEILSON, E.: Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J. Clin. Invest.* 119 (2009), Nr. 6, S. 1429–1437
- [101] KALLURI, R.: EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J. Clin. Invest.* 119 (2009), Nr. 6, S. 1417–1419
- [102] MOUSTAKAS, A.; HELDIN, C.-H.: Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression. *Cancer Sci.* 98 (2007), Nr. 10, S. 1512–20
- [103] MANI, S. A.; GUO, W.; LIAO, M.-J.; EATON, E. N.; AYYANAN, A.; ZHOU, A. Y.; BROOKS, M.; REINHARD, F.; ZHANG, C. C.; SHIPITSIN, M.; CAMPBELL, L. L.; POLYAK, K.; BRISKEN, C.; YANG, J. ; WEINBERG, R. A.: The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133 (2008), Nr. 4, S. 704–15
- [104] CHEN, Y.; PELEKANOS, R.; ELLIS, R.; HORNE, R.; WOLVETANG, E. J. ; FISK, N. M.: Small molecule mesengenic induction of human induced pluripotent stem cells to generate mesenchymal stem/stromal cells. *Stem Cells Transl. Med.* 1 (2012), S. 83–95
- [105] LINDSLEY, R. C.; GILL, J. G.; MURPHY, T. L.; LANGER, E. M.; CAI, M.; MAS-HAYEKHI, M.; WANG, W.; NIWA, N.; NERBONNE, J. M.; KYBA, M. ; MURPHY, K. M.: Mesp1 coordinately regulates cardiovascular fate restriction and epithelial-mesenchymal transition in differentiating ESCs. *Cell Stem Cell* 3 (2008), Nr. 1, S. 55–68
- [106] SONCIN, F.; WARD, C. M.: The function of e-cadherin in stem cell pluripotency and self-renewal. *Genes (Basel)*. 2 (2011), Nr. 1, S. 229–59
- [107] EASTHAM, A. M.; SPENCER, H.; SONCIN, F.; RITSON, S.; MERRY, C. L. R.; STERN, P. L. ; WARD, C. M.: Epithelial-mesenchymal transition events during human embryonic stem cell differentiation. *Cancer Res.* 67 (2007), Nr. 23, S. 11254–62

- [108] THIERY, J. P.; SLEEMAN, J. P.: Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7 (2006), Nr. 2, S. 131–42
- [109] EVSEENKO, D.; ZHU, Y.; SCHENKE-LAYLAND, K.; KUO, J.; LATOUR, B.; GE, S.; SCHOLE, J.; DRAVID, G.; LI, X.; MACLELLAN, W. R. ; CROOKS, G. M.: Mapping the first stages of mesoderm commitment during differentiation of human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (2010), Nr. 31, S. 13742–7
- [110] BOYD, N.; ROBBINS, K.: Human embryonic stem cell-derived mesoderm-like epithelium transitions to mesenchymal progenitor cells. *Tissue Eng.* 15 (2009), Nr. 8, S. 1897–1907
- [111] ULLMANN, U.; IN'T VELD, P.; GILLES, C.; SERMON, K.; DE RYCKE, M.; VAN DE VELDE, H.; VAN STEIRTEGHEM, A. ; LIEBAERS, I.: Epithelial-mesenchymal transition process in human embryonic stem cells cultured in feeder-free conditions. *Mol. Hum. Reprod.* 13 (2007), Nr. 1, S. 21–32
- [112] BAJPAI, V. K.; MISTRITIS, P.; LOH, Y.-H.; DALEY, G. Q. ; ANDREADIS, S. T.: Functional vascular smooth muscle cells derived from human induced pluripotent stem cells via mesenchymal stem cell intermediates. *Cardiovasc. Res.* 96 (2012), Nr. 3, S. 391–400
- [113] BILLS, C. E.; EISENBER, H. ; PALLANTE, S. L.: Complexes of organic acids with calcium phosphate: von Kossa stain as a clue to composition of bone mineral. *Johns Hopkins Med. J.* 128 (1971), Nr. 4, S. 194–207
- [114] LILLIE, R. D.; ASHBURN, L. L.: Supersaturated solutions of fat stains in dilute isopropanol for demonstration of acute fatty degeneration not shown by Herxheimer's technique. *Arch. Pathol.* 36 (1943)
- [115] ULRICH, G.; ZIESSEL, R. ; HARRIMAN, A.: Die vielseitige Chemie von Bodipy-Fluoreszenzfarbstoffen. *Angew. Chemie* 120 (2008), Nr. 7, S. 1202–1219
- [116] KAISER, R. D.; LONDON, E.: Determination of the depth of BODIPY probes in model membranes by parallax analysis of fluorescence quenching. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1375 (1998), Nr. 1-2, S. 13–22
- [117] SCOTT, J.; QUINTARELLI, G. ; DELLOVO, M.: The chemical and histochemical properties of Alcian Blue. *Histochemie* 4 (1964), Nr. 2, S. 73–85
- [118] SCOTT, J.: Histochemistry of Alcian blue. *Histochemie* 32 (1972), S. 191–212
- [119] CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162 (1987), Nr. 1, S. 156–159
- [120] SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W.: *Molecular Cloning*. Bd. 18. Third Edit. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001

- [121] LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D.: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25 (2001), Nr. 4, S. 402–8
- [122] PFAFFL, M. W.; PHYSIOLOGIE, L. ; WEIHENSTEPHAN, W.: Real-time RT-PCR : Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOSpektrum* 1 (2004), S. 92–95
- [123] FEWELL, G. D.; SCHMITT, K.: Vector-based RNAi approaches for stable, inducible and genome-wide screens. *Drug Discov. Today* 11 (2006), S. 975–982
- [124] MOORE, C. B.; GUTHRIE, E. H.; HUANG, M. T.-h. ; TAXMAN, D. J.: Short Hairpin RNA (shRNA): Design, Delivery, and Assessment of Gene Knockdown. *Methods Mol Biol.* 629 (2010), Nr. 2, S. 141–158
- [125] POORTER, J. J.; LIPINSKI, K. S.; NELISSEN, R. G. H. H.; HUIZINGA, T. W. J. ; HOEBEN, R. C.: Optimization of short-term transgene expression by sodium butyrate and ubiquitous chromatin opening elements (UCOEs). *J. Gene Med.* 9 (2007), S. 639–648
- [126] WATANABE, K.; UENO, M.; KAMIYA, D.; NISHIYAMA, A.; MATSUMURA, M.; WATAYA, T.; TAKAHASHI, J. B.; NISHIKAWA, S.; NISHIKAWA, S.-i.; MUGURUMA, K. ; SASAI, Y.: A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cell. *Nat. Biotechnol.* 25 (2007), Nr. 6, S. 681–6
- [127] NEMATI, S.; HATAMI, M.; KIANI, S.; HEMMESI, K.; GOURABI, H.; MASOUDI, N.; ALAEI, S. ; BAHARVAND, H.: Long-term self-renewable feeder-free human induced pluripotent stem cell-derived neural progenitors. *Stem Cells Dev.* 20 (2011), Nr. 3, S. 503–14
- [128] GUZZO, R. M.; GIBSON, J.; XU, R.-H.; LEE, F. Y. ; DRISSI, H.: Efficient differentiation of human iPSC-derived mesenchymal stem cells to chondroprogenitor cells. *J. Cell. Biochem.* 114 (2013), Nr. 2, S. 480–90
- [129] GANG, E. J.; BOSNAKOVSKI, D.; FIGUEIREDO, C. A.; VISSER, J. W. ; PERLINGEIRO, R. C. R.: SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. *Blood* 109 (2007), Nr. 4, S. 1743–51
- [130] PHINNEY, D. G.; PROCKOP, D. J.: Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair—current views. *Stem Cells* 25 (2007), Nr. 11, S. 2896–902
- [131] CHEN, Y.-J.; LI, H.-Y.; HUANG, C.-H.; TWU, N.-F.; YEN, M.-S.; WANG, P.-H.; CHOU, T.-Y.; LIU, Y.-N.; CHAO, K.-C. ; YANG, M.-H.: Oestrogen-induced epithelial-mesenchymal transition of endometrial epithelial cells contributes to the development of adenomyosis. *J. Pathol.* 222 (2010), Nr. 3, S. 261–70
- [132] PARK, S.-H.; CHEUNG, L. W. T.; WONG, A. S. T. ; LEUNG, P. C. K.: Estrogen regulates Snail and Slug in the down-regulation of E-cadherin and induces metastatic potential of ovarian cancer cells through estrogen receptor alpha. *Mol. Endocrinol.* 22 (2008), Nr. 9, S. 2085–98

- [133] XU, J.; LAMOUILLE, S. ; DERYNCK, R.: TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res.* 19 (2009), Nr. 2, S. 156–72
- [134] XIE, L.; LAW, B. K.; CHYTIL, A. M.; BROWN, K. A.; AAKRE, M. E. ; MOSES, H. L.: Activation of the Erk pathway is required for TGF-beta1-induced EMT in vitro. *Neoplasia* 6 (2004), Nr. 5, S. 603–10
- [135] ZAVADIL, J.; BÖTTINGER, E. P.: TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* 24 (2005), Nr. 37, S. 5764–74
- [136] SCHÄCK, L. M.; NOACK, S.; WINKLER, R.; WISSMANN, G.; BEHRENS, P.; WELLMANN, M.; JAGODZINSKI, M.; KRETTEK, C. ; HOFFMANN, A.: The Phosphate Source Influences Gene Expression and Quality of Mineralization during In Vitro Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *PLoS One* 8 (2013), Nr. 6, S. e65943
- [137] RODEHEFFER, M. S.; BIRSOY, K. ; FRIEDMAN, J. M.: Identification of White Adipocyte Progenitor Cells In Vivo. *Cell* 135 (2008), Nr. 2, S. 240–249
- [138] SOWA, Y.; IMURA, T.; NUMAJIRI, T.; TAKEDA, K.; MABUCHI, Y.; MATSUZAKI, Y. ; NISHINO, K.: Adipose stromal cells contain phenotypically distinct adipogenic progenitors derived from neural crest. *PLoS One* 8 (2013), Nr. 12
- [139] SEO, E.; BASU-ROY, U.; GUNARATNE, P. H.; COARFA, C.; LIM, D. S.; BASILICO, C. ; MANSUKHANI, A.: SOX2 Regulates YAP1 to Maintain Stemness and Determine Cell Fate in the Osteo-Adipo Lineage. *Cell Rep.* 3 (2013), Nr. 6, S. 2075–2087
- [140] HAN, S.-M.; HAN, S.-H.; COH, Y.-R.; JANG, G.; CHAN RA, J.; KANG, S.-K.; LEE, H.-W. ; YOUN, H.-Y.: Enhanced proliferation and differentiation of Oct4- and Sox2-overexpressing human adipose tissue mesenchymal stem cells. *Exp. Mol. Med.* 46 (2014), Nr. 6, S. e101
- [141] SCHÄCK, L. M.: *Charakterisierung humaner mesenchymaler Stromazellen aus dem Knochenmark: Kritische Bewertung für ein optimiertes Verständnis ihrer Funktion in vitro*, Medizinische Hochschule Hannover, Dissertation, 2013
- [142] LIU, J.; CHEN, W.; ZHAO, Z. ; XU, H. H. K.: Reprogramming of mesenchymal stem cells derived from iPSCs seeded on biofunctionalized calcium phosphate scaffold for bone engineering. *Biomaterials* 34 (2013), Nr. 32, S. 7862–72
- [143] OHNISHI, H.; ODA, Y.; AOKI, T.; TADOKORO, M.; KATSUBE, Y.; OHGUSHI, H.; HATTORI, K. ; YUBA, S.: A comparative study of induced pluripotent stem cells generated from frozen, stocked bone marrow- and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 6 (2012), Nr. 4, S. 261–71
- [144] CHEN, G.; GULBRANSON, D. R.; HOU, Z.; BOLIN, J. M.; RUOTTI, V.; PROBASCO, M. D.; SMUGA-OTTO, K.; HOWDEN, S. E.; DIOL, N. R.; PROPSON, N. E.; WAGNER, R.; LEE, G. O.; ANTOSIEWICZ-BOURGET, J.; TENG, J. M. C. ; THOMSON, J. A.: Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture. *Nat. Methods* 8 (2011), Nr. 5, S. 424–9

- [145] LUDWIG, T. E.; LEVENSTEIN, M. E.; JONES, J. M.; BERGGREN, W. T.; MITCHEN, E. R.; FRANE, J. L.; CRANDALL, L. J.; DAIGH, C. A.; CONARD, K. R.; PIEKARCZYK, M. S.; LLANAS, R. A. ; THOMSON, J. A.: Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nat. Biotechnol.* 24 (2006), Nr. 2, S. 185–7
- [146] YAO, S.; CHEN, S.; CLARK, J.; HAO, E.; BEATTIE, G. M.; HAYEK, A. ; DING, S.: Long-term self-renewal and directed differentiation of human embryonic stem cells in chemically defined conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006), Nr. 18, S. 6907–12
- [147] LIANG, G.; ZHANG, Y.: Genetic and epigenetic variations in iPSCs: potential causes and implications for application. *Cell Stem Cell* 13 (2013), Nr. 2, S. 149–59
- [148] DOSS, M. X.; GASPAR, J. A.; WINKLER, J.; HESCHELER, J.; SCHULZ, H. ; SACHINIDIS, A.: Specific gene signatures and pathways in mesodermal cells and their derivatives derived from embryonic stem cells. *Stem Cell Rev.* 8 (2012), Nr. 1, S. 43–54
- [149] HWANG, N.; VARGHESE, S.: In vivo commitment and functional tissue regeneration using human embryonic stem cell-derived mesenchymal cells. *Natl. Acad. Sci.* 105 (2008), Nr. 52, S. 20641–30646
- [150] HAWKINS, K. E.; SHARP, T. V. ; MCKAY, T. R.: The role of hypoxia in stem cell potency and differentiation. *Regen. Med.* 8 (2013), S. 771–82
- [151] PRADO-LOPEZ, S.; CONESA, A.; ARMIÑÁN, A.; MARTÍNEZ-LOSA, M.; ESCOBEDO-LUCEA, C.; GANDIA, C.; TARAZONA, S.; MELGUIZO, D.; BLESÁ, D.; MONTANER, D.; SANZ-GONZÁLEZ, S.; SEPÚLVEDA, P.; GÖTZ, S.; O’CONNOR, J. E.; MORENO, R.; DOPAZO, J.; BURKS, D. J. ; STOJKOVIC, M.: Hypoxia promotes efficient differentiation of human embryonic stem cells to functional endothelium. *Stem Cells* 28 (2010), S. 407–418
- [152] YODMUANG, S.; MAROLT, D.; MARCOS-CAMPOS, I.; GADJANSKI, I. ; VUNJAK-NOVAKOVIC, G.: Synergistic Effects of Hypoxia and Morphogenetic Factors on Early Chondrogenic Commitment of Human Embryonic Stem Cells in Embryoid Body Culture. *Stem Cell Rev. Reports* (2015)
- [153] LIM, H.-J.; HAN, J.; WOO, D.-H.; KIM, S.-E.; KIM, S.-K.; KANG, H.-G. ; KIM, J.-H.: Biochemical and morphological effects of hypoxic environment on human embryonic stem cells in long-term culture and differentiating embryoid bodies. *Mol. Cells* 31 (2011), S. 123–132
- [154] MURRAY, P.; EDGAR, D.: The topographical regulation of embryonic stem cell differentiation. *Philos. Trans. R. Soc. London. Ser. B* 359 (2004), S. 1009–1020
- [155] NAGY, A.; NAGY, K.: The mysteries of induced pluripotency: where will they lead? *Nat. Methods* 7 (2010), Nr. 1, S. 22–4

- [156] ZHAO, Q.; GREGORY, C. A.; LEE, R. H.; REGER, R. L.; QIN, L.; HAI, B.; PARK, M. S.; YOON, N.; CLOUGH, B.; MCNEILL, E.; PROCKOP, D. J. ; LIU, F.: MSCs derived from iPSCs with a modified protocol are tumor-tropic but have much less potential to promote tumors than bone marrow MSCs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2014), S. 1–6
- [157] IVANOVIC, Z.: Hypoxia or in situ normoxia: The stem cell paradigm. *J. Cell. Physiol.* 219 (2009), Nr. 2, S. 271–275
- [158] REN, H.; CAO, Y.; ZHAO, Q.; LI, J.; ZHOU, C.; LIAO, L.; JIA, M.; ZHAO, Q.; CAI, H.; HAN, Z. C.; YANG, R.; CHEN, G. ; ZHAO, R. C.: Proliferation and differentiation of bone marrow stromal cells under hypoxic conditions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 347 (2006), Nr. 1, S. 12–21
- [159] KEMPF, H.; OLMER, R.; KROPP, C.; RÜCKERT, M.; JARA-AVACA, M.; ROBLES-DIAZ, D.; FRANKE, A.; ELLIOTT, D. a.; WOJCIECHOWSKI, D.; FISCHER, M.; ROA LARA, A.; KENSAH, G.; GRUH, I.; HAVERICH, A.; MARTIN, U. ; ZWEIGERDT, R.: Controlling expansion and cardiomyogenic differentiation of human pluripotent stem cells in scalable suspension culture. *Stem cell reports* 3 (2014), S. 1132–1146
- [160] ZWI, L.; CASPI, O.; ARBEL, G.; HUBER, I.; GEPSTEIN, A.; PARK, I. H. ; GEPSTEIN, L.: Cardiomyocyte differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Circulation* 120 (2009), S. 1513–1523
- [161] WEI, H.; TAN, G.; MANASI; QIU, S.; KONG, G.; YONG, P.; KOH, C.; OOI, T. H.; LIM, S. Y.; WONG, P.; GAN, S. U. ; SHIM, W.: One-step derivation of cardiomyocytes and mesenchymal stem cells from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Res.* 9 (2012), Nr. 2, S. 87–100
- [162] WAGNER, W.; WEIN, F.; SECKINGER, A.; FRANKHAUSER, M.; WIRKNER, U.; KRAUSE, U.; BLAKE, J.; SCHWAGER, C.; ECKSTEIN, V.; ANSORGE, W. ; HO, A. D.: Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp. Hematol.* 33 (2005), Nr. 11, S. 1402–16
- [163] YANG, Z. X.; HAN, Z. B.; JI, Y. R.; WANG, Y. W.; LIANG, L.; CHI, Y.; YANG, S. G.; LI, L. N.; LUO, W. F.; LI, J. P.; DA CHEN, D.; DU, W. J.; CAO, X. C.; ZHUO, G. S.; WANG, T. ; HAN, Z. C.: CD106 identifies a subpopulation of mesenchymal stem cells with unique immunomodulatory properties. *PLoS One* 8 (2013), Nr. 3, S. 1–12
- [164] RYAN, J. M.; BARRY, F. P.; MURPHY, J. M. ; MAHON, B. P.: Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *J. Inflamm. (Lond).* 2 (2005), Nr. 8, S. 1–11
- [165] KARLSSON, C.; EMANUELSSON, K.; WESSBERG, F.; KAJIC, K.; AXELL, M. Z.; ERIKSSON, P. S.; LINDAHL, A.; HYLLNER, J. ; STREHL, R.: Human embryonic stem cell-derived mesenchymal progenitors—potential in regenerative medicine. *Stem Cell Res.* 3 (2009), Nr. 1, S. 39–50

- [166] LEVENSTEIN, M. E.; LUDWIG, T. E.; XU, R.-H.; LLANAS, R. A.; VANDENHEUVEL-KRAMER, K.; MANNING, D. ; THOMSON, J. A.: Basic fibroblast growth factor support of human embryonic stem cell self-renewal. *Stem Cells* 24 (2006), Nr. 3, S. 568–74
- [167] MURAGLIA, a.; CANCEDDA, R. ; QUARTO, R.: Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 7 (2000), S. 1161–1166
- [168] HYNES, K.; MENICANIN, D.; MROZIK, K.; GRONTHOS, S. ; BARTOLD, P. M.: Generation of functional mesenchymal stem cells from different induced pluripotent stem cell lines. *Stem Cells Dev.* 23 (2014), Nr. 10, S. 1084–1096
- [169] SHAMIS, Y.; SILVA, E. A.; HEWITT, K. J.; BRUDNO, Y.; LEVENBERG, S.; MOONEY, D. J. ; GARLICK, J. A.: Fibroblasts derived from human pluripotent stem cells activate angiogenic responses in vitro and in vivo. *PLoS One* 8 (2013), Nr. 12, S. e83755
- [170] QUINTANILLA, R. H.; ASPRER, J. S. T.; VAZ, C.; TANAVDE, V. ; LAKSHMIPATHY, U.: CD44 is a negative cell surface marker for pluripotent stem cell identification during human fibroblast reprogramming. *PLoS One* 9 (2014)
- [171] OSHIMORI, N.; FUCHS, E.: The harmonies played by TGF- β in stem cell biology. *Cell Stem Cell* 11 (2012), Nr. 6, S. 751–764
- [172] SÁNCHEZ-ELSNER, T.; BOTELLA, L. M.; VELASCO, B.; LANGA, C. ; BERNABÉU, C.: Endoglin expression is regulated by transcriptional cooperation between the hypoxia and transforming growth factor-beta pathways. *J. Biol. Chem.* 277 (2002), Nr. 46, S. 43799–808
- [173] LASTRES, P.; LETAMENDÍA, A.; ZHANG, H.; RIUS, C.; ALMENDRO, N.; RAAB, U.; LÓPEZ, L. a.; LANGA, C.; FABRA, A.; LETARTE, M. ; BERNABÉU, C.: Endoglin modulates cellular responses to TGF-beta 1. *J. Cell Biol.* 133 (1996), Nr. 5, S. 1109–21
- [174] NG SHAYNE KOH, SUSIE SASTRY, KONDURU S. R. CHASE, LUCAS LAKSHMIPATHY, UMA CHOONG, CLEO YANG, ZHENG VEMURI, MOHAN C. RAO, MAHENDRA S. TANAVDE, VIVEK, F. B.; NG, F.; BOUCHER, S.; KOH, S.; SASTRY, K. S. R.; CHASE, L.; LAKSHMIPATHY, U.; CHOONG, C.; YANG, Z.; VEMURI, M. C.; RAO, M. S. ; TANAVDE, V.: PDGF, TGF- β , and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and oste. *Blood* 112 (2008), Nr. 2, S. 295–307
- [175] TULI, R.; TULI, S.; NANDI, S.; HUANG, X.; MANNER, P. A.; HOZACK, W. J.; DANIELSON, K. G.; HALL, D. J. ; TUAN, R. S.: Transforming growth factor-beta-mediated chondrogenesis of human mesenchymal progenitor cells involves N-cadherin and mitogen-activated protein kinase and Wnt signaling cross-talk. *J. Biol. Chem.* 278 (2003), Nr. 42, S. 41227–41236

- [176] HWANG, N. S.; KIM, M. S.; SAMPATTAVANICH, S.; BAEK, J. H.; ZHANG, Z. ; ELISSEEFF, J.: Effects of three-dimensional culture and growth factors on the chondrogenic differentiation of murine embryonic stem cells. *Stem Cells* 24 (2006), Nr. 2, S. 284–91
- [177] LIEB, E.; VOGEL, T.; MILZ, S.; DAUNER, M. ; SCHULZ, M. B.: Effects of transforming growth factor beta1 on bonelike tissue formation in three-dimensional cell culture. *Tissue Eng.* 10 (2004), Nr. 9-10, S. 1414–1425
- [178] ZHAO, L.; JIANG, S. ; HANTASH, B. M.: Transforming growth factor beta1 induces osteogenic differentiation of murine bone marrow stromal cells. *Tissue Eng. Part A* 16 (2010), Nr. 2, S. 725–733
- [179] WEI, Y.; ZENG, W.; WAN, R.; WANG, J.; ZHOU, Q.; QIU, S. ; SINGH, S. R.: Chondrogenic differentiation of induced pluripotent stem cells from osteoarthritic chondrocytes in alginate matrix. *Eur. Cell. Mater.* 23 (2012), S. 1–12
- [180] ZHANG, L.; HUANG, G.; LI, X.; ZHANG, Y.; JIANG, Y.; SHEN, J.; LIU, J.; WANG, Q.; ZHU, J.; FENG, X.; DONG, J. ; QIAN, C.: Hypoxia induces epithelial-mesenchymal transition via activation of SNAIL1 by hypoxia-inducible factor -1 α in hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* 13 (2013), Nr. 108, S. 1–9

Anhang

A Verwendete Geräte, Materialien und Chemikalien

A.1 Geräte

Tabelle A.1: Liste der verwendeten Geräte.

Gerät	Hersteller, Ort
Analysenwaage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
CO ₂ -Inkubator	Binder, Tuttlingen, Deutschland
CO ₂ -Inkubator	Heraeus, Hanau, Deutschland
Durchflusszytometer FACS Canto II	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Elektroporationssystem Gene Pulser Xcell	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Entwicklermaschine CAWOMAT 2000IR	CAWO, Schrobenhausen, Deutschland
Feinwaage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop BZ-9000	Keyence, Osaka, Japan
Geldokumentation	Intas, Göttingen, Deutschland
Heiz-Thermomixer MHR 23	Ditabis, Pforzheim, Deutschland
Horizontales Gelelektrophorese-System	BRL, Gaithersburg, USA
Inkubationsschüttler Certomat BS-1	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Deutschland
Kryostat CM 3050 S	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
Laboklav 160V-FA	SHP Steriltechnik AG, Detzel Schloss, Deutschland
Laboklav 25M	SHP Steriltechnik AG, Detzel Schloss, Deutschland
Laboklav 80MSLV	SHP Steriltechnik AG, Detzel Schloss, Deutschland
MACS Seperator	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
Magnetrührer RCT Basic	IKA-Werke, Staufen, Deutschland

Tabelle A.1 Fortsetzung: Liste der verwendeten Geräte.

Gerät	Hersteller, Ort
Mikroskop CKX41 mit Fluoreszenz-Kondensator CKX-RFA und Kamerasystem XC30	Olympus, Tokio, Japan
Mikrotiterplattenphotometer Synergy I	BioTek Instruments, Bad Friedrichshall, Deutschland
Mikrowelle	Sharp, Hamburg, Deutschland
pH-Meter	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Photometer Genesys 10 Bio	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Power Supply EV202	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Quecksilberlampe U-RFLT50	Olympus, Tokio, Japan
Real Time PCR System Step One Plus	Applied Biosystems, Kalifornien, USA
Röntgenkassette	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Semi Dry Blotter ohne Kühlung Fastblot B44	Omnilab, Bremen, Deutschland
Schüttler SD 5	Labortechnik Fröbel, Lindau, Deutschland
Sterilwerkbank	BDK, Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland
Sterilwerkbank (Mikrobiologie)	Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland
Thermocycler TProfessional Basic	Biometra, Göttingen, Deutschland
Transferpette	Brand, Wertheim, Deutschland
Trockenschrank	Heraeus, Hanau, Deutschland
Ultratiefkühlschrank -80 °C	SANYO Electric, Moriguchi, Japan
Ultratiefkühltruhe -152 °C	SANYO Electric, Moriguchi, Japan
UV-Küvette aus Quarzglas	Hellma, Mühlheim, Deutschland
Vortex Mixer VTX-3000 L	Kefo, Ljubljana, Slowakei
Wasserbad	P-D Industriegesellschaft, Dresden, Deutschland
Zählkammer Fuchs Rosenthal	Brand, Wertheim, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Biofuge Pico 17	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Biofuge Pico 21	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Fresco 21	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland

Tabelle A.1 Fortsetzung: Liste der verwendeten Geräte.

Gerät	Hersteller, Ort
Zentrifuge Heraeus Megafuge 16 R	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Multifuge 3 Plus SR (X3R)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland

A.2 Verwendete Materialien und Chemikalien

Verbrauchsmaterial

Tabelle A.2: Liste der Verbrauchsmaterialien.

Material	Hersteller, Ort
CompBeads Plus für Kompensation	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Deckgläschen	VWR International, Darmstadt, Deutschland
FACS-Röhrchen, 5 mL mit Rundboden	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Färbeküvette	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Filteraufsatz Millex-GP 0,22 µm	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Filteraufsatz Minisart 0,45 µm	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Folien Optical Adhesive Covers (qRT)	Life Technologies, Carlsbad, USA
Hyperfilm ECL	GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK
Lochplatte 6/12/24/48/96-Loch	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Lochplatte 96-Loch U-Form	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
MicroAmp TM Fast Optical 96-Well Reaction Plate	Life Technologies, Carlsbad, USA
MicroAmp TM Optical Adhesive Film	Life Technologies, Carlsbad, USA
Mikroreaktionsgefäß 1,5/2 mL	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Objektträger Super Frost Ultra Plus	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Parafilm	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pasteurpipetten	Roth, Karlsruhe, Deutschland
PCR Multiply-µStrip Pro 8er Kette	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
PCR-Gefäße 0,2 mL	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Tabelle A.2 Fortsetzung: Liste der Verbrauchsmaterialien.

Material	Hersteller, Ort
Petrischalen 143 cm ²	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Petrischalen für Suspensionskultur 8 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipetten Plastik 5/10/25 ml	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen 10/200/1000/1250 µL	Starlab, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen Filtertip 10/200/1000 µL	Starlab, Hamburg, Deutschland
PVDF-Membran (Immobilon P)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Spritze 20 mL	Roth, Karlsruhe, Deutschland
UV-Küvette aus Quarzglas	Hellma, Mühlheim, Deutschland
Whatman Papier 3 mm	Omnilab, Bremen, Deutschland
Zellkulturflasche 25/75/175 cm ²	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturflasche 300 cm ²	Biochrom, Berlin, Deutschland
Zellsieb 100 µm	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Zentrifugenröhrchen 15/50 mL	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland

Kits und Chemikalien

Tabelle A.3: Liste der verwendeten Kits.

Bezeichnung	Hersteller, Ort
GeneJET Gel Extraction Kit	life technologies, Carlsbad, USA
JETSTAR Plasmid Purification Kit 2.0 Maxi	Genomed, Löhne, Deutschland
RevertAid First Strand cDNA-Synthesis Kit	life technologies, Carlsbad, USA
CompBeads Set	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA

Tabelle A.4: Liste der verwendeten Chemikalien, Medien und deren Zusätze.

Bezeichnung	Hersteller, Ort
β -Glycerophosphat-Pentahydrat	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
1-Brom-3-chlorpropan	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
2-Mercaptoethanol (50 mM, für Zellkultur)	life technologies, Carlsbad, USA
2-Mercaptoethanol (für mRNA-Aufreinigung)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
2-Propanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Acrylamid/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Alcianblau 8 GX	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Alizarinrot S	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Amphotericin B	Biochrom, Berlin, Deutschland
Ampicillin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ascorbat-2-Phosphat	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
bFGF, human	Peptotech, Hamburg, Deutschland
Biocoll	Biochrom, Berlin, Deutschland
BODIPY 493/503	life technologies, Carlsbad, USA
Bovines Serum Albumin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Calciumchlorid-Dihydrat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
DAPI	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
dATP/dCTP/dGTP/dNTP/dTTP	GE Healthcare, München, Deutschland
Dexamethason	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Dimethylsulfoxid	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Dithiotreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
DMEM high glucose	Biochrom, Berlin, Deutschland
DMEM low glucose	Biochrom, Berlin, Deutschland
DNA Stain Clear G	SERVA, Heidelberg, Deutschland
Doxycyclin-Hydrochlorid	Biochrom, Berlin, Deutschland
EDTA-Na ₂ · 2 H ₂ O	Roth, Karlsruhe, Deutschland
EGF, human	Peptotech, Hamburg, Deutschland
Essigsäure konzentriert	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol p.a. abs.	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle A.4 Fortsetzung: Liste der verwendeten Chemikalien, Medien und deren Zusätze.

Bezeichnung	Hersteller, Ort
FCS Hyclone	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Ficoll-400	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Gelatine Typ B	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Gentamycin	Biochrom, Berlin, Deutschland
Glucose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin p.a.	Roth, Karlsruhe, Deutschland
HEPES (1 M)	Biochrom, Berlin, Deutschland
IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthine)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Igepal CA-630	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Indomethacin	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Insulin, human (10 mg/mL)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
ITS + Supplements	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
KH ₂ PO ₄	Roth, Karlsruhe, Deutschland
KnockOut TM DMEM	life technologies, Carlsbad, USA
KnockOut TM Serum Replacement	life technologies, Carlsbad, USA
LB Agar	Roth, Karlsruhe, Deutschland
LB Medium	Roth, Karlsruhe, Deutschland
L-Glutamin	Biochrom, Berlin, Deutschland
Matrigel TM	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Methanol p.a.	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Na ₄ H ₂ PO ₇ · 10 H ₂ O	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumbutyrat	Biochrom, Berlin, Deutschland
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat-Monophosphat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumfluorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumpyruvat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Nicht-essentielle Aminosäuren (100x)	life technologies, Carlsbad, USA

Tabelle A.4 Fortsetzung: Liste der verwendeten Chemikalien, Medien und deren Zusätze.

Bezeichnung	Hersteller, Ort
Oil Red O	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Orange G	Roth, Karlsruhe, Deutschland
<i>para</i> -Formaldehyd	Roth, Karlsruhe, Deutschland
PBS	Biochrom, Berlin, Deutschland
PDGF-AB, human	Peptotech, Hamburg, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin, Deutschland
Poly-L-Lysin	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Polybrene	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Prolin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Puromycin	PAA Laboratories, Les Mureaux, Frankreich
Random Hexamer Primer	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Ribolock Rnase Inhibitor	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
ROCK-Inhibitor	synthetisiert an der Leibniz Universität Hannover
Safranin O	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure (37 %)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
SDS ultra pure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Silbernitrat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
SOB Medium	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Taq Man Fast Advanced Master Mix	life technologies, Carlsbad, USA
Taq Man Probes	life technologies, Carlsbad, USA
TEMED	Roth, Karlsruhe, Deutschland
TGF- β 1	Peptotech, Hamburg, Deutschland
TGF- β 3	Peptotech, Hamburg, Deutschland
Tissue-Tek O.C.T. Einbettmedium für Kryoschnitte	Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, Niederlande
TriReagent RNA Solution (Trizol)	Ambion, Austin, USA
TRIS-Base	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin/EDTA (10x)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Tween-20	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Antikörper

Alle Antikörper und Isotypkontrollen, die für FCM und FACS verwendet und bei Biolegend bezogen wurden, lagen als Phosphat-gepufferte Lösungen (pH = 7,2) vor. Diese enthielten 0,09 % Natriumazid und 0,2 % (w/v) BSA.

Tabelle A.5: Liste der für FCM und FACS verwendeten Antikörper. Alle Antikörper sind gegen humanes Gewebe gerichtet und stammen bis auf SSEA-3 aus der Wirtsspezies Maus, der SSEA-3-Antikörper stammt aus der Wirtsspezies Ratte.

Antigen	Konjugat	Isotyp	Klon	Hersteller, Ort
anti-Maus	Alexa 488	k.A.	k.A.	Life Technologies, Carlsbad, USA
CD13	APC-Cy7	IgG1 κ	WM15	Biolegend, San Diego, USA
CD14	APC	IgG2a κ	M5E2	Biolegend, San Diego, USA
CD24	FITC	IgG2a κ	ML5	Biolegend, San Diego, USA
CD34	PE-Cy7	IgG1 κ	581	Biolegend, San Diego, USA
CD44	FITC	IgG1 κ	BJ18	Biolegend, San Diego, USA
CD45	APC-Cy7	IgG1 κ	H130	Biolegend, San Diego, USA
CD56	PE-Cy7	IgG2a κ	MEM-188	Biolegend, San Diego, USA
CD73	APC	IgG1 κ	AD2	Biolegend, San Diego, USA
CD90	PerCP 5.5	IgG1 κ	5E 07	Biolegend, San Diego, USA
CD105	PE	IgG1 κ	43A3	Biolegend, San Diego, USA
CD106	APC	IgG1 κ	STA	Biolegend, San Diego, USA
CD146	PE-Cy7	IgG2a κ	SHM-57	Biolegend, San Diego, USA
CD271	PerCP 5.5	IgG1 κ	ME20.4	Biolegend, San Diego, USA
HLA-DR	PE	IgG2b κ	LN3	Biolegend, San Diego, USA
SSEA-3	Alexa 647	IgM κ	MC-631	Biolegend, San Diego, USA
SSEA-4	FITC	IgG3 κ	MC-813-70	Biolegend, San Diego, USA
SSEA-5	-	IgG3 κ	17-206	Abcam, Cambridge, England
SSEA-5	FITC	IgG1 κ	8e11	Biolegend, San Diego, USA
TRA-1-60 R	Alexa 647	IgM κ	TRA-1-60-R	Biolegend, San Diego, USA
TRA-1-81	Alexa 647	IgM κ	TRA-1-81	Biolegend, San Diego, USA

Tabelle A.6: Liste der für FCM verwendeten Isotypkontroll-Antikörper.

Isotyp	Konjugat	Klon	Hersteller, Ort
IgG1 κ	APC	MOPC-21	Biolegend, San Diego, USA
IgG2a, κ	APC	MOPC-173	Biolegend, San Diego, USA
IgM κ	Alexa 647	MM-30	Biolegend, San Diego, USA

Tabelle A.6 Fortsetzung:Liste der für FCM verwendeten Isotypkontroll-Antikörper.

Isotyp	Konjugat	Klon	Hersteller, Ort
IgG1 κ	APC-Cy7	MOPC-21	Biologend, San Diego, USA
IgG1 κ	FITC	MOPC-21	Biologend, San Diego, USA
IgG2a, κ	FITC	MOPC-173	Biologend, San Diego, USA
IgG3 κ	FITC	MG3-35	Biologend, San Diego, USA
IgG1 κ	PE	MOPC-21	Biologend, San Diego, USA
IgG2b, κ	PE	MPC-11	Biologend, San Diego, USA
IgG1 κ	PE-Cy7	MOPC-21	Biologend, San Diego, USA
IgG2a κ	PE-Cy7	MOPC-173	Biologend, San Diego, USA
IgG1 κ	PerCP Cy5.5	MOPC-21	Biologend, San Diego, USA

Tabelle A.7: Liste der für Western Blot verwendeten primären und sekundären Antikörper.

Antigen	Spezies	Klon	Verwendung	Hersteller, Ort
anti-HA	Kaninchen	Y-11	primärer Antikörper 1 : 5.000	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
anti-Kaninchen	Ziege	keine Angabe	sekundärer Antikörper 1 : 10.000	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, USA

Enzyme

Tabelle A.8: Liste der verwendeten Enzyme.

Enzym	Hersteller, Ort
Bam H I	New England BioLabs, Inc., Ipswich, USA
DNase I	New England BioLabs, Inc., Ipswich, USA
Go Taq Flexi DNA Polymerase	Promega GmbH, Madison, USA
Pfu Ultra Polymerase	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
RevertAid Reverse Transkriptase	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Sal I	New England BioLabs, Inc., Ipswich, USA
Shrimp Alkaline Phosphatase	Affymetrix, Santa Clara, USA
T4-DNA-Ligase	Promega GmbH, Madison, USA

Primer für die Polymerase Kettenreaktion (RT- und qRT-PCR)

Tabelle A.9: Liste der verwendeten Primer für die semiquantitative RT-PCR, inklusive Sequenzlänge in Basenpaaren (bp) des zu amplifizierenden Gens. Alle wurden bei Sigma Aldrich (St. Louis, USA) bestellt.

Genname	Primer-Sequenz (5' → 3')		Länge [bp]
	Vorwärts	Rückwärts	
Aggrecan	ccactcccacggcttct	agttctcaaattgcatggggtgctc	528,642
ALPL	ctggacctcgttgacacctg	gacattctctcgttcaccgc	546
BGLAP, Osteocalcin	ctcctcgcctattggcc	ccaactcgtcacagtccgg	235
BMP-4	acctgagacggggaagaaaa	ttaaagaggaaacgaaaagca	348
Cbfa-1, Runx2	taccagaccgagaccaacagag	caccaccgggtcacgtcgc	228
CD24	acctgtttcattcaacaagagcac	tctgagatcgaccactgcac	164
CD73, NT5E	caccaaggttcagcagatccgc	gttcatcaatgggcgaccgg	1007
CD73, NT5E	attgcaaagtggttcaaagtca	acacttggccagtaaaataggg	123
CD105	cttggcctacaattccagcc	cttgaggtgtgtctgggagc	542
CD146, MCAM	gtggtgaatctgtcttgtgaa	atgcctcagatcgatg	600
CDH1, E-Cadherin	tgggctggaccgagagagtt	atctccagccagttggcagt	612
Kollagen 1-A1	atccagctgaccttctctgcg	tccaagccgaattcctgtct	323
FABP4	gtacctggaaacttgtctcc	gttccaatgcgaacttcagtcc	418
HIF-1 α	cagaagatacaagtagcctc	ctgctggaataactgtaactg	674
HPRT	ggtcaggcagtataatccaaaga	aggctcatagtgcaaataaacagt	404
IBSP	aatgaaaacgaagaaagcgaa	atcatagccatcgtagccttg	450
Leptin	gctgtgccatccaaaaagt	actgccagtgtctgggtccat	182
LIN28A	ttgaggagcaggcagagtgg	tgcatthggacagagcatgg	162
LPL	aaagccctgctcgtgctgac	taaaccgggccacatcctgt	406
NANOG	ggacactggctgaatccttcc	ctcgtgattagctccaacc	143
POU5F1, OCT4	tcccatgattcaaactgagg	cctttgtgttccaattccttcc	148
PPAR- γ	gaatgtcgtgtctgtggaga	tgaggagagttacttggctg	628
SOX2	atggagaaaaccggtacgc	tttgcgtgagtgtggatgg	110
SPP1, Osteopontin	ccaagtaagtccaacgaaag	ggtgatgtcctcgtctgta	348
TGF- β 1	tcctgcttctcatggcca	cctcagctgcacttgcag	405
TGF- β 3	cataaattcgacatgatccagggg	gccatggtcatcctcattgtccac	465

Tabelle A.10: Liste der verwendeten Primer für die quantitative RT-PCR. Die TaqMan® Gene Expression Assays wurden alle bei Applied Biosystems/Life Technologies (Carlsbad, USA) bestellt.

Genname	Bestellnummer
18S rRNA	Hs99999901_s1
ACAN	Hs00153936_m1
ALPL	Hs00758162_m1
BGLAP, Osteocalcin	Hs01587814_g1
BMP2	Hs00154192_m1
CD4	Hs00181217_m1
CD24	Hs02379687_s1
CD31, PECAM1	Hs00169777_m1
CD34	Hs00990732_m1
CD44	Hs01075861_m1
CD56, NCAM1	Hs00941821_m1
CD73, NT5E	Hs00159686_m1
CD90	Hs00174816_m1
CD105, ENG	Hs00923996_m1
CD106, VCAM1	Hs01003372_m1
CD146	Hs00174838_m1
CD271, NGFR	Hs00609977_m1
CDH1, E-Cadherin	Hs01023894_m1
COL1 α 1	Hs00164004_m1
COL2 α 1 (kürzere Variante IIB)	Hs01064869_m1
FABP4	Hs00609791_m1
HIF-1 α	Hs00153153_m1
IBSP	Hs00173720_m1
LIN28A	Hs00702808_s1
NANOG	Hs04260366_g1
POU5F1, Oct-4	Hs04195369_s1 , Hs04260367_gH
PPAR- γ	Hs01115513_m1
RUNX2	Hs00231692_m1
SOX2	Hs01053049_s1
SOX9	Hs00165814_m1
SPP1, Osteopontin	Hs00959010_m1
TGF- β 3	Hs01086000_m1

A.3 Medien, Puffer und Lösungen

Tabelle A.11: Zusammensetzung der Zellkultur-Medien.

Medium	Zusammensetzung	Anteil/ Konzentration
MSC- Wachstumsmedium (MSC-GM)	DMEM Low Glucose	
	FCS Hyclone	10 % [v/v]
	HEPES	25 mM
	Penicillin	100 U/mL
	Streptomycin bFGF	100 µg/mL 2 ng/mL
iPS-MSC-Medium	KnockOut TM DMEM	
	KnockOut TM Serum Replacement	10 % [v/v]
	Penicillin	100 U/mL
	Streptomycin	100 µg/mL
	L-Glutamin	2 mM
	Nicht essentielle Aminosäuren	1 % [v/v]
	2-Mercaptoethanol	0,1 mM
	bFGF	10 ng/mL
	PDGF-AB	10 ng/mL
	EGF	10 ng/mL
Kontrollmedium (Adipogenese, Osteogenese)	DMEM Low Glucose	
	FCS Hyclone	10 % [v/v]
	HEPES	25 mM
	Penicillin Streptomycin	100 U/mL 100 µg/mL
Osteogenes Differen- zierungsmedium	DMEM Low Glucose	
	FCS Hyclone	10 % [v/v]
	HEPES	20 mM
	Penicillin	100 U/mL
	Streptomycin	100 µg/mL
	Dexamethason	0,1 µM
	Ascorbat-2-Phosphat	50 µM
	β-GP oder NaH ₂ PO ₄	10 mM oder 3 mM

Tabelle A.11 Fortsetzung: Zusammensetzung der Zellkultur-Medien.

Medium	Zutat	Anteil/ Konzentration
Adipogenes Differenzierungsmedium	DMEM High Glucose	
	FCS Hyclone	20 % [v/v]
	HEPES	20 mM
	Penicillin	100 U/mL
	Streptomycin	100 µg/mL
	Dexamethason	1 µM
	IBMX	0,5 mM
	Indomethacin	60 µM
Chondrogenes Grundmedium (ICIM)	Insulin (human)	10 µg/mL
	DMEM High Glucose	
	HEPES	20 mM
	Penicillin	100 U/mL
Chondrogenes Kontrollmedium (ICIM+)	Streptomycin	100 µg/mL
	ICIM	
	Dexamethason	0,1 µM
	ITS + Supplements	1 % [v/v]
	Ascorbat-2-Phosphat	170 µM
Chondrogenes Differenzierungsmedium	Natrium-Pyruvat	1 mM
	Prolin	350 µM
	ICIM+	
Medium für HEK-Zellen	TGF-β3	10 ng/mL
	DMEM ohne L-Glutamin	
	FCS	10 % [v/v]
	Penicillin	100 U/mL
	Streptomycin	100 µg/mL
	L-Glutamin	2 mM

Tabelle A.12: Zusammensetzung verwendeter Puffer und Lösungen.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Blotpuffer 10x	60,57 g TRIS-Base 288,27 Glycin in 2 L demineralisiertem Wasser lösen
Blotpuffer 1x	100 mL 10x-Blotpuffer 200 mL Methanol 700 mL demineralisiertes Wasser

Tabelle A.12 Fortsetzung: Zusammensetzung verwendeter Puffer und Lösungen.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
BODIPY-Stammlösung (10 mM)	10 mg BODIPY-Pulver 3.815 µL DMSO
CoIP-Puffer	37,5 mL NaCl-Lösung (1 M) 5,0 mL TRIS-Lösung (1 M, pH=7,5) 2,5 mL EDTA-Lösung (0,2 M, pH=7,5) 2,5 g Igepal CA-630 0,5249 g NaF 0,1115 g Na ₄ P ₂ O ₇ · 10 H ₂ O
DAPI-Stammlösung (2 mM)	555 µg 1 mL demineralisiertes Wasser
dNTP-Mix (10 mM)	jeweils 40 µL dATP, dCTP, dGTP und dTTP 240 µL demineralisiertes Wasser
EDTA-Lösung (0,2 M, pH=7,5)	74,448 g EDTA-Na ₂ · 2 H ₂ O in 1 L demineralisiertem Wasser lösen und pH-Wert auf 7,5 einstellen (ca. 20 mL NaOH (10 M))
EDTA-Lösung (0,5 M, pH=7,5)	186,12 g EDTA-Na ₂ · 2 H ₂ O in 1 L demineralisiertem Wasser lösen und pH-Wert auf 7,5 einstellen
Lower Gel Puffer 4x	90,86 g TRIS Base in 400 mL demineralisiertem Wasser lösen und pH-Wert auf 8,8 einstellen (ca. 17 mL HCl (37 %)) mit demineralisiertem Wasser auf ein Gesamtvolumen 480 mL auffüllen dann 20 mL 10 %ige [w/v] SDS-Lösung zugeben
NaH₂PO₄-Lösung (0,5 M, pH=7,5)	34,50 g NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O in 500 mL demineralisiertem Wasser lösen und pH-Wert auf etwa 7,5 einstellen
Natriumacetat-Lösung (3 M, pH=5,7)	24,61 g Natriumacetat in 100 mL demineralisiertem Wasser lösen und pH-Wert auf 5,7 einstellen
Orange G-Lösung 10x	10 g Ficoll-400 50 mg Orange G in 50 mL TE-Puffer lösen (erwärmen auf ca. 60 °C)
PBS 10x	160,00 g NaCl 35,60 g NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O 5,44 g KH ₂ PO ₄ 4,00 g KCl in 2 L demineralisiertem Wasser lösen und pH-Wert auf 7,0 - 7,4 einstellen

Tabelle A.12 Fortsetzung: Zusammensetzung verwendeter Puffer und Lösungen.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
SDS-Probenpuffer 4 x	12,905 mL Upper Gel Puffer 2,580 g SDS 0,894 g Dithiothreitol unter erwärmen (50 - 60 °C) lösen 35 mL Glycerin mit wenigen Körnchen Bromphenolblau vermengen und mit der wässrigen Lösung mischen
TAE-Puffer 25x	121 g TRIS-Base 50 mL EDTA-Lösung (0,5 M) in 800 mL demineralisiertem Wasser lösen, pH-Wert auf 8,0 einstellen (ca. 40 mL Eisessig) und auf 1 L Gesamtvolumen auffüllen
TAE-Puffer 1x	40 mL 25x TAE-Puffer mit demineralisiertem Wasser auf 1 L auffüllen
TE-Puffer	5 mL TRIS-HCl (1 M) 250 µL EDTA (0,2 M) in 500 mL demineralisiertem Wasser lösen
TRIS-HCl (1 M, pH=7,5)	121,14 g TRIS-Base in 800 mL demineralisiertem Wasser lösen, pH-Wert auf 7,4 einstellen (ca. 18 mL HCl (37 %)) und auf 1 L Gesamtvolumen auffüllen
TBS 10x	30,29 g TRIS-Base 87,66 g NaCl 1,49 g KCl in 800 mL demineralisiertem Wasser lösen, pH-Wert auf 7,5 einstellen (ca. 70 mL HCl (37 %)) und auf 1 L Gesamtvolumen auffüllen
TTBS 0,1 %	200 mL 10x TBS 2 g Tween-20 mit demineralisiertem Wasser auf 2 L Gesamtvolumen auffüllen
Upper Gel Puffer	30,285 g TRIS-Base in 350 mL demineralisiertem Wasser lösen, pH-Wert auf 6,7 einstellen (ca. 19 mL HCl (37 %)) und auf 480 mL Gesamtvolumen auffüllen dann 20 mL 10 %ige [w/v] SDS-Lösung

B Hinweise zur Darstellung von qRT-Daten als Boxplot

In dieser Arbeit wird ein Teil der Genexpressionsdaten, die mittels qRT-PCR gewonnen wurden, als Boxplot-Diagramm dargestellt. Diese dienen der statistischen Darstellung von Messwerten. Eine schematische Darstellung ist in Abbildung B.1 gezeigt und wird an dieser Stelle kurz erläutert.

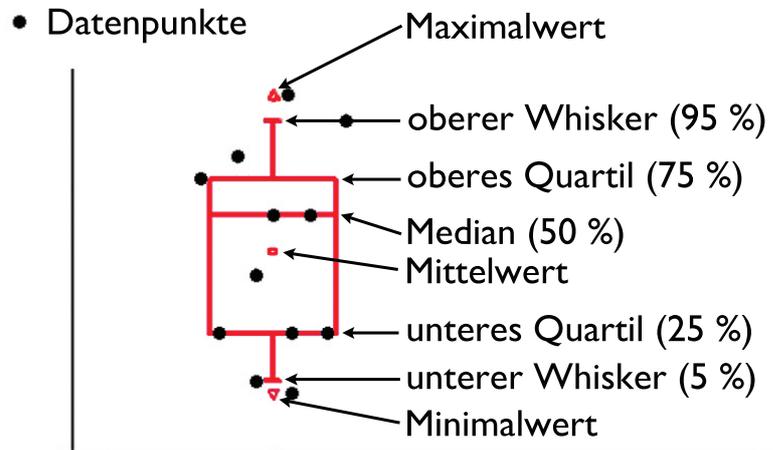


Abbildung B.1: Schematische Darstellung eines Boxplot-Diagramms zur statistischen Auswertung. Die in Klammern angegebenen prozentualen Anteile geben an, wie viele Messwerte unterhalb dieses Grenzwertes liegen.

Die große „Box“ in der Mitte stellt den Messwertebereich dar, in dem die mittleren 50 % aller Werte liegen. Dieser wird durch das untere und das obere Quartil begrenzt. Erstere gibt die Grenze an, unter der 25 % der Messwerte liegen. Unterhalb des oberen Quartils liegen entsprechend 75 % der Werte. Die Höhe der Box entspricht dem Maß der Streuung. Je größer sie ist, um so stärker streuen die Messwerte. Zwischen oberem und unterem Quartil ist der Median als durchgehende Linie in der Box dargestellt. Diese Linie gibt an, dass 50 % der Datenpunkte darüber und darunter liegen. Je nach Lage des Medians kann direkt abgeschätzt werden, ob die einzelnen Werte gleichmäßig verteilt (Median verläuft mittig durch die Box) oder zu hohen oder tiefen Werten hin verschoben sind. Bei extrem verschobenen Verteilungen und besonders bei wenigen Datenpunkten, kann es sein, dass kein Median angezeigt wird, da dieser mit dem oberen oder unteren Quartil zusammenfällt. Innerhalb der Box ist zusätzlich ein kleines Quadrat dargestellt, welches den Mittelwert anzeigt. Unterer und oberer Whisker geben ähnlich den Quartilen an, dass 5 bzw. 95 % der Daten darunter lokalisiert sind. Daneben zeigen die nach oben und nach unten spitz zulaufenden Dreiecke den jeweiligen Minimal- und Maximalwert an. Zum Teil werden in einem Boxplot zusätzliche Ausreißer dargestellt, darauf wurde in den vorliegenden Darstellungen allerdings verzichtet. Da der eigne Probenumfang relativ gering war, wurden stattdessen alle Datenpunkte dargestellt, sodass auch die absoluten Werte ersichtlich sind.

C FCM-Ergebnisse aller analysierten iPSC-Populationen

Tabelle C.1: Ergebnisse der FCM-Analysen aller hCB-iPSC-Populationen von Matrigel.

	hCB-iPSC von Matrigel in Passage								
	34.0	36.0	45.0	50.0	61.0	24.0	26.0	35.0	38.0
CD13	+ 82,7	+ 77,7	+ 33,4	+ 51,0	- 1,2	-,+ 9,9	+ 46,0	+ 11,1	+ 19,3
CD14	- 1,2	- 0,7	- 0,3	- 0,3	- 0,3	- 0,1	- 0,2	- 0,2	- 0,8
CD24	+, ++ 99,0	+, ++ 99,7	+, ++ 99,1	+, ++ 99,2	++ 97,1	+, + 79,9	+, ++ 76,0	+, ++ 96,4	+, ++ 99,4
CD34	- 3,0	- 3,1	- 2,3	- 1,9	- 1,8	- 1,4	- 1,5	- 1,4	- 1,4
CD44	++ 98,6	+ 96,4	+ 75,4	+ 87,9	- 3,3	- 5,8	- 7,3	+ 56,7	++ 96,1
CD45	- 0,9	- 0,6	- 0,4	- 0,3	- 0,5	- 0,3	- 0,3	- 0,5	- 0,4
CD56	+ 94,7	+ 98,6	+ 81,4	+ 82,7	+ 71,9	+ 98,3	+ 97,4	+ 92,9	+ 93,4
CD73	+, ++ 95,2	+, + 74,0	-, + 13,0	- 9,7	- 1,7	-, + 12,3	+ 32,5	+ 12,5	-, +, ++ 66,8
CD90	+, ++ 99,6	++ 99,6	+ 97,6	++ 98,1	+, ++ 98,0	++ 99,6	++ 99,1	++ 97,3	++ 99,8
CD105	+ 75,1	+ 65,9	- 1,0	- 1,0	- 2,2	-, + 8,6	-, + 9,8	+ 7,1	+ 87,0
CD106	- 2,0	- 1,3	- 0,8	- 0,4	- 0,2	- 2,5	- 1,0	- 1,3	- 3,0
CD146	++ 98,9	+ 97,6	+ 84,2	+ 91,5	+ 78,7	+ 79,4	+ 84,2	+ 61,2	+, ++ 93,2
SSEA-3	+ 94,6	+ 88,7	+ 39,8	+ 29,6	+ 31,0	- 4,2	-, + 13,9	- 2,9	+ 13,3
SSEA-4	++ 99,9	++ 99,8	++ 99,3	++ 98,9	++ 96,8	-, + 44,1	-, + 44,3	+, ++ 90,1	+, ++ 99,0
SSEA-5	+ 90,4	+, ++ 75,7	+, ++ 97,1	+, ++ 95,6	++ 93,8	-, + 27,7	-, + 24,7	+, + 76,3	+, ++ 88,1
TRA-1-60	+ 89,8	+ 88,0	+ 71,5	+, ++ 89,6	+ 68,4	-, + 9,6	-, + 46,6	-, + 8,9	+ 16,2

Tabelle C.2: Ergebnisse der FCM-Analysen aller hCB-iPSC-Populationen von Feeder-Zellen.

hCB-iPSC von Feeder-Zellen in Passage					
	36.0	42.0	45.0	50.0	61.0
CD13	+, ++ 77,0		+ 46,9	+ 79,5	- 6,5
CD14	- 1,0		- 0,4	- 0,3	- 0,2
CD24	+, ++ 97,3	+ 97,9	+, ++ 98,0	+, ++ 97,4	+, ++ 98,2
CD34	- 3,0	- 1,3	- 1,6	- 1,3	- 4,9
CD44	+ 94,8	+ 95,8	+ 62,0	-, + 5,4	- 3,3
CD45	- 0,7	- 0,4	- 0,6	- 0,4	- 1,0
CD56	+ 89,0	+ 68,2	+ 79,2	+ 79,0	+ 53,7
CD73	-, + 40,5	-, + 24,5	- 2,1	- 2,5	- 0,5
CD90	+, ++ 93,5	++ 97,3	+ 97,4	++ 97,5	+ 95,7
CD105	+ 41,1	- 1,7	- 1,4	- 1,7	- 0,7
CD106	- 0,7	- 0,8	- 1,0	- 1,7	- 0,8
CD146	+ 92,8	+ 95,1	+ 76,9	+ 70,9	- 4,4
SSEA-3	+ 93,2	+ 83,5	+ 55,2	+ 82,3	+ 28,4
SSEA-4	+, ++ 99,1	++ 98,7	++ 99,4	++ 97,5	++ 98,8
SSEA-5	+, ++ 95,8		+ 98,7	+, ++ 95,2	+, ++ 97,5
TRA-1-60	+, ++ 92,8	+ 94,6	+ 83,8	+, ++ 93,5	+ 62,3

Tabelle C.3: Ergebnisse der FCM-Analysen aller hHSC-iPSC-Populationen von Matrigel.

hHSC-iPSC von Matrigel in Passage				
	23.0	31.0	36.0	47.0
CD13	+	+	+, ++	-
	86,2	60,9	78,9	2,4
CD14	-	-	-	-
	1,0	0,3	0,4	0,1
CD24	+	+, ++	+, ++	++
	99,1	88,3	95,0	99,5
CD34	-	-	-	-
	5,3	3,8	2,8	2,0
CD44	+, ++	-, +	+, ++	+
	79,4	39,2	76,8	78,8
CD45	-	-	-	-
	0,7	0,7	0,7	0,4
CD56	+, ++	+, ++	+	+
	92,0	62,6	65,7	87,9
CD73	-, +	-, +	-, +	-
	23,0	12,1	24,5	3,6
CD90	++	+, ++	+	++
	99,1	86,2	97,6	99,0
CD105	-, +	-, +	-, +	-, +
	20,5	16,5	25,3	58,8
CD106	-	-	-, +	-
	2,8	4,0	13,1	0,1
CD146	+	+	+	+
	90,0	72,5	86,2	70,5
SSEA-3	+, +	+	+, +	+
	68,6	14,4	74,2	8,6
SSEA-4	+, ++	+, ++	+, ++	++
	98,4	75,0	94,6	99,6
SSEA-5	+, ++	+, ++	+, ++	++
	70,6	70,8	91,9	98,7
TRA-1-60	+, ++	-, +	+, +	+
	67,5	41,5	86,0	40,2

Tabelle C.4: Ergebnisse der FCM-Analysen aller hHSC-iPSC-Populationen von Feeder-Zellen.

hHSC-iPSC von Feeder-Zellen in Passage					
	23.0	29.0	31.0	36.0	47.0
CD13	+		+	+	-
	83,5		72,6	47,2	2,5
CD14	-		-	-	-
	0,5		0,5	0,4	0,2
CD24	+, ++	+, ++	+, ++	+, ++	+, ++
	97,6	95,5	92,6	98,1	99,1
CD34	-	-	-	-	-
	5,8	1,8	2,4	2,3	3,1
CD44	+	+	+	+	+
	53,6	81,3	59,5	74,8	46,8
CD45	-	-	-	-	-
	1,1	0,5	0,7	0,5	0,7
CD56	+, ++	+, ++	+, ++	+	+
	80,7	79,3	63,5	84,4	79,4
CD73	-	-	-	-	-
	2,3	1,4	6,6	1,5	0,2
CD90	+, ++	+, ++	+, ++	+	++
	89,0	87,5	91,9	96,0	96,1
CD105	-	-, +	-, +	-	-
	2,0	13,8	8,6	1,2	0,2
CD106	-	-	-	-	-
	3,0	1,2	3,4	1,1	0,3
CD146	+	+	+	+	+
	75,3	75,7	78,4	79,0	62,0
SSEA-3	-, +	-, +	+	-, +	+
	43,3	46,6	63,8	18,6	9,6
SSEA-4	+, ++	+, ++	+, ++	+	++
	95,2	86,4	88,6	98,7	99,3
SSEA-5	-, +		+, ++	+, ++	+, ++
	62,9		82,4	94,2	98,5
TRA-1-60	-, ++	-, +	+, ++	-, +	-, +
	65,5	64,5	84,8	54,6	31,4

Tabelle C.5: Ergebnisse der FCM-Analysen aller hFF-iPSC-Populationen von Matrigel.

hFF-iPSC von Matrigel in Passage				
	31.0	37.0	41.0	40.0
CD13	- 4,8	+ 49,9	+ 43,1	-, + 13,3
CD14	- 0,3	- 0,3	- 0,3	- 0,0
CD24	+, ++ 98,9	+, ++ 93,7	+, ++ 91,9	+, ++ 96,7
CD34	- 1,9	- 1,0	- 2,4	- 2,0
CD44	-, + 12,1	-, + 19,3	-, + 15,9	-, + 16,8
CD45	- 0,2	- 0,5	- 0,4	- 1,5
CD56	+, ++ 82,5	+, ++ 85,0	-, + 35,0	+, ++ 89,6
CD73	- 7,1	-, + 11,2	- 6,2	-, + 8,4
CD90	-, ++ 90,7	+, ++ 95,3	+, + 85,0	++ 97,9
CD105	- 3,3	- 5,6	-, + 6,0	- 3,7
CD106	- 2,2	- 2,6	-, + 10,5	- 1,4
CD146	+ 78,4	+ 78,7	-, + 12,1	+ 73,8
SSEA-3	-, + 49,9	-, + 29,6	-, + 24,1	
SSEA-4	-, + 82,0	+, ++ 80,6	+, ++ 79,0	+, ++ 88,0
SSEA-5		-, + 50,7	-, + 38,3	+, ++ 87,3
TRA-1-60	-, + 64,4	-, + 49,1	-, + 29,9	+ 55,5

Tabelle C.6: Ergebnisse der FCM-Analysen aller hFF-iPSC-Populationen von Feeder-Zellen.

hFF-iPSC von Feeder-Zellen in Passage			
	31.0	41.0	40.0
CD13	+ 63,1	+ 61,0	-, + 42,3
CD14	- 0,2	- 0,7	- 0,2
CD24	+, ++ 98,2	-, ++ 89,4	+ 84,4
CD34	- 0,9	- 1,2	- 3,8
CD44	+ 43,0	-, + 27,8	+ 57,5
CD45	- 0,6	- 0,7	- 2,2
CD56	+ 93,5	-, + 36,7	+, ++ 92,9
CD73	- 4,1	- 3,7	- 4,2
CD90	++ 96,1	+, ++ 88,5	+ 90,4
CD105	- 1,3	- 2,4	- 0,8
CD106	- 0,8	- 3,8	- 3,7
CD146	+ 88,5	+ 57,1	+ 81,5
SSEA-3	+, + 83,3	36,0	
SSEA-4	-, ++ 90,9	-, + 65,4	+, ++ 82,2
SSEA-5		-, ++ 45,4	+, ++ 61,8
TRA-1-60	+, ++ 87,1	-, + 41,4	-, + 18,3

Publikationsliste

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

SCHÄCK, L. M.; NOACK, S.; WEIST, R.; JAGODZINSKI, M.; KRETTEK, C.; BUETTNER, M.; HOFFMANN, A.: Analysis of surface protein expression in human bone marrow stromal cells: new aspects of culture-induced changes, inter-donor differences and intracellular expression. *Stem Cells Dev* 22 (2013), S. 3226-35.

SCHÄCK, L. M.; NOACK, S.; WINKLER, R.; WISSMANN, G.; BEHRENS, P.; WELLMANN, M.; JAGODZINSKI, M.; KRETTEK, C.; HOFFMANN, A.: The phosphate source influences gene expression and quality of mineralization during in vitro osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *PLoS One* 8 (2013), S. e65943.

Poster

WEIST, R.; BÜTTNER, M.; ZWEIGERDT, R.; KRETTEK, C.; HOFFMANN, A.: Analyse der Oberflächenantigene von iPSCs kultiviert auf Feeder-Zellen oder Matrigel. DKOU2013, 22-25. Oktober 2013, Berlin, Deutschland.

WEIST, R.; HAMM, A.; BÜTTNER, M.; ZWEIGERDT, R.; KRETTEK, C.; HOFFMANN, A.: Vergleichende Generierung von iPS-MSCs durch Embryoid-Body-Formung oder in ausschließlicher Monolayer-Kultur. DKOU2013, 22-25. Oktober 2013, Berlin, Deutschland.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Ramona Weist, geb. Winkler
Geburtsdatum: 16. Juni 1985
Geburtsort: Bernburg
Familienstand: verheiratet
Nationalität: deutsch

Studium

05 / 2011 – 09 / 2015 **Promotion** zur Dr. rer. nat. an der Leibniz Universität Hannover; Anfertigung der Arbeit an der Medizinischen Hochschule Hannover in der Arbeitsgruppe „Biologie des Bewegungsapparates“ von Frau Professorin Dr. Andrea Hoffmann (Klinik für Unfallchirurgie bzw. Klinik für Orthopädie)

10 / 2005 – 04 / 2011 **Diplomstudium der Chemie** an der Leibniz Universität Hannover; Anfertigung der **Diplomarbeit** am Institut für Technische Chemie mit dem Titel „Untersuchungen zum Differenzierungspotential mesenchymaler Stammzellen aus Nabelschnurgewebe“

Allgemeine Hochschulreife

06 / 2005 **Abitur** am Gymnasium Bad Essen

Danksagung

An dieser Stelle ist es nun Zeit einmal DANKE zu sagen. Vielen Dank an alle, die mich während der Promotion unterstützt und auf so viele verschiedene Art und Weisen zu dieser Arbeit beigetragen haben!

Allen voran danke ich Frau Prof. Dr. Andrea Hoffmann, die mir die Möglichkeit gegeben hat, in ihrer Arbeitsgruppe zu promovieren. Außerdem möchte ich mich herzlich für die Betreuung, wissenschaftliche Unterstützung und das Vertrauen in die eigenständige Durchführung dieser Arbeit bedanken.

Prof. Dr. Thomas Scheper vom Institut für Technische Chemie danke ich für die Übernahme des Korreferats. Herrn Prof. Dr. Peter Behrens danke ich für die Bereitschaft, den Prüfungsvorsitz zu übernehmen.

Weiterhin danke ich meinen ehemaligen Kolleginnen Dr. Sandra Noack, Dr. Luisa Marilena Schäck und Annika Hamm für deren Support, die gute Zusammenarbeit und die Unterstützung bei den FCM-Analysen. Annika danke ich besonders für die Pflege meiner Zellen, wenn ich im Urlaub war. Herzlichst bedanken möchte ich mich auch bei der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ulrich Martin und Dr. Robert Zweigerdt für die Zurverfügungstellung der iPSC und davon besonders Annika Franke für die Pflege und Kultivierung der Zellen sowie die erfrischenden Gespräche im Fitnessstudio.

Desweiteren bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des VIANNA, allen voran Silke und Alice. Mit euch kam in der Mittagspausen nie Langeweile auf. Zusätzlich danke ich Silke für den L^AT_EX-Crashkurs.

Ein besonders großer Dank geht an meine Eltern, die mir mein Studium ermöglicht und mich bei allem unterstützt haben, sowie an meine Freunde. Auch wenn die Wizzard-Runden in den letzten Jahren etwas nachgelassen haben und uns der Ernst des Lebens eingeholt hat, ist es immer wieder schön bei einem Glas Wein oder Wasser, mit euch über unsere Promotionen, Hochzeiten und die viele anderen Themen zu diskutieren. Außerdem danke ich besonders Hendrik und Gesa, die in stundenlanger Fleißarbeit diese Dissertation Korrektur gelesen haben.

Mein letzter und dafür größter Dank geht an meinen Ehemann: Danke für dich, danke, dass du immer hinter mir standest, danke für die vielen gemeinsamen Jahre, danke für alles!