

Aus dem Institut für  
Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Univ.-Prof. Dr. H.-J. Gabius

Arbeit angefertigt unter der Leitung von  
Priv.-Doz. Dr. Dr. Reinhold G. Erben

**Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern gegen  
Knochenmarkstromazellen bei Maus und Ratte**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Von

Christiane Maria Mäurers

aus Grefrath

München 2005

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle

Referent: Priv.-Doz. Dr. Dr. R. G. Erben

Korreferentin: Priv.-Doz. Dr. B. Wollanke

Tag der Promotion: 15. Juli 2005

Meinen Eltern

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>I</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Literaturübersicht .....</b>	<b>3</b>
2.1 Stammzellen .....	3
2.2 Hämatopoetische Stammzellen .....	4
2.3 Mesenchymale Stammzellen und Knochenmarkstammzellen .....	4
2.3.1 Knochen .....	6
2.3.2 Knorpel.....	7
2.3.3 Skelettmuskulatur.....	7
2.3.4 Herzmuskulatur .....	8
2.3.5 Leber.....	9
2.3.6 Niere .....	9
2.3.7 Lunge.....	10
2.3.8 Gastrointestinaltrakt .....	11
2.3.9 Haut .....	12
2.3.10 Zentrales Nervensystem .....	12
2.4 Zelltherapie mit mesenchymalen Stammzellen bzw. mit Knochenmarkstammzellen...	13
2.5 Oberflächenantigene von mesenchymalen Stammzellen .....	17
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>20</b>
3.1 Tiere und Tierhaltung .....	20
3.2 Präparation von Knochenmarkzellen .....	20
Material .....	20
Durchführung .....	20
3.3 Herstellung monoklonaler Antikörper .....	21
3.3.1 Immunisierung .....	22
3.3.2 Kultivierung der Myelomzellen .....	22
3.3.3 Zellfusion .....	23
Material .....	23
Durchführung .....	23
3.4 Selektion der Hybridomzellen.....	24
3.4.1 Durchflußzytometrie .....	24
Material .....	25
Durchführung .....	25
3.4.2 Immunhistologie, Direktcharakterisierung in Zellkulturplatten.....	26
Material .....	26
Durchführung .....	26
3.5 Klonierung und Subklonierung .....	27
3.6 Einfrieren und Auftauen von Hybridomzellen.....	27
3.7 Immunhistologische Untersuchungen zur Spezifität der hergestellten Antikörper .....	28
Material .....	28
Durchführung .....	29
3.8 Isolierung der monoklonalen Antikörper über Protein LA-Agarose .....	30
Material .....	30
Durchführung .....	31
3.9 Proteinextraktion .....	31
Material .....	31
Durchführung .....	32

3.10 Western Blot.....	32
3.10.1 Gelelektrophorese, SDS-Page .....	33
Material .....	33
Durchführung .....	33
3.10.2 Membran-Transfer der Proteine („Blotten“) .....	34
Material .....	34
Durchführung .....	34
3.10.3 Proteindetektion durch spezifische Antikörper .....	35
Material .....	35
Durchführung .....	36
3.11 Oberflächenbiotinylierung von Zellen .....	36
Material .....	36
Durchführung .....	37
3.12 Zellyse .....	37
Material .....	38
Durchführung .....	38
3.13 Immunpräzipitation .....	38
Material .....	38
Durchführung .....	38
3.14 Proteindetektion durch spezifischen Antikörper .....	39
Material .....	39
Durchführung .....	40
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>41</b>
4.1 Übersicht .....	41
4.2 Klone von der s. c. immunisierten Maus.....	47
4.2.1 Klon 2G10A5 .....	47
4.2.2 Klon 3C2B7.....	49
4.2.3 Klon 5C10C9.....	50
4.2.4 Klon 3D10F8.....	51
4.2.5 Klon 3G3A11 .....	53
4.2.6 Klon 1F12F10 .....	55
4.2.7 Klon 3H10A12 .....	60
4.2.8 Klon 5C12B12.....	64
4.3 Klone von den s. c. und i. p. immunisierten Ratten .....	66
4.3.1 Klone aus der Kavität 1E7 und Klon 1E7F12.....	66
4.3.2 Klone aus der Kavität 4H11 und Klon 4H11D11 .....	68
4.3.3 Klone aus der Kavität 6F8 und Klon 6F8E12.....	70
4.3.4 Klon 6B10B6.....	72
4.3.5 Klon 6B10H8 .....	75
4.3.6 Klone aus der Kavität 6A8 und Klon 6A8C8 .....	76
4.4 Affinitätschromatographie .....	79
4.5 Western Blot.....	79
4.6 Oberflächenbiotinylierung und Immunpräzipitation.....	82
<b>5 Diskussion .....</b>	<b>83</b>
5.1 Einleitung .....	83
5.2 Untersuchungsmethoden .....	84
5.3 Klon 1F12F10 .....	86
5.4 Klon 3H10A12 .....	87
5.5 Klon 6F8E12 .....	87
5.6 Klon 6B10B6 und Klon 6B10H8 .....	88
5.7 Klon 6A8C8 .....	88

---

5.8 Ergebnisse anderer Studien .....	89
5.9 Ausblick .....	91
<b>6 Zusammenfassung .....</b>	<b>93</b>
<b>7 Summary .....</b>	<b>94</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>95</b>
<b>Anhang A: Verwendete Materialien und Geräte .....</b>	<b>97</b>
<b>Anhang B: Abbildungen und Tabellen.....</b>	<b>101</b>
<b>8 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>103</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>114</b>

## 1 Einleitung

Ein mehrzelliger Organismus entwickelt sich aus einer einzigen Zelle, aus der verschiedene Zelltypen entstehen. Beim Säugetier gibt es ca. 300 verschiedene reife Zelltypen. Stammzellen sind unreife Vorläuferzellen eines Gewebes, die durch zwei besondere Eigenschaften charakterisiert sind: Zum einen können sie sich unbegrenzt teilen und dabei gleichzeitig ihre Multipotenz beibehalten, zum anderen können sie sich in verschiedene Zelltypen differenzieren und die entsprechenden Gewebe bzw. Organe bilden. Diese Fähigkeit besitzen Stammzellen nicht nur in der Embryonalphase sondern auch im adulten Organismus.

Embryonale Stammzellen sind pluripotent, d.h. in sämtliche Gewebe differenzierbar. Aufgrund dieser Eigenschaft stehen sie im besonderen Maße im Mittelpunkt einer möglichen Zelltherapie. Dem enormen therapeutischen Potential dieser embryonalen Zellen steht eine breit geführte ethische Diskussion in der Öffentlichkeit gegenüber. Auf der Suche nach einer adäquaten Alternative zu embryonalen Stammzellen erwiesen sich die adulten Stammzellen als bestmöglicher Ersatz [ZANDER et al., 2002].

Adulte Stammzellen sind multipotent, d.h. sie sind fähig eine begrenzte Zahl anderer Gewebe zu bilden. Hämatopoetische Stammzellen aus dem Knochenmark sind die bekanntesten adulten Stammzellen. Sie sind bis heute am besten untersucht und dienen insofern als Prototyp der adulten Stammzellen. Sie sind seit langem in der Krebstherapie klinisch etabliert. In den letzten Jahren wurden adulte Stammzellen auch in nicht-hämatopoetischen Geweben nachgewiesen, u. a. als mesenchymale sowie neuronale Stammzellen. Viele der nicht-hämatopoetischen Stammzellen finden sich im Knochenmark. Es enthält Stammzellen für endotheliale und mesenchymale Gewebe wie Knochen, Knorpel und Fett sowie Kapillarendothel. Manche Forschungsergebnisse sprechen auch für eine Differenzierung von Knochenmarkstammzellen in Muskel- und Nervenzellen und in Epithelzellen. Adulte Stammzellen sind somit auch für die Zelltherapie geeignet, da sie sich in viele Gewebe differenzieren können. Ein großer Vorteil von adulten Stammzellen ist es, dass sie leichter als embryonale Stammzellen zu gewinnen sind. Sie sind z. T. gut expandierbar, autolog transplantierbar und gut verträglich. Außerdem sind adulte Stammzellen nicht mit ethischen Bedenken verbunden [ZANDER et al., 2002]. Stammzellen dienen somit der Entstehung eines Organismus, der Reparatur und Regeneration von Geweben bzw. Organen.

Diese Eigenschaften rückten die Stammzelle besonders in den Blickpunkt der Forschung. Die Stammzelle ist in den letzten Jahren in wachsendem Maße einer der größten Hoffnungsträger in der Medizin geworden. Man erhofft sich durch einen kontrollierten Einsatz dieser Zellen zahlreiche Krankheiten wie z.B. Leukämie, Herzinfarkt, Alzheimer oder Osteogenesis imperfecta heilen oder zumindest lindern zu können. Viele dieser Therapieversuche müssen im Tierversuch getestet werden. Momentan gibt es jedoch noch relativ wenige Erkenntnisse über die Bedingungen, die Stammzellen zur Differenzierung in unterschiedliche Zelltypen benötigen, so dass vor einem breiten klinischen Einsatz erst eine bessere Charakterisierung dieser Zellpopulation nötig ist.

In dieser Arbeit sollten in den Tiermodellen Maus und Ratte mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern Oberflächenantigene von mesenchymalen Stammzellen charakterisiert werden. Mit diesen Antikörpern sollten Erkenntnisse über die antigenen Strukturen an der Zelloberfläche gewonnen werden. Ein möglicher zukünftiger Einsatz dieser Antikörper könnte z.B. die Anreicherung von adulten Stammzellen aus dem Knochenmark sein, um mit Hilfe dieser so isolierten Zellen verschiedene Krankheitsmodelle bei Maus und Ratte zu therapieren.



## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Stammzellen

Stammzellen sind unreife Vorläuferzellen eines Gewebes, die im adulten Organismus dafür sorgen, dass fehlerhafte, kranke oder abgestorbene Zellen angemessen ersetzt werden. Durch Teilung entsteht eine neue Stammzelle und eine Tochterzelle. Diese Nachkommenschaft von Tochterzellen kann verschiedenen Zelllinien angehören. Aus den verschiedenen Linien entwickeln sich zuletzt ausdifferenzierte Zellpopulationen, die bestimmte Gewebe bzw. Organe bilden. Die Differenzierungsschritte unterliegen einem Zusammenspiel verschiedener Einflüsse: So hängt die Entwicklung nicht zuletzt von der Zelle selbst (z.B. durch ihre genetische Programmierung), von äußeren Faktoren (z.B. durch Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$  oder IGF II) [CAPLAN, 1991; BRUDER et al., 1994; JAISWAL et al., 2000] sowie der unmittelbaren Umgebung der Zellen [TSAI und MCKAY, 2000] ab.

Die Stammzellen können sich also zu verschiedenen Zellarten ausdifferenzieren. Selbst werden sie aber auch in unterschiedliche Stadien eingeteilt. Drei Gruppen von Stammzellen werden unterschieden: Die omnipotente embryonale Stammzelle, Stammzellen aus dem Nabelschnurblut und adulte Stammzellen aus dem erwachsenen Organismus.

Embryonale Stammzellen sind die Ur-Zellen. Sie stammen aus der frühen Entwicklungsphase eines Embryos, aus der inneren Zellmasse der Blastozyste. Sie sind immunologisch unreif und können sich nahezu in alle Gewebe differenzieren.

Stammzellen aus dem Nabelschnurblut können aus der Plazenta und der Nabelschnur gewonnen werden. In diesem Blut befinden sich blutbildende Stammzellen und Vorläuferzellen verschiedener Gewebe. Hauptvorteil der Nabelschnur-Stammzellen ist die einfache Gewinnbarkeit ohne ein Spenderrisiko, da bei der Geburt dieses Material normalerweise verworfen werden würde. Als weitere Vorzüge werden die Qualität der Zellen mit einem hohen Proliferations- und Selbsterneuerungspotential sowie die relative immunologische Unreife gesehen [BROXMEYER et al., 1992; HOWS et al., 1992].

Adulte Stammzellen sind postnatalen Ursprungs. MAXIMOW postulierte erstmals 1906 die Existenz einer adulten, multipotenten Stammzelle für die Blutbildung. In den letzten Jahren wurden adulte Stammzellen auch in nicht-hämatopoetischen Geweben nachgewiesen, u. a. als mesenchymale sowie neuronale Stammzellen.

Hämatopoetische Stammzellen können sich zu Zellen des peripheren Blutes und des Immunsystems differenzieren, neuronale Stammzellen zu Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten und mesenchymale Stammzellen zu Fibroblasten, Osteoblasten, Chondroblasten, Adipozyten und Myozyten [ANDERSON et al., 2001; HOLDEN und VOGEL, 2002; JIANG et al., 2002; KLEEBERGER et al., 2002; KORBLING et al., 2002; KRAUSE et al., 2001; LAGAAIJ et al., 2001; LAGASSE et al., 2000; LEMISCHKA, 1999; OSAWA et al., 1996].

## **2.2 Hämatopoetische Stammzellen**

Die hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark sind die bekanntesten und bisher die am besten untersuchten adulten Stammzellen. Daher gelten sie als Prototyp im Bereich der adulten Stammzellen. Seit gut 25 Jahren sind sie im Rahmen der allogenen und autologen Knochenmarkstransplantation klinisch etabliert [ZANDER et al., 2002]. Sie sorgen für die ständige Regeneration der verschiedenen Blutbestandteile und des Immunsystems.

Neben den pluripotenten undeterminierten Stammzellen, die das Potential zur Bildung unterschiedlicher Blutzellarten haben, existieren hier auch multipotente bereits determinierte Stammzellen, aus denen sich nur eine ganz bestimmte Blutzelllinie entwickeln kann.

Durch Präparation hämatopoetischer Stammzellen öffnet sich prinzipiell eine unendliche Vielfalt klinischer Anwendungsmöglichkeiten und Zukunftsperspektiven. Sie sind die Basis für Stammzelltransplantationen, d.h. für die Wiederherstellung der Hämatopoese nach hochdosierter zytotoxischer Therapie und bilden die Grundlage der Behandlung immunologischer Mangelsyndrome sowie erblicher Stoffwechselkrankheiten. In Zukunft könnten sie weiterhin ein Transportvehikel für Gentherapie darstellen [HUBER et al., 1999].

## **2.3 Mesenchymale Stammzellen und Knochenmarkstammzellen**

Im postnatalen Knochenmark befinden sich nicht nur hämatopoetische Stammzellen sondern auch nicht-hämatopoetische Stammzellen. Diese nicht-hämatopoetischen Stammzellen gehören zum Stromazell-System. Sie haben als multipotente nicht-hämatopoetische Vorläuferzellen die Fähigkeit, sich in verschiedene mesenchymale Zelllinien zu entwickeln.

1982 entdeckte FRIEDENSTEIN, dass nicht-hämatopoetische Vorläuferzellen fähig sind, sich in Osteoblasten und Adipozyten differenzieren zu können. Spätere Studien demonstrierten, dass sich mesenchymale Stammzellen unter geeigneten *in vitro* Konditionen zu Chondrozyten, Tenozyten, Myozyten, Neuronen und Zellen des visceralen Mesoderms entwickeln können [PITTENGER et al., 1999; WAKITANI et al., 1995; WOODBURY et al., 2000; REYES et al., 2001].

Die Nomenklatur dieses Zelltypes variiert von der frühen Entdeckung der „colony-forming units fibroblastic“ (CFU-F) zu mesenchymaler Vorläuferzelle, Knochenmarkstromazelle und mesenchymaler Stammzelle [PHINNEY, 2002]. Mesenchymale Stammzellen sind bei verschiedenen Spezies isoliert worden: Mensch [PITTENGER et al., 1999], Maus [PEREIRA et al., 1995], Ratte [WAKITANI et al., 1995], Hund [KADIYALA et al., 1997], Affe, Schwein, Schaf, Ziege, Kaninchen [MOSCA et al., 2000] und Katze [MARTIN et al., 2002]. In diesen Studien wurden die mesenchymalen Stammzellen durch ihr adhärentes Verhalten gegenüber Plastikoberflächen isoliert. Ihre Pluripotenz demonstriert sich darin, in Knochen, Knorpel, Fett und Muskel differenzieren zu können.

Ein anderes Charakteristikum von mesenchymalen Stammzellen ist es, Zytokine und Wachstumsfaktoren zu produzieren, die die Hämatopoese fördern und regulieren [HAYNESWORTH et al., 1996; MAJUMDAR et al., 1998].

Da die Forschungsergebnisse über mesenchymale Stammzellen nicht einheitlich sind und die Meinungen der einzelnen Arbeitsgruppen sehr variieren, wird das Knochenmark oft als Ganzes betrachtet. Viele Studien berichten über Knochenmarktransplantationen mit nachfolgender Charakterisierung der sich entwickelnden Zellen.

Kürzlich durchgeführte Studien ergaben, dass adultes Knochenmark Zellen enthält, die sich zusätzlich in nicht-hämatopoetische Zellen von verschiedenen Geweben einschließlich epithelialer Zellen von Leber, Niere, Lunge, Haut, Gastrointestinaltrakt und Myozyten von Herz und Skelettmuskel differenzieren können. HERZOG et al. (2003) stellten eine Übersicht über die Plastizität von Knochenmarkzellen zusammen. Es ist zu hoffen, dass die experimentellen Ergebnisse, die *in vitro* und *in vivo* gewonnen wurden, zur weiteren Aufklärung der Differenzierungsmechanismen von Knochenmarkstammzellen beitragen. So ist es momentan unklar, unter welchen Bedingungen sich Knochenmarkstammzellen in epitheliale und neuronale Zellen differenzieren. Auch ist ungeklärt, ob eine Gewebeverletzung für solch eine Differenzierung nötig ist und wie diese Differenzierungsschritte im einzelnen verlaufen. Interesse besteht auch hinsichtlich des Differenzierungspotentials von Knochenmarkzell-Subpopulationen.

Um Knochenmarkstammzellen, insbesondere mesenchymale Stammzellen, therapeutisch gezielt einsetzen zu können, ist ein breites Wissen bzw. Verständnis über diese Zellpopulationen nötig. Auch ihre Gewinnung, Aufreinigung und Expansion ist von praktischer Bedeutung, da bei ihrer klinischen Anwendung sehr hohe Zellzahlen generierbar sein müssen.

### 2.3.1 Knochen

Die osteoblastäre Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen wurde besonders im Rattenmodell sowohl *in vitro* [LIU et al., 1994; COLLIN et al., 1992] als auch *in vivo* [COWLES et al., 1998; ZHU et al., 2001] sehr detailliert untersucht. Im Mittelpunkt der Forschung stand dabei der Versuch, mehr über die Zellmorphologie und über die verschiedenen Reifungsstufen der Osteoblasten herauszufinden. In den letzten Jahren hat man erkennen müssen, dass die osteoblastäre Differenzierungskaskade nicht eine Abfolge eines einfachen Schemas ist, sondern vielmehr ein komplexes Zusammenspiel von Differenzierung und Dedifferenzierung mit Übergängen zu anderen Zelllinien darstellt [AUBIN et al., 1995; BRUDER et al., 1997; AUBIN, 1998; PEREIRA et al., 2001].

Knochen entsteht über eine organische Vorläufermatrix, dem sog. Osteoid, welches aus kollagenen und nicht-kollagenen Strukturproteinen zusammengesetzt ist. Das Osteoid dient den Zellen als mechanisches Stützgerüst und als Leitschiene. Es stellt die Matrix für Kalziumapatitkristalle dar, welche erst nach Ausreifung des Osteoids eingelagert werden [COLLIN et al., 1992; NEFUSSI et al., 1997; MC KEE und NANCI, 1996]. Die kollagenen Anteile überwiegen dabei mit 90% und bilden das Grundgerüst dieser Matrix. Darüber hinaus enthält das Osteoid noch Glykoproteine und Proteoglykane. Das Osteoid wird durch die Aktivität der Osteoblasten mineralisiert. Die Osteoblasten mauern sich auf diese Weise Schritt für Schritt ein und werden zu Osteozyten, die über feine Fortsätze in Kanälchen der extrazellulären Knochensubstanz miteinander in Verbindung stehen. Sie dienen der Versorgung des sie umgebenden Gewebes.

Die Bestandteile des Knochens leiten sich weitgehend von einer gemeinsamen Progenitorzelle ab, aus welcher u. a. Osteoblasten, Chondroblasten und Fibroblasten entstehen. Diese Vorläuferzellen differenzieren sich in Zellkulturen durch den Einfluss von Dexamethason bevorzugt zu Osteoblasten [MANIATOPOULOS et al., 1988; LEBOY et al., 1991; KASUGAI et al., 1991].

Die Methoden der Zellisolation und Zellkultivierung differieren unter den verschiedenen Arbeitsgruppen sehr. Standardmethoden wurden häufig abgewandelt und modifiziert, was die Vergleichbarkeit der einzelnen Studien und ihrer Ergebnisse nur begrenzt ermöglicht.

Daher ist es wünschenswert, einen Standard zu schaffen, der als Grundlage für weitere Untersuchungen dient und Aussagen auf dem Einzelzellniveau einer Zellpopulation erlaubt.

### **2.3.2 Knorpel**

Chondroblasten leiten sich aus derselben Progenitorzelle wie Osteoblasten ab. TROPEL et al. (2004) zeigten, dass sich aus dem Knochenmark von Mäusen isolierte mesenchymale Vorläuferzellen unter dem Einfluss von Dexamethason, phosphathaltiger Ascorbinsäure und Natriumpyruvat zu chondrogenen Zellen differenzieren. Die Zellen produzierten Typ-II-Kollagen. Auch PEISTER et al. (2004) berichteten über chondrogene Differenzierung. Ihre Arbeitsgruppe isolierte mesenchymale Stammzellen aus Mäusen und versetzte die Vorläuferzellen mit dem Wachstumsfaktor Tissue growth factor- $\beta$  3 (TGF- $\beta$  3), Dexamethason und phosphathaltiger Ascorbinsäure.

Durch Zusatz von TGF- $\beta$  3, Dexamethason und Thyroxin zum Kulturmedium waren auch MACKAY et al. (1998) in der Lage, adulte humane mesenchymale Stammzellen zur Knorpelsynthese anzuregen. Die Zellen produzierten wiederum Typ-II-Kollagen. Außerdem enthielt die extrazelluläre Matrix in diesem Versuch knorpelspezifische Proteine.

Die Chondrogenese basiert auf dem mesenchymalen Bindegewebe. Dieses liegt als Perichondrium dem Knorpel außen auf. Die Zellen des Perichondriums differenzieren sich zu Chondroblasten. Chondroblasten scheiden Knorpelmatrix aus, das sog. Chondroid, das überwiegend aus Wasser (70%), kollagenen und elastischen Fasern und aus Glykosaminoglykanen besteht. Chondroblasten mauern sich auf ähnliche Weise wie Osteoblasten ein und werden so zu Chondrozyten.

### **2.3.3 Skelettmuskulatur**

Quergestreifte Skelettmuskulatur ist ebenfalls eine Zellpopulation mesenchymaler Herkunft. Es wird angenommen, dass Muskelregeneration und -reparatur von muskelspezifischen

Stammzellen, den sog Satellitenzellen, übernommen wird. Die Satellitenzellen liegen zwischen den Myozyten und der basalen Lamina der Skelettmuskelfasern [MAURO, 1961; MOSS und LEBLOND, 1971; CAMPION, 1984]. Sie besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und sie können neue Skelettmuskelfasern bilden.

Studien über die Abstammung bzw. Differenzierung dieser Skelettmuskel-Myozyten aus den Knochenmarkzellen wurden durchgeführt. Zum einen in Mausmodellen mit degenerativer Muskelerkrankung und zum anderen nach Muskelverletzung. Die Injektion von Knochenmarkzellen in geschädigtes Muskelgewebe führte zur Bildung von Zellen mit myogenspezifischer Genexpression [FERRARI et al., 1998]. Auch WAKITANI et al. (1995) und BITTNER et al. (1999) wiesen in ihren Versuchen mit Ratten bzw. Mäusen nach, dass myogene Vorläuferzellen aus dem Knochenmark stammen.

Knochenmarkstransplantation in mdx-Mäuse, die einen Genmangel für Dystrophin aufweisen, stellte die Dystrophinexpression wieder her. Diese Studie diente als Modell für humane Muskeldystrophie [GUSSONI et al., 1999]. Die Funktionalität dieser Myozyten ist trotz Muskeldegeneration und Muskelregeneration in den mdx-Mäusen nicht ganz klar, weil die Mäuse keinen typischen „klinischen“ Phänotyp zeigten.

### **2.3.4 Herzmuskulatur**

Das Herz ist mesenchymaler Herkunft. Erste Versuche, humane mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark in die Herzventrikel von Mäusen zu injizieren und dort ihre Entwicklung zu beobachten, zeigen, dass die Zellen dort anwachsen und sich weiterentwickeln, wenn auch nur in geringer Anzahl [TOMA et al., 2002]. Die Zellen, die dort längere Zeit überlebten, entwickelten die gleiche Morphologie wie die sie umgebenden Cardiomyozyten.

In einer anderen Studie erhielten Frauen männliches Knochenmark. Später wurden in den Herzen der Frauen Cardiomyozyten gefunden, die ein Y-Chromosom aufwiesen. Dies zeigt, dass die mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark der Spender in der Lage sind, sich zu Cardiomyozyten zu differenzieren [DEB et al., 2003].

BITTIRA et al. (2003) injizierten Ratten markierte Knochenmarkstromazellen intravenös. Experimentell löste man bei einigen Ratten einen myocardialen Infarkt aus. Im Anschluss wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten die infarzierten Herzregionen auf markierte Stromazellen untersucht. Bei allen operierten Tieren wurden diese Zellen nachgewiesen.

### 2.3.5 Leber

Die Leber besitzt wenigstens zwei interne Mechanismen, die für Reparatur und Erhaltung des Organs verantwortlich sind. Der Hauptmechanismus der Leberreparatur ist die Proliferation und Hypertrophie der existierenden Hepatozyten und Cholangiozyten. Wenn die Leber schwerwiegend geschädigt wird und sich die endogenen Hepatozyten nicht mehr teilen können, wird die Reparatur der Leber durch sog. ovale Zellen erleichtert. Die ovalen Zellen verhalten sich als gewebespezifische Stammzellen. Im Allgemeinen bestehen die ovalen Zellen, die um die Gallengänge lokalisiert sind, aus einer bipotenten Leberstammzell-Population [THEISE et al., 1999].

PETERSEN et al. (1999) beweisen in einer Studie, dass ovale Zellen nach experimentell ausgelösten Leberschaden durch Tetrachlorkohlenstoff ( $\text{CCl}_4$ ) und 2-Acetylaminofluorene (2-AAF) proliferieren und sich auch differenzieren. In der gleichen Studie berichtet die Arbeitsgruppe über ein Rattenmodell, in dem Knochenmarkzellen von Dipeptidylpeptidase IV-positiven-Ratten ( $\text{DDPIV}^+$ ) in  $\text{DDPIV}^-$ -Ratten transplantiert werden. Anschließend wurde bei den  $\text{DDPIV}^-$ -Ratten ein Leberschaden durch Gabe von  $\text{CCl}_4$  und 2-AAF ausgelöst. Zwei Wochen später entwickelten sich  $\text{DDPIV}^+$  Hepatozyten und ovale Zellen.

Mesenchymale adulte Vorläuferzellen von Maus-, Ratten- und humanen Knochenmark können sich in vitro zu funktionellen Hepatozyten differenzieren [SCHWARTZ et al., 2002]. Optimale Konditionen für die in vitro Differenzierung der mesenchymalen Vorläuferzellen in Leberzellen werden durch Zugabe der Wachstumsfaktoren „fibroblast growth factor-4“ (FGF-4) und „human growth factor“ (HGF) erreicht. Nach zwei Wochen werden die wachsenden Zellen als Hepatozyten-ähnliche Zellen charakterisiert. Die Zellen besitzen funktionelle Eigenschaften von Hepatozyten, einschließlich der Produktion und Sekretion von Harnstoff und Albumin. Außerdem wurde Cytochrom P450-Aktivität nachgewiesen.

So ergeben sich vielleicht auch auf dem Gebiet der Lebererkrankungen Chancen durch Zelltherapien.

### 2.3.6 Niere

Knochenmarkstammzellen differenzieren sich in epitheliale und nicht-epitheliale Zelltypen in der Niere. Zwei humane Studien zeigen, dass sich in weiblichen Nieren, die in männliche

Empfänger transplantiert wurden, Y-Chromosomen-positive epitheliale Zellen entwickelten [GUPTA et al., 2002; POULSOM et al., 2001].

Weitere Studien demonstrieren, dass sich aus Knochenmarkstammzellen nicht-epitheliale Mesangiumzellen und interstitielle Zellen innerhalb der Niere differenzieren [GRIMM et al., 2001; ITO et al., 2001; CORNACCHIA et al., 2001].

KALE et al. (2003) zeigen in einem Mausmodell, dass  $\text{Lin}^-/\text{Sca-1}^+$ -Zellen vielleicht in der Lage sind, geschädigte Nieren zu reparieren. Weitere Experimente bewiesen diese Hypothese. Renale Ischämie wurde in Wildtyp-Mäusen durch chirurgische Abklemmung der Nierenarterie ausgelöst gefolgt von Reperfusion. Den Mäusen wurde zuvor  $\text{Lin}^-/\text{Sca-1}^+$ -Knochenmark von ROSA-26-Mäusen transplantiert.

Die normale Zunahme der Blutharnstoffkonzentration, ausgelöst durch renale Ischämie 48 Stunden nach tödlicher Bestrahlung, wurde in den Mäusen nach Transplantation mit  $\text{Lin}^-/\text{Sca-1}^+$ -Zellen deutlich reduziert. Die Mäuse, die diese Zellen nicht erhielten wiesen auch keine Reduzierung der Blutharnstoffkonzentration auf.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Knochenmarkstromazellen eine nützliche Rolle in der Therapie von Nierenerkrankungen spielen könnten.

### 2.3.7 Lunge

In der Lunge sind die Clara-Zellen die Vorläuferzellen und Stammzellen für das luftführende Epithel und die Typ-II-Pneumozyten sind die Stammzellen von den Alveolen, weil sie sich selbst erneuern, um neue Typ-II-Pneumozyten zu produzieren und sich dann in Typ-I-Pneumozyten zu differenzieren [MASON et al., 1997]. Knochenmarkzellen können sich nach Transplantation zu Typ-II-Pneumozyten differenzieren [KRAUSE et al., 2001]. Die Typ-II-Pneumozyten, die sich aus dem Knochenmark differenzieren wurden durch Kolo-kalisation der Y-Chromosomen und Zytokeratin identifiziert. Ein weiterer Beweis, dass es sich um Typ-II-Pneumozyten handelt, ist die Expression von Surfactant Protein B mRNA, die typisch ist für Typ-II-Pneumozyten in den Alveoli [KRAUSE et al., 2001].

Stromazellen aus dem Knochenmark können sich vielleicht in das epitheliale Gewebe der Lunge integrieren. KOTTON et al. (2001) lösten bei Mäusen einen Lungenschaden durch Bleomycin (Gemisch aus Glykopeptid-Antibiotika) aus. Den Mäusen wurden adhären-te Knochenmarkzellen injiziert, die zuvor 10 Tage kultiviert wurden. Die injizierten Zellen bildeten nach 30 Tagen in vivo Anhäufungen von Typ-I-Pneumozyten. Spätere Analysen



sprechen dafür, dass sich die Knochenmarkszellen direkt in Typ-I-Pneumozyten differenzieren anstatt sich zuerst in Typ-II-Pneumozyten umzuwandeln. Da die Knochenmarkzell-Population nicht von CD45+ hämatopoetischen Zellen befreit wurde, kann man keine Aussage darüber machen, ob die mesenchymalen Zellen für das beobachtete Engraftment der Pneumozyten verantwortlich sind.

Kürzlich führte eine andere Arbeitsgruppe eine ähnliche Studie durch. Sie arbeiteten aber mit aufgereinigten mesenchymalen Stammzellen. Die mesenchymalen Stammzellen wurden aus männlichen Bleomycin-resistenten Mäusen isoliert und kultiviert. Die hämatopoetischen Stammzellen wurden durch Immunodepletion entfernt. Die aufgereinigte Zellpopulation wurde weiblichen Bleomycin-sensitiven Mäusen intravenös verabreicht. Typ-II-Pneumozyten wurden isoliert und mittels PCR und Fluoreszenz in situ Hybridisation (FISH) für Y-Chromosomen analysiert. Beide Untersuchungsmethoden zeigten die Gegenwart von männlichen, aus dem Knochenmark abgeleitete Typ-II-Pneumozyten [ORTIZ et al., 2003].

Bis heute gibt es jedoch noch keinen Beweis, dass Knochenmarkstromazellen die Funktionen von epithelialen Lungenzellen ausführen können.

### **2.3.8 Gastrointestinaltrakt**

Die Zellen der Krypten stellen die funktionellen Stammzellen des Gastrointestinalepithels dar [JIANG et al., 2002]. KRAUSE et al. (2001) beschrieben als erste intestinale Epithelzellen, die sich aus dem Knochenmark ableiten. Seitdem haben auch andere Untersuchungen diese Entdeckung bestätigt [OKAMOTO et al., 2002; KORBLING et al., 2002].

In einer Studie erhielten vier krebserkrankte Frauen männliches Knochenmark. Sie zeigten die Symptome einer chronischen Transplantat-gegen-Empfänger-Reaktion (graft-versus-host disease, GVHD), einer akuten GVHD, Ulcera oder eine Entzündung des Gastrointestinaltrakts. Epithelzellen von den Spendern wurden im Gastrointestinaltrakt der vier Frauen identifiziert [OKAMOTO et al., 2002]. Die männlichen Spenderzellen wurden in allen Abschnitten des Gastrointestinaltrakts einschließlich Ösophagus, Magen, Dünndarm und Kolon gefunden. Sie scheinen außerdem mengenmäßig während einer GVHD-Phase anzusteigen. Aufgrund dieser Daten ist es unklar, ob sich die Knochenmarkszellen im zerstörten Gewebe ausrichten oder ob sie selbst der Grund für die Gewebeerstörung mit andauernder Entzündung sind.

Knochenmarkstammzellen können sich auch in intestinale Myofibroblasten differenzieren. BRITTAN et al. (2002) entdeckten dies in Mäusen und Menschen. Die Tatsache, dass sich Myofibroblasten nach einer Knochenmarktransplantation bilden, deutet darauf hin, dass diese Zellen eine unterstützende Rolle in der Regeneration von Intestinalepithel spielen könnten.

### **2.3.9 Haut**

Adulte Haut enthält multipotente Stammzellen, die sich selbst erneuern und Epidermis, Talgdrüsen und Haarfollikel hervorbringen [OSHIMA et al., 2001]. Die vermeintliche Stammzelle befindet sich in der Region der Haarfollikel [TAYLOR et al., 2000].

Knochenmarkszellen können sich in Zytokeratin-positive Epithelzellen der Epidermis differenzieren [KRAUSE et al., 2001].

In einer Studie wurden weibliche Hautbiopsien untersucht. Die Frauen erhielten zuvor männliche Stammzellen aus dem peripheren Blut. Die Biopsien wiesen Y-positive Epithelzellen auf und in vitro beobachtete man die Selbsterneuerungskapazität dieser Hautstammzellen [HEMATTI et al., 2002].

Nach einer Hautverletzung können sich Knochenmarkstammzellen eventuell als epitheliale und endotheliale Zelltypen in der heilenden Wunde verankern [BADIAVAS et al., 2003].

Studien von HERZOG et al. (2003) demonstrieren, dass sich Knochenmarkstammzellen als proliferierende Keratinozyten an Wundrändern festsetzen und dann in die Wundfläche ziehen und mit ein Teil des Narbengewebes werden. Diese Erkenntnis deutet darauf hin, dass Knochenmarkstammzellen zur Wundheilung beitragen.

In Zukunft müssen weitere Studien durchgeführt werden, um zu untersuchen, ob sich Knochenmarkstammzellen als selbsterneuernde Hautstammzellen verankern können.

### **2.3.10 Zentrales Nervensystem**

Die kürzlich gemachte Entdeckung, dass sich Stammzellpopulationen im ZNS befinden, erzeugte ein starkes Forschungsinteresse, weil das Gehirn lange als unfähig betrachtet wurde, sich zu regenerieren [REYNOLDS und WEISS, 1992; RICHARDS et al., 1992]. Neuronale Stammzellen sind fähig, sich in vitro zu Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten zu

differenzieren [REYNOLDS und WEISS, 1992; VESCOVI et al., 1993; GAGE et al., 1995; JOHANSSON et al., 1999]. Allerdings limitiert die Unzugänglichkeit, an neuronale Stammzellen im Gehirn heranzukommen, ihren klinischen Nutzen.

Daher rückte die Entdeckung von KOPEN et al. (1999) die mesenchymalen Stammzellen in den Mittelpunkt der Forschung. Sie bewiesen, dass mesenchymale Stammzellen, die in die Hirnventrikel von neonatalen Mäusen injiziert wurden, sich in Astrozyten und Neurofilament-enhaltene Zellen differenzieren können.

WOODBURY et al. (2000) demonstrierten als erste, dass sich mesenchymale Stammzellen in vitro zu Neuronen differenzieren können. Sowohl die Knochenmarkstromazellen von Nagern als auch die von Menschen differenzieren sich in vitro unter der Zugabe von  $\beta$ -Mercaptoethanol (BME) oder Dimethylsulfoxide (DMSO) und Butylhydroxyanisol (BHA) zu Neuronen [WOODBURY et al., 2000]. Es folgten weitere Studien, die auch über die in vitro Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen in Neuronen und Gliazellen berichteten [SANCHEZ-RAMOS et al., 2000; BLACK und WOODBURY, 2001; DENG et al. 2001; KOHYAMA et al., 2001; JIANG et al., 2002, 2003; KABOS et al., 2002].

MAHMOOD et al. (2003) injizierten Ratten mesenchymale Stammzellen intravenös, nachdem sie experimentell ein Hirntrauma auslösten. Diese Zellen wanderten in die betroffenen Areale und differenzierten sich zu Neuronen und Gliazellen.

## **2.4 Zelltherapie mit mesenchymalen Stammzellen bzw. mit Knochenmarkstammzellen**

Das junge Feld der regenerativen Medizin verspricht Behandlungen von verschiedenen degenerativen und altersbedingten Erkrankungen. Die Stammzellen im Allgemeinen und die mesenchymalen Stammzellen im Besonderen sind, durch ihr vielseitiges Wachstum und Differenzierungspotential, ideale Kandidaten für ein solches medizinisch regeneratives Protokoll. Jedoch existieren einige biotechnologische Probleme, die sich auf die biologischen Charakteristika dieser Zellen beziehen. Diese Probleme müssen gelöst werden, bevor das Potential der mesenchymalen Stammzellen in der Zelltherapie eingesetzt werden kann. Wie z. B. erhält man eine große Zahl an mesenchymalen Stammzellen, die zur Zelltherapie eingesetzt werden sollen? Ist es möglich, das Differenzierungspotential der mesenchymalen Stammzellen so zu regeln, dass eine spezifische Erkrankung behandelt werden kann? Dies sind nur einige Fragen, die durch weitere Forschungen auf dem Gebiet der Stammzellen

geklärt werden müssen, um mesenchymale Stammzellen im breiten klinischen Gebrauch einsetzen zu können.

In vier Gebieten wurde bisher für den potentiellen klinischen Gebrauch von (mesenchymalen) Stammzellen geforscht: Die lokale Implantation für lokalisierte Erkrankungen, systemische Transplantation, Stammzelltherapie kombiniert mit Gentherapie und die Verwendung mesenchymaler Stammzellen im „Tissue engineering“.

### **Lokale Implantation von mesenchymalen Stammzellen**

Verschiedene Studien über Tiermodelle demonstrierten die Wirksamkeit von mesenchymalen Stammzellen in der Behandlung von Knochendefekten [OHGUSHI et al., 1989; BRUDER et al., 1994]. QUATRO et al. (2001) hatten bei Patienten mit mangelhafter Frakturheilung Erfolg, indem sie den Patienten lokal autologe mesenchymale Stammzellen injizierten. Mesenchymale Stammzellen fanden auch Anwendung, um Knorpeldefekte zu reparieren [DIDUCH et al., 2000].

Mesenchymale Knochenmarkzellen können auch in Herzmuskelfasern verabreicht werden. Ergebnisse von in vitro und in vivo Studien deuten auf eine effektive Zelltherapie am erkrankten Herzen hin. So könnten Herzerkrankungen wie Herzinfarkt [ORLIC et al., 2001], chronische Ischämie [FUCHS et al., 2003; PERIN et al., 2003] und Herz-Transplantatabstoßungsreaktionen [PETERSEN et al., 1999] therapiert werden.

Myocardiale Infarkte bei Menschen und in Tiermodellen, ausgelöst durch Ligatur der Koronararterien, führt zum Zelltod der Myozyten in der betroffenen Region. Bleibt der Infarkt unbehandelt, können die verbleibenden Myozyten das kranke Gewebe nicht rekonstituieren und Narben entstehen, die zur Verschlechterung der Herzfunktion führen [PFEFFER und BRAUNWALD, 1990; WEISMAN et al., 1988].

ORLIC et al. (2001) injizierten Knochenmarkzellen in gesundes Gewebe direkt neben die infarzierten Areale und stellten fest, dass dies die Regeneration vom Myocard fördert. Die Knochenmarkzellen wandern in das nekrotische Gebiet des infarzierten Myocards und regenerieren Myozyten und verbessern die Gefäßstrukturen. So kann z. T. die Herzgesundheit wieder hergestellt werden, indem die ventrikuläre Aktivität verbessert wird. Trotzdem ist Vorsicht in der Interpretation der Ergebnisse von humanen Studien geboten. Es ist nur eine kleine Zahl an Patienten, die bis heute beurteilt werden konnten und es besteht auch keine Kontrollgruppe, mit der man die Ergebnisse vergleichen kann.

AKIYAMA et al. (2002) injizierten Ratten GFP-exprimierende (green fluorescent protein) murine mesenchymale Stammzellen in ihr demyelinisiertes Rückenmark. Das Rückenmark wurde aufgrund der transplantierten Zellen remyelinisiert. Die Spenderzellen wurden durch GFP-Exprimierung identifiziert. CHOPP et al. (2000) berichteten ebenfalls über einen therapeutischen Erfolg bei Rückenmarkverletzung durch die Behandlung mit mesenchymalen Stammzellen.

Die Pluripotenz der mesenchymalen Stammzellen, sich in vivo und in vitro in neuronale Zellen zu differenzieren, lässt auf therapeutische Anwendung bei neurologischen Erkrankungen und ZNS-Trauma hoffen.

### **Systemische Transplantation mesenchymaler Stammzellen**

Eine Humanstudie untersuchte die Wirkung von systemisch transplantierten allogenen mesenchymalen Stammzellen bei Kindern, die an Osteogenesis imperfecta leiden. Die transplantierten mesenchymalen Stammzellen wurden im Knochen nachgewiesen und sie produzierten normales Kollagen [HORWITZ et al., 2002]. Dennoch ist der Beitrag, den die transplantierten mesenchymalen Stammzellen zur klinischen Besserung bei diesen Patienten leisten, nicht klar.

BITTIRA et al. (2003) transplantierten Ratten markierte Knochenmarkstromazellen. Bei einigen dieser Ratten löste man experimentell einen myocardialen Infarkt aus und untersuchte nachfolgend zu verschiedenen Zeitpunkten, ob sich in den verletzten Herzregionen markierte Stromazellen nachweisen lassen. Bei allen operierten Tieren wurden diese Zellen nachgewiesen.

In einer anderen Studie demonstrierten KALE et al. (2003), dass transplantiertes Lin<sup>-</sup>/Sca-1<sup>+</sup>-Knochenmark in Wildtyp-Mäuse vielleicht in der Lage ist, geschädigte Nieren zu reparieren. Renale Ischämie wurde in den Wildtyp-Mäusen durch chirurgische Abklemmung der Nierenarterie ausgelöst gefolgt von Reperfusion.

Dieses sind nur einige von vielen Studien, die demonstrieren, dass systemisch transplantierte mesenchymale Stammzellen in der Lage zu sein scheinen, selektiv in verletzte Gewebe vorzudringen und dort regenerativ zu wirken.

## **Stammzelltherapie kombiniert mit Gentherapie**

Genetische Modifikation von Stammzellen ist ein reizvolles Ziel für die Gentherapie, weil die Stammzellen eine höhere Proliferationsfähigkeit und ein längeres Überleben, verglichen mit anderen somatischen Zellen, aufweisen. Ziel eines Gentransfers ist, z.B. bei angeborenen genetischen Erkrankungen oder bestimmten Immundefizienzen, ein „gesundes“ Gen in eine pluripotente Stammzelle einzuschleusen und hierdurch eine stabile Langzeit-Expression des Proteins zu erreichen, das dem Patienten fehlte oder fehlerhaft und damit nicht funktionsfähig war [LU und MIKOS, 1996].

Mesenchymale Stammzellen sind fähig, exogene Proteine wie z.B. Faktor VIII und IL-3 über eine längere Zeit zu exprimieren. Diese Fähigkeit behalten sie auch nach Transplantation bei [ALLAY et al., 1997].

Die Niemann-Pick-Krankheit ist eine disseminierte retikulohistozytäre Sphingomyelinlipidose aufgrund eines Mangels an Sphingomyelinase. Die Krankheit äußert sich in einer neurologischen Dysfunktion, die sich auf den Verlust von Purkinjezellen im ZNS bezieht. In einem Mausmodell (Sphingomyelinase-Null-Tiere) wurde der Ausbruch des neurologischen Defekts verzögert, indem man drei Wochen alten Mäusen mesenchymale Stammzellen, die genetisch modifiziert waren und Sphingomyelinase exprimierten, direkt in die Hippocampi und Kleinhirne injizierte. Anschließend wurden Sphingomyelinase exprimierende Purkinjezellen identifiziert [JIN et al., 2002].

## **Tissue engineering**

Tissue engineering stellt eine potentielle Alternative zu den herkömmlichen Gewebs- und Organtransplantationen dar. Es stützt sich im Wesentlichen auf zwei Komponenten. Die erste besteht darin in der Regel autologe lebende Zellen in vitro unter Zusatz von Wachstums- und Proliferationsfaktoren sowie anderen Substanzen zu züchten und zu vermehren. Anschließend können solche Zellen in erkrankte, degenerierte oder teilweise zerstörte Organe oder Gewebe retransplantiert werden und dort zur Verringerung des Defekts, Verbesserung der Funktion oder sogar zur kompletten Heilung führen. Die zweite Komponente ist für die Konstruktion („engineering“) von dreidimensionalem Gewebeersatz erforderlich. Dabei handelt es sich um Matrizen oder Trägersubstanzen aus biologisch verträglichem oder abbaubarem körperfremden Material. Das kann z.B. ein feines Gewebe aus Kunststoff sein, das die spätere

Form bestimmt. Die in vitro vermehrten Zellen werden auf dieses Gerüst aufgetragen und sie vermehren, festigen und verbinden sich dort weiter zu einem neuen Gewebe- oder Organsystem.

Durch diese Technik könnten demnach Patienten mit Transplantaten versorgt werden, deren Zellen die gleiche genetische Information tragen, wie die Zellen des Empfängers. Die Gefahr der immunologischen Abstoßungsreaktion könnte somit umgangen werden. Zudem würde sich das Problem der mangelnden Anzahl an Spenderorganen erübrigen. Ein großes Zukunftsthema sind in diesem Zusammenhang die Stammzellen. Mesenchymale Stammzellen stellen eine mögliche „Rohstoffquelle“ für Tissue engineering dar. Sie sind in vitro Kulturen relativ gut expandierbar und sie weisen ein hohes Proliferations- und Differenzierungspotential auf [BIANCO und ROBEY, 2001]. Es existieren verschiedene Tiermodelle, die den Erfolg dieser Methode demonstrieren, wie z. B. in der Behandlung von Knorpeldefekten [KON et al., 2000].

## **2.5 Oberflächenantigene von mesenchymalen Stammzellen**

Es liegen bis heute nicht viele eindeutige Erkenntnisse über die Charakterisierung der mesenchymalen Stammzellen hinsichtlich Oberflächenantigenen, Anreicherungsmethoden und Differenzierungsmechanismen vor. So ist es das Ziel verschiedener Arbeitsgruppen, diese Zellpopulation näher zu charakterisieren. Beträchtliche Fortschritte im Rahmen der Oberflächencharakterisierung von mesenchymalen Stammzellen wurden mit dem FACS (fluorescence activated cell sorting) gemacht. Trotzdem ist noch kein einheitlicher Marker identifiziert worden, der die mesenchymalen Stammzellen darstellen kann. Das liegt am Mangel an Übereinstimmungen über den mesenchymalen Stammzell-Phänotyp [GRONTHOS et al., 1994; PITTENGER et al., 1999; MINGUELL et al., 2001; TOCCI und FORTE, 2003].

Monoklonale Antikörper, die gegen osteoblastäre Zellen gerichtet sind, würden die Beziehung zwischen den verschiedenen Stromazelltypen aus dem Knochenmark erklären können. SIMMONS und TOROK-STORB berichteten 1991 über den monoklonalen Antikörper STRO-1, der an humane fibroblastoid-ähnliche Zellen aus dem Knochenmark bindet. Außerdem bindet er an verschiedene nicht-hämatopoetische zelluläre Komponenten von adhären Zellen in „long-term“-Knochenmarkkulturen. STRO-1 kann auch dazu verwendet

werden, aus frisch aspirierten Knochenmark-Suspensionen Stromazell-Vorläuferzellen zu isolieren [SIMMONS und TOROK-STORB, 1991].

Ein anderer monoklonaler Antikörper, der mit humanen osteogenen Vorläuferzellen reagiert, ist HOP-26. Dieser Antikörper reagiert mit einem Oberflächenantigen, welches von Stromazell-Vorläuferzellen exprimiert wird. ZANNETTINO et al. (2003) demonstrierten in ihrer Studie, dass HOP-26 das Oberflächenantigen CD63, ein lysosomales Membranglykoprotein, identifiziert

Monoklonale Antikörper gegen Oberflächenmarker der mesenchymalen Stammzellen wie z.B. STRO-1, SH2, SH3 und SH4 könnten eine Immuno-Phenotypisierung dieser Zellen möglich machen [GRONTHOS et al., 1994; HAYNESWORTH et al., 1992]. Andererseits ist es eine entmutigende Aufgabe, einen einzelnen allgemeinen Marker für mesenchymale Stammzellen zu finden, da sich mesenchymale Stammzellen gemeinsame Merkmale mit endothelialen, epithelialen und Muskelzellen teilen [MINGUELL et al., 2001]. Außerdem präsentieren mesenchymale Stammzellen eine hohe Anzahl verschiedener Profile der Oberflächenantigene [VOGEL et al., 2003; SIMMONS und TOROK-STORB, 1991; JIANG et al., 2002]. Eine einheitliche Konstellation der Oberflächenmarker ist nicht bekannt. So wurden z.B. CD13,  $\alpha$ -Integrin (CD49a und CD49b),  $\beta$ 1-Integrin (CD29), CD44 (Hyaluronsäure-Rezeptor), CD71 (Transferrin), CD90 (Thy-1), CD106 (Vascular cell adhesion molecule-1 = VCAM-1) und CD124 (Interleukin-4-Rezeptor) von PITTENGER et al. (1999) identifiziert.

Die Frage, was eine „mesenchymale Stammzelle“ definiert, bleibt somit weiterhin bestehen. Gesichert scheint, dass den mesenchymalen Stammzellen typische Oberflächenantigene von hämatopoetischen Stammzellen wie z.B. CD45, CD34 und CD14 fehlen [PITTENGER et al., 1999].

BADDOO et al. (2003) berichteten in ihrer Studie über die Charakterisierung von mesenchymalen Stammzellen durch Oberflächenantigene. Sie demonstrierten, dass plastikadhärente Kulturen, die aus murinem Knochenmark isoliert wurden, eine Mischung aus Fibroblastoidzellen und hämatopoetischen Zellen sind. Durch Immunodepletion entfernten sie aus der plastikadhärenten Zellpopulation die hämatopoetischen Stammzellen. Sie benutzten dafür Antikörper gegen CD11b, CD34 und CD45. Die anschließende FACS-Analyse zeigte, dass die immunodepletierten Zellen einheitlich CD9, CD29 und CD81 exprimieren und unterschiedliche Grade von Sca-1 (stem cell antigen 1), CD44 und CD106. Sie exprimieren



ebenfalls den Stammzellmarker NST (Nucleostemin) [TSAI und MCKAY, 2002] aber nicht Oct-4, der typisch für embryonale Stammzellen ist [NICHOLS et al., 1998]. Die Zellpopulation zeigte negative Ergebnisse auf die Antikörper CD11b, CD31, CD34, CD45, CD48, CD90, CD117 und CD135. Basierend auf diesem Oberflächenantigenprofil und dem nachgewiesenen Differenzierungspotential in Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten in vitro und Osteozyten in vivo, sind die immunodepletierten Zellen charakteristisch für mesenchymale Stammzellen [BADD00 et al., 2003].

Auch MEIRELLES und NARDI (2003) bewiesen in ihrer Studie, dass murine mesenchymale Stammzellen positiv für die Oberflächenmarker CD44, CD49e, CD29 und Sca-1 sind und eine eindeutige homogene Morphologie aufweisen.

PEISTER et al. (2004) demonstrierten an fünf verschiedenen Mauslinien die Variabilität der Oberflächenantigen-Expression. Sie nahmen Mäuse aus vier verschiedenen Inzuchtstämmen, C57Bl/6J (Bl/6), BALB/c, FVB/N und DBA1 und aus einem transgenen Inzuchtstamm C57Bl/6-GFP<sup>tg</sup>. Die letztgenannten Mäuse exprimieren GFP (green fluorescent protein). Das gewonnene Knochenmark wurde kultiviert und anschließend wurden die adhärenenten Zellen mit Hilfe des FACS analysiert. Die murinen mesenchymalen Stammzellen der vier Standard-Inzuchtstämme waren negativ für die endothelialen Marker FLK1 (VEGF-R2), CD31 (PECAM), CD90 (Thy-1) und CD117 (c-kit). Sie waren ebenfalls negativ für die Oberflächenmarker, die sich typischerweise auf hämatopoetischen Zellen befinden: CD11b, Ter-119, CD45R/B220, Ly6G, Ly6C und CD3e. Alle getesteten murinen mesenchymalen Stammzellen waren negativ auf den Marker CD45. CD45 ist ein typischer Marker für hämatopoetische Stammzellen. Die Expression der Marker CD34, Sca-1 und CD106 (VCAM-1) variierte in den unterschiedlichen Mauslinien, was zeigt, dass es schwierig ist, murine mesenchymale Stammzellen eindeutig zu charakterisieren.

Die Entwicklung von definierten Kulturbedingungen für mesenchymale Stammzellen, umfassende Erkenntnisse über ihre Oberflächenantigene und ein größeres Verständnis ihrer Biologie würde neue Entwicklungen in der Zell- und Gentherapie in Maus- und Rattenmodellen ermöglichen und neue Perspektiven auf dem Feld der adulten Stammzellen fördern. Deshalb war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, neue monoklonale Antikörper gegen Oberflächenantigene von mesenchymalen Stromazell-Vorläufern bei Maus und Ratte zu generieren und zu charakterisieren.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Tiere und Tierhaltung

Als Versuchstiere dienten zur Knochenmarkentnahme C57BL/6-Mäuse und Fischer-344-Ratten aus hauseigener Zucht.

Für die Immunisierung zur Produktion mAK wurden männliche BALB/c-Mäuse aus eigener Zucht und Wistar-Ratten von Charles River Deutschland verwendet.

Die Tiere wurden in Gruppenkäfigen gehalten. Die Fütterung bestand aus handelsüblichem Alleinfutter Altromin®1324 in pelletierter Form für Mäuse bzw. Ratten und Wasser ad libitum.

Diese Versuche wurden der Regierung von Oberbayern unter der Nummer 209.1/211-2531.6-42002 angezeigt.

### 3.2 Präparation von Knochenmarkzellen

#### Material

Zellkulturmedium	DMEM
	1% P/S
	15% FCS

0,9%ige NaCl-Lösung

#### Durchführung

Für die Gewinnung der Stromazell-Vorläuferzellen wurden sechs bis acht Ratten euthanasiert und jeweils die Humera, Femora und Tibien freipräpariert. Um das Knochenmark zu gewinnen, wurden die aufgesägten Knochen in 1,5 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und zwei- bis dreimal jeweils 5 Sekunden bei maximal 3000 rpm zentrifugiert, in isotonischer Kochsalzlösung resuspendiert und durch ein Sieb der Porenweite 0,5 mm in ein steriles 50 ml

Zentrifugenröhrchen gegeben. Die Zellsuspension wurde 10 Minuten bei 1250 rpm in einer Beckmann-Zentrifuge zentrifugiert, der Überstand abgegossen und das Pellet in komplettem Zellkulturmedium resuspendiert und jeweils 10 ml in sterile Zellkulturschalen mit 100 mm Durchmesser gegeben. Die Proben wurden zur Depletierung von Makrophagen 20 Minuten bei 37°C vorinkubiert und dann auf neue Zellkulturschalen ausgesät und über Nacht ebenfalls bei 37°C inkubiert, um die Zellen adhären zu lassen. Nach Inkubation wurden die Zellkulturschalen dreimal mit 0,9%igem NaCl gespült und die adhären Zellen mittels Zellschaber gelöst und in 50 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt. Die Zellsuspension wurde 10 Minuten bei 1250 rpm zentrifugiert und das gewonnene Pellet in 1 ml 0,9%igem NaCl resuspendiert. Zur Zellzählung wurde die Zellsuspension 1:10 mit Trypanblau verdünnt. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer modifizierten Neubauer-Zählkammer ermittelt.

Zur Gewinnung der Stromazell-Vorläuferzellen aus der Maus wurden 15- bis 25 Mäuse durch cervikale Dislokation getötet und die Femora und Tibien freipräpariert. Das Knochenmark wurde mittels einer mit 0,9%igen NaCl gefüllten 1 ml-Spritze aus den Knochen gespült und in einer sterilen Zellkulturschale gesammelt. Die Zellsuspension wurde durch ein Metallsieb der Porenweite 0,5 mm gedrückt. Die folgenden Arbeitsschritte verliefen analog der Ratten-Knochenmarkgewinnung.

### **3.3 Herstellung monoklonaler Antikörper**

Zur Produktion eines mAK wird die Fähigkeit eines lebenden Organismus (Maus bzw. Ratte) genutzt, auf die wiederholte Antigenstimulation (Immunisierung) mit der Produktion von spezifischen Antikörpern durch B-Zellen zu reagieren. Um den spezifischen Antikörper zu gewinnen, werden die Lymphozyten der Maus bzw. der Ratte mit Myelomzellen fusioniert (Fusion) und diejenigen Hybridomzellen selektiert, die den spezifischen Antikörper produzieren.

### 3.3.1 Immunisierung

Männliche BALB/c-Mäuse wurden im Alter von 10-12 Wochen mit Stromazell-Vorläuferzellen aus dem Knochenmark von Ratten immunisiert. Es wurden jeweils zwei Mäuse s. c. und i. p. immunisiert.

Dazu wurde Knochenmark von Ratten unter sterilen Bedingungen entnommen und die Stromazell-Vorläuferzellen mit entsprechenden Zellkultur-Techniken (siehe Abschnitt 3.2) angereichert.

Für die i. p.-Immunisierung wurden die angereicherten Stromazell-Vorläuferzellen in 0,9%iger NaCl resuspendiert und den Mäusen i. p. injiziert. Die Mäuse erhielten jeweils ca.  $1 \times 10^7$  Stromazell-Vorläuferzellen ohne Adjuvans. Die Booster-Injektionen fanden fünfmal im Abstand von jeweils drei Wochen statt.

Für die erste s. c.-Immunisierung wurden ca.  $1 \times 10^6$  Zellen mit FCA gemischt und s. c. appliziert, die nachfolgenden Booster-Injektionen erfolgten mit  $2-10 \times 10^6$  Zellen gemischt mit FIA. Die Booster-Injektionen wurden dreimal im Abstand von jeweils drei Wochen durchgeführt.

Analog wurden zwei bis drei Monate alte Ratten mit Stromazell-Vorläuferzellen aus der Maus i. p. und s. c. immunisiert. Dafür wurden zwei Ratten mit  $3-10 \times 10^6$  Zellen fünfmal i. p. immunisiert und zwei Ratten mit  $3-8 \times 10^6$  Zellen einmal gemischt mit FCA und dreimal gemischt mit FIA immunisiert.

### 3.3.2 Kultivierung der Myelomzellen

Alle Fusionen wurden mit der „non-producer“-BALB/c-Mausmyelomzelllinie x 63-Ag 8.653 [KEARNY et al., 1979] durchgeführt.

Ca. 14 Tage vor der Fusion wurden die Myelomzellen aufgetaut und vermehrt. Das Nährmedium bestand aus RPMI 1640 (89%), FCS (10%) und P/S (1%). Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen aufgenommen und bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Bei hoher Zelldichte erfolgte das Teilen der Zellen im Verhältnis 1:1.

Einen Tag vor der Fusion wurden die Zellen erneut geteilt.

### 3.3.3 Zellfusion

Die von KÖHLER und MILSTEIN (1975) erarbeitete Methode der Hybridisierung von Milzplasmazellen und Myelomzellen fand in dieser Arbeit Anwendung.

#### Material

RPMI 1640

HAT-Selektionsmedium

HT-Selektionsmedium

PEG

#### Durchführung

Die Lymphozyten stammten aus der Milz einer mit Stromazellen immunisierten BALB/c-Maus bzw. aus der Milz einer mit Stromazellen immunisierten Wistar-Ratte.

Nach Tötung der vorher in Ether narkotisierten Tiere wurde die Milz steril entnommen und in eine mit 10 ml RPMI 1640 gefüllte Zellkulturschale überführt. In der sterilen Werkbank wurde die Milz mit Hilfe eines sterilen Spritzenstempels zerdrückt, bis eine homogene Suspension entstand. Diese wurde durch ein Metallsieb in einen 50 ml Zentrifugenröhrchen überbracht, mit RPMI 1640 aufgefüllt und anschließend 10 Minuten mit 1250 rpm zentrifugiert.

Die Tumorzellen wurden aufgeschüttelt und in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Sie wurden ebenfalls 10 Minuten mit 1250 rpm zentrifugiert.

Die Pellets von den Milzmakrophagen und den Tumorzellen wurden jeweils in 40 ml RPMI 1640 resuspendiert und nochmals bei 1250 rpm 10 Minuten zentrifugiert. Die Zellen wurden insgesamt dreimal mit RPMI 1640 gewaschen.

Nachfolgend wurde jeweils ein Teil der Zellen mit Trypanblau 1:10 verdünnt und die Zellzahl in einer modifizierten Neubauer-Zählkammer ermittelt.

Im Anschluss wurden die Myelomzellen und die Milzzellen im Verhältnis 1:5 bis 1:10 in RPMI 1640 aufgenommen und bei 1250 rpm 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde komplett abgesaugt und das Zellpellet vorsichtig vom Boden gelöst.

Um die Fusion auszulösen, wurden 1,5 ml PEG-Lösung dazugegeben, das Zentrifugenröhrchen in einem 37°C warmen Wasserbad eine Minute lang geschwenkt und

anschließend mit insgesamt 20 ml 37°C warmen RPMI 1640 nach folgendem Schema tropfenweise verdünnt:

1 ml in 30 Sekunden, 3 ml in 30 Sekunden, 16 ml in 60 Sekunden. Nach 10 Minuten Zentrifugation bei 1250 rpm erfolgte eine weitere Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur, bevor der Überstand abpipettiert und die Zellen in HAT-Medium resuspendiert und in sterile 96-Flachlochplatten mit 100 µl pro Kavität ausplattiert wurden.

Vier Tage nach der Fusion wurden weitere 100 µl HAT-Selektionsmedium pro Kavität zugegeben. Danach erfolgte jeden dritten bis vierten Tag ein Mediumwechsel: 100 µl verbrauchtes Medium wurden durch 100 µl neues HAT-Medium ersetzt.

Nach 14 Tagen wurde statt HAT-Selektionsmedium HT-Medium verwendet und nach weiteren 14 Tagen auf Normalmedium umgestellt.

Ab dem fünften Tag nach der Fusion erfolgte eine regelmäßige mikroskopische Kontrolle der Kavitäten auf Hybridom-Zellklone.

## **3.4 Selektion der Hybridomzellen**

### **3.4.1 Durchflußzytometrie**

Die Expression von Zelloberflächenantigenen wurde mittels Durchflußzytometrie untersucht. Dafür wurde der Fluorescence-Activated-Cell-Scanner (FACScan, Fa. Becton Dickinson) verwendet. An diese Oberflächenantigene binden spezifische mAK, die mit einem sekundären, Fluorochrom-markierten Antikörper detektiert werden. Die Zellen passieren anschließend einzeln einen Laserstrahl mit einer Wellenlänge von 488 nm. Dabei werden das Streulicht und das nach Anregung emittierte Licht von einem Photomultiplier in elektrische Impulse umgewandelt, verstärkt und digital im Computer dargestellt.

Das Streulicht gibt Aufschluss über die Größe (forward scatter (FCS)) und die Granularität (sideward scatter (SSC)) der Zelle, die spezifisch für die verschiedenen Zellarten sind.

## Material

Zellen	frische Knochenmarkzellen von Maus bzw. Ratte 1 Tag adhärenente Zellen von Maus bzw. Ratte
96-Loch Rundboden-Platte	
sekundärer Ak für Maus mAK	Ziege anti-Maus-IgG, FITC-markiert, $1 \mu\text{l}/1 \times 10^6$ Zellen
sekundärer Ak für Ratte mAK	Ziege anti-Ratte-IgG, FITC-markiert, $1 \mu\text{l}/1 \times 10^6$ Zellen
1%ige PFA in PBS	5 g PFA in 450 ml Aqua dest. und 50 ml PBS pH 7,4
Fluoreszenzpuffer für FACS	1 l PBS 20 ml FCS 0,2 g Natriumazid

## Durchführung

Es wurden für die FACS-Analyse  $1 \times 10^6$  frische Knochenmarkzellen bzw.  $0,5 \times 10^5$  1 Tag adhärenente Zellen von Ratte bzw. Maus (siehe Abschnitt 3.2) und dazu jeweils 50  $\mu\text{l}$  Zellkulturüberstände der jeweiligen Hybridome zusammen in 96-Loch Rundboden-Platten für 30 Minuten bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. (Knochenmarkzellen von der Maus zusammen mit dem Zellkulturüberstand der Ratten-Hybridome, analog Knochenmarkzellen der Ratte mit dem Zellkulturüberstand der Maus-Hybridome).

Nach der Kälteinkubation wurden die Platten zweimal mit 100  $\mu\text{l}$  FACS-Puffer pro Kavität 2 Minuten lang bei 2000 rpm zentrifugiert. Im Anschluss wurde der zweite Antikörper auf die Platten gegeben (siehe Material). Danach wurde nochmals wie oben beschrieben mit FACS-Puffer zentrifugiert. Letztlich wurden die Zellpellets in 50  $\mu\text{l}$  1%iger PFA in PBS resuspendiert und im FACS analysiert.

### 3.4.2 Immunhistologie, Direktcharakterisierung in Zellkulturplatten

#### Material

Knochenmarkzellen von der Maus bzw. Ratte

PBS

70%iger Ethanol

Normal horse serum 20%

1. Antikörper Überstände aus den Hybridom-Platten von Maus bzw. Ratte

2. Antikörper Pferd anti-Maus-IgG, biotinyliert bzw. Pferd anti-Ratte-IgG, biotinyliert

Vectastain® ABC-AP Kit

Vector® Red

#### Durchführung

Dazu wurde Knochenmark von der Maus bzw. von der Ratte in DMEM-Komplettmedium aufgenommen und ein bis drei Tage kultiviert. Die nicht-adhärenenten Zellen wurden mit PBS ausgespült. Im Anschluss wurden die adhärenenten Zellen mit 70%igem Ethanol für 10 Minuten fixiert. Es folgte eine nochmalige Spülung mit PBS und die Zellen wurden mit 20%igem Normal horse serum für 20 Minuten bei RT inkubiert. Danach wurde der erste Ak (Überstände aus den Hybridomplatten) hinzugegeben und für 30 Minuten bei RT inkubiert.

Nach der Inkubation folgte eine zweimalige Spülung mit PBS und der zweite Antikörper (Pferd anti-Maus- bzw. anti-Ratte-IgG, biotinyliert) 1:200 mit PBS verdünnt wurde auf die Platten gegeben und bei RT 30 Minuten lang inkubiert. Es folgte nochmals eine zweimalige



Spülung mit PBS. Dann wurden die Platten mit dem ABC-AP Komplex ebenfalls 30 Minuten bei RT inkubiert. Es wurde nochmals mit, wie oben beschrieben, PBS gewaschen und schließlich der Farbstoff Vector Red für 20 Minuten auf die Platten gegeben. Die positiven Klone wurden unter dem Mikroskop beurteilt.

### 3.5 Klonierung und Subklonierung

Die positiv beurteilten Kulturen des Screeningtests wurden nach der „limiting-dilution“-Methode [GALFRE und MILSTEIN, 1981] kloniert. Dazu wurden drei bis fünf Tage vor der Klonierung „feeder-layer“-Platten mit  $2-4 \times 10^5$  BALB/c-Mäusemilzzellen bzw. Wistar-Ratten-Milzzellen vorbereitet. Rechnerisch wurden die Hybridomzellen in Kulturmedium so verdünnt, dass 0,4 Zellen pro Kavität einer 96-Mikrowell-Zellkulturplatte ausgesät wurden.

Nach fünf bis sieben Tagen erfolgte eine mikroskopische Kontrolle der einzelnen Dellen, wobei Überstände von Kavitäten mit Wachstum erneut im Screeningtest beurteilt wurden.

Die Klone, die Antikörper produzierten (Analyse mittels FACScan), wurden schrittweise auf 24-Loch-Platten und später in Zellkulturflaschen weiter kultiviert.

Schlecht wachsende oder nur wenig Antikörper produzierende Klone wurden wiederum subkloniert, indem sie in Konzentrationen von 1- bis 10 Zellen pro 96-Lochplatte ausgesät und von diesen Klonen nur die am besten wachsenden und Antikörper produzierenden weiter kultiviert wurden.

### 3.6 Einfrieren und Auftauen von Hybridomzellen

Zum Einfrieren von Zellen und Zelllinien wurden die Zellen zunächst bei 1250 rpm 10 Minuten lang zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, die Zellen in Einfriermedium (RPMI 1640 (60%), FCS (30%), DMSO (10%)) resuspendiert und in 1,3 ml-Portionen in Kryroröhrchen pipettiert. Die Konzentration betrug  $1-5 \times 10^7$  Zellen pro ml Einfriermedium. Durch Verbringen der Kryroröhrchen in speziell isolierte Einfrierboxen, die in Tiefkühlschränke mit  $-80^\circ\text{C}$  gestellt wurden, konnte eine optimale Absenkung der Temperatur um  $1^\circ\text{C}$  pro Stunde erreicht werden. Für eine Konservierung der Klone über längere Zeit wurden die Röhrchen nach einigen Tagen in flüssigen Stickstoff umgelagert.

Zum Auftauen wurden die Zellen schnell im 37°C warmen Wasserbad knapp über den Gefrierpunkt erwärmt und in mit 40 ml RPMI 1640 gefüllte Zentrifugenröhrchen gegeben.

Die Zellen wurden dann 10 Minuten bei 1250 rpm zentrifugiert, um das zytotoxische DMSO auszuverdünnen. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in RPMI 1640 (88%), FCS (10%), P/S (1%) und Na-Pyruvat (1%) aufgenommen und in Zellkulturflaschen ausgesät.

### 3.7 Immunhistologische Untersuchungen zur Spezifität der hergestellten Antikörper

#### Material

Normal horse serum	1:5 mit PBS verdünnt
Normal rabbit serum	1:5 mit PBS verdünnt
TBS-T	
TBS	
1. Antikörper	jeweiliger monoklonaler Ak aus frischem Zellkulturüberstand (Maus anti-Ratte bzw. Ratte anti-Maus)
2. Antikörper	Pferd anti-Maus-IgG, biotinyliert, 1:200 mit PBS verdünnt Kaninchen anti-Ratte, biotinyliert, 1:200 mit PBS verdünnt
Vectastain® ABC-AP Kit Standard	1 ml PBS 10 µl Substanz A 10 µl Substanz B
Fast Red Tablets, 2 mg	1 Tabl. auf 2 ml 0,1 M Tris/HCl, pH 8,2

Kernfärbung

Hämalaun

Kaisers Glyceringelantine

## Durchführung

Zur Überprüfung der Gewebsexpression der von den mAK erkannten Proteine wurden Schnitte verschiedener Organe und Knochen von Mäusen bzw. Ratten mit den jeweiligen Antikörpern inkubiert und anschließend gefärbt.

Die Schnitte wurden zuerst entparaffiniert. Dazu wurden die Objektträger nacheinander in folgende Lösungen gegeben:

1. 15 Minuten in Xylol I
2. 15 Minuten in Xylol II
3. 3 Minuten in 99%igem Ethanol
4. 3 Minuten in 70%igem Ethanol
5. 3 Minuten in 40%igem Ethanol
6. 3 Minuten in Aqua dest.

Danach wurde Pferdeserum bzw. Kaninchenserum 1:5 verdünnt auf die Schnitte pipettiert und für 20 Minuten bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde das Serum abgekippt und der Schnitt mit dem ersten Antikörper bedeckt und über Nacht (16-20 Stunden) bei 4°C inkubiert. Als erster Antikörper diente der jeweilige monoklonale Antikörper aus frischem Zellkulturüberstand (Maus anti-Ratte bzw. Ratte anti-Maus).

Im Anschluss wurde zweimal in TBS-T und einmal in TBS gewaschen. Darauf wurden die Schnitte mit dem zweiten Antikörper, Pferd anti-Maus-IgG, biotinyliert bzw. Kaninchen anti-Ratte-IgG, biotinyliert, bedeckt und 30 Minuten bei RT stengelassen. Die Schnitte wurden anschließend wieder gewaschen und 30 Minuten mit Vectastain® ABC-AP Kit Standard inkubiert. Danach erfolgte ein weiterer Waschschriff und die Schnitte wurden mit Fast Red Tablets-Lösung bis zur mikroskopisch sichtbaren Rotfärbung inkubiert.

Mit der Kernfärbung Hämalaun wurde 1 Minute gegengefärbt und die Objektträger wurden schließlich mit Kaisers Glycerin eingedeckelt.

### 3.8 Isolierung der monoklonalen Antikörper über Protein LA-Agarose

Mittels Affinitätschromatographie wurden die Antikörper über Protein LA-Agarose isoliert.

Protein LA ist ein Hybrid-Protein. Die Reinigung beruht auf einer spezifischen Bindung des Staphylokokken-Protein A an die Fc- und Fab-Region von IgG-Molekülen und einer spezifischen Bindung des Peptostreptokokken-Protein L an die Igκ-Leichtketten-Region [SVENSSON H.G. et al., 1998].

#### Material

Protein LA-Agarose

Dialysierschlauch VISKING

Waschpuffer 1

1,576 g Tris HCl  
4,2 g NaCl  
ad 500 ml Aqua dest.  
pH 7,4

Waschpuffer 2

1,576 g Tris HCl  
14,61 g NaCl  
ad 500 ml Aqua dest.  
pH 7,4

Elutionspuffer

1,5 g Glycin  
ad 200 ml Aqua dest.  
pH 2,7

Neutralisationspuffer

15,76 g Tris HCl  
ad 100 ml Aqua dest.  
pH 8-9

Dialysepuffer

20 x PBS => 150 ml  
mit Reinstwasser auf 3 l auffüllen

## Durchführung

Der Zellkulturüberstand wurde 10 Minuten bei 1250 rpm zentrifugiert und danach durch einen Filter der Größe 0,45 µm gegeben. Die Agarose wurde in eine 2 ml-Glassäule pipettiert und mittels einer peristaltischen Pumpe mit ca. 20 ml Waschlösung 1 äquilibriert (Durchlaufgeschwindigkeit 1 ml/min).

Anschließend wurden zwischen 200 und 300 ml des Überstandes auf die Säule aufgetragen.

Im Folgenden wurde die Säule einmal mit Waschlösung 1, dann mit Waschlösung 2 und nochmals mit Waschlösung 1 solange gewaschen, bis bei der photometrischen Messung des Eluats die Extinktion bei 280 nm  $< 0,01 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  betrug.

Nun wurden die Antikörper mit dem Elutionspuffer eluiert und in Röhrchen mit 100 µl Neutralisationspuffer zur Abpufferung und Erhaltung der Antikörperstabilität aufgefangen.

Im Anschluss wurde die Säule mit Waschlösung 1 gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C aufbewahrt. Die proteinhaltigen Eluatfraktionen wurden in einem Dialyseschlauch vereinigt und an drei aufeinander folgenden Tagen mit 3 Liter Dialysepuffer umgepuffert, wobei der Puffer täglich gewechselt wurde. Die Konzentration des aufgereinigten Proteins wurde photometrisch bestimmt. Die hier verwendete Protein LA-Agarose bindet ca. 3-5 mg Mäuse- bzw. Ratten-IgG.

## 3.9 Proteinextraktion

Um die Gesamtproteinfraktion einer Zelle zu erhalten, wurden die Zellen mit einem Detergenz (RIPA-Puffer bzw. Triton-X-Puffer) lysiert, zentrifugiert und der proteinhaltige Überstand weiter verwendet.

### Material

RIPA-Puffer

99 ml 1 x PBS

1 ml Igepal CA-630

500 mg Na-Deoxycholat

oder

Triton-X-Puffer	0,05 M Tris-HCl pH 7,8 0,14 M NaCl 1% Triton X-100
Protease-Inhibitor Stock-Lsg. 25x	1 Tablette Complete Proteasen Inhibitoren-Cocktail in 2 ml Aqua dest. lösen
NuPAGE® LDS-Sample Buffer	

### **Durchführung**

Das jeweils entnommene Gewebe (Knochenmark, Leber, Milz, Niere, Lunge) wurde gewogen und in ein Röhrchen gegeben. Pro 100 mg Gewebe wurde 1 ml RIPA-Puffer dazu gegeben und kurz vor dem Lysieren der Zellen 40 µl der Proteinase-Inhibitor-Lösung pro ml dazu pipettiert. Diese Mischung wurde mit dem Polytron® zerkleinert.

Anschließend wurde bei 4°C 30 Minuten bei 8000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und die Protein-Konzentration photometrisch bestimmt.

Im Anschluss wurden die Proben mit RIPA-Puffer verdünnt und im Verhältnis 4:1 mit dem LDS-Sample Buffer gemischt, danach 10 Minuten gekocht und entweder direkt in ein Gel geladen oder bei -20°C konserviert.

### **3.10 Western Blot**

Der Western Blot dient dazu, spezifische Proteine in einer komplexen Mischung mittels Gelelektrophorese aufzufinden. Das Proteingemisch wird durch Gelelektrophorese in einem Polyacrylamidgel fraktioniert, gefolgt von Transfer und Immobilisierung fraktionierter Proteine auf eine PVDF-Membran oder auf eine Nitrocellulose-Membran.

### 3.10.1 Gelelektrophorese, SDS-Page

#### Material

NuPage® MES\* SDS Running Buffer 40 ml Buffer  
ad 760 ml Aqua dest.

\* 2-(N-morpholino) ethane sulfonic acid

NuPage® 4-12% Bis-Tris Mini Gel

See Blue® Plus 2 Pre-Stained Standard

Elektrophoresekammer XCell II™ Blot Module

Power Ease 500

#### Durchführung

Ein oder zwei Novex Bis-Tris Gele wurden kurz mit Aqua dest. abgespült, der Kamm aus dem Gel entfernt, die Taschen mit Running Buffer dreimal gespült und der Klebestreifen von den Gelkassetten entfernt. Im Anschluss wurden sie in die Gelkammer eingebaut und die innere und äußere Kammer mit Running Buffer gefüllt.

Die in 3.6 beschriebenen Proben wurden gleich nach dem Erwärmen (70°C, 10 min) in die Geltaschen pipettiert (maximales Probenvolumen 25 µl). Der Marker wurde ohne vorheriges Erwärmen in die Taschen verbracht.

Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Stromstärke von 200 Volt 35 Minuten lang durchgeführt.

Anschließend wurden die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proben durch Blotten auf eine PVDF-Membran oder auf Nitrocellulose überführt.

### 3.10.2 Membran-Transfer der Proteine („Blotten“)

#### Material

NuPage® Transfer Buffer

für 1 Blot + 10% Methanol:

45 ml Buffer

90 ml Methanol

ad 765 ml Aqua dest.

für 2 Blots + 20% Methanol:

45 ml Buffer

180 ml Methanol

ad 675 ml Aqua dest.

Blotting Pads

PVDF-Membran

oder Nitrocellulose-Membran

Filterpapier

#### Durchführung

Nach der Gelelektrophorese wurden die Gelkassetten aufgebrochen, die Geldaschen entfernt, ein in Transfer Buffer eingeweichter Filter auf das Gel gelegt und die Luftblasen mittels einer Pipette durch Rollen entfernt. Auf die andere Seite des Gels wurde die PVDF-Membran gelegt gefolgt von einem ebenfalls in Transfer Buffer eingeweichtem Filterpapier. Mit dem zweiten Gel wurde analog verfahren. Der Aufbau zwischen den Plattenelektroden sah folgendermaßen aus: Auf die Kathodenplatte (-) wurden gelegt, zwei Blotting Pads, Filter-Gel-Membran-Filter-Sandwich, ein Blotting Pad, Filter-Gel-Membran-Filter-Sandwich und wieder zwei Blotting Pads. Die Blotting Pads waren ebenfalls zuvor in Transfer Buffer eingeweicht worden. Die Anodenplatte (+) wurde aufgesetzt, in die Kammer eingebaut und eine konstante Stromstärke von 30 Volt 60 Minuten lang angelegt.



Nach Beendigung des Blottens wurde die PVDF-Membran in Reinstwasser gewaschen und in einer Folie bei 4°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

### 3.10.3 Proteindetektion durch spezifische Antikörper

Die an die PVDF-Membran gebundenen, aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe von spezifischen Antikörpern detektiert.

#### Material

Western Breeze® Chromogenic Immunodetection System	<ul style="list-style-type: none"><li>- Blocking Solution</li><li>- Primary Antibody Diluent</li><li>- Antibody Wash</li><li>- Secondary Antibody Solution</li><li>- Chromogenic Substrate</li></ul>
Non-Fat Dry Milk	0,4 g in 10 ml 0,05% PBS lösen
1. Antikörper	jeweiliger monoklonaler Ak aus frischem oder aufgereinigtem Zellkulturüberstand
2. Antikörper für Maus mAk	<ul style="list-style-type: none"><li>- Secondary Antibody Solution aus dem Western Breeze Kit</li><li>- Ziege anti-Maus-IgG, AP konjugiert</li></ul>
2. Antikörper für Ratte mAk	<ul style="list-style-type: none"><li>- Ziege anti-Ratte-IgG, AP-konjugiert</li></ul>

## Durchführung

Die in 5% Magermilchpulverlösung oder mit Western Breeze Blocking Solution blockierte PVDF-Membran wurde 2 x 5 Minuten in Reinstwasser gewaschen und anschließend mindestens eine Stunde mit dem primären Antikörper (Zellkulturüberstand) inkubiert.

Der überschüssige Antikörper wurde durch 4 x 5 minütiges Waschen in Antibody Wash Solution entfernt. Danach wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper für mindestens 30 Minuten inkubiert. Dieser wurde wiederum durch mehrere Waschschrte mit Antibody Wash Solution und Reinstwasser entfernt. Durch anschließende Färbung der Membran mit Chromogenic Substrate wurden die gebundenen Proteine sichtbar.

Die Membran wurde nochmals mit Reinstwasser gewaschen und dann luftgetrocknet.

### 3.11 Oberflächenbiotinylierung von Zellen

Durch diese Methode [LISANTI, 1994] wurden alle Proteine auf der Zelloberfläche mit Biotin markiert. Das Zelllysate (siehe Abschnitt 3.6) wurde anschließend mit einem, für ein bestimmtes Oberflächenprotein spezifischen mAk, immunpräzipitiert (siehe Abschnitt 3.11). Dieses, ebenfalls biotinyliertes Protein konnte durch eine an Streptavidin gekoppelte Peroxidase im Western Blot nachgewiesen werden.

## Material

Calciumchlorid 1 M	14,7 g Calciumchloridhydrat ( $\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$ ) <sup>2</sup> ad 100 ml Aqua bidest., bei RT lagern
Magnesiumchlorid 1 M	Magnesiumchlorid x 6 H <sub>2</sub> O ( $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ ) <sup>2</sup> ad 100 ml Aqua bidest., bei RT lagern
PBS (plus Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> )	500 ml PBS 500 µl Magnesiumchlorid 1 M 50 µl Calciumchlorid 1 M bei 4°C aufbewahren

Sulfo-NHS-Biotin Stammlösung (200 mg/ml)	50 mg Sulfo-NHS-Biotin 250 µl DMSO durch 5-minütiges Schütteln auflösen, in Aliquots von 15 µl bei -20°C lagern
Sulfo-NHS-Biotin Gebrauchslösung (0,5 mg/ml)	6 ml PBS (plus Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> ) 15 µl Sulfo-NHS-Biotin Stammlösung kurz vor Gebrauch herstellen
RPMI 1640	

### Durchführung

Bei der Biotinylierung von primären Zellen wurden  $5 \times 10^7$  Zellen durch 10-minütige Zentrifugation bei 4°C mit 1250 rpm gewonnen. Das Zellpellet wurde zweimal durch Zentrifugation mit eiskaltem PBS (plus Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>) gewaschen und in 6 ml Sulfo-NHS-Biotin Gebrauchslösung (0,5 mg/ml) resuspendiert. Nach 40 Minuten Rotation bei 4°C wurde wie oben zentrifugiert und das Pellet in RPMI 1640 resuspendiert, um nicht gebundenes Sulfo-NHS-Biotin aus der Reaktion zu entfernen. Es wurde noch zweimal mit eiskaltem PBS (Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>) gewaschen und die Zellen anschließend, wie nachfolgend beschrieben, lysiert.

Zur Kontrolle wurden die Zellen vor und nach der Biotinylierung mit SA-FITC gefärbt und mit Hilfe der Durchflußzytometrie analysiert (siehe Abschnitt 3.4.1)

### 3.12 Zellyse

Um die Gesamtproteinfraktion einer Zelle zu erhalten, wurden die Zellen mit einem Detergenz (Triton-X-100) lysiert, zentrifugiert und der proteinhaltige Überstand weiter verwendet.

## Material

Triton-X-100

siehe Abschnitt 3.6

## Durchführung

$5 \times 10^7$  bis  $1 \times 10^8$  Zellen wurden 10 Minuten bei  $4^\circ\text{C}$  und 1250 rpm zentrifugiert und das Zellpellet in 1 ml Lysepuffer resuspendiert. Nach 45 Minuten Inkubation auf Eis und 30 Minuten Zentrifugation mit 8000 rpm bei  $4^\circ\text{C}$  wurde der Überstand in ein Röhrchen überführt und das Zelllysate bis zum weiteren Gebrauch bei  $-80^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

### 3.13 Immunpräzipitation

Diese Methode wurde verwendet, um ein bestimmtes Protein aus dem Zelllysate aufzureinigen. Das Gesamtlysate wurde dabei mit Protein-L-Agarosekügelchen, die den für dieses Protein spezifischen Antikörper gebunden haben, für mehrere Stunden inkubiert und dieses Protein dann ausgewaschen.

## Material

Waschpuffer 1

siehe Abschnitt 3.5

Protein-L-Agarosekügelchen

NuPAGE® LDS-Sample Buffer

## Durchführung

Ca. 200  $\mu\text{l}$  der Protein-L-Agarosekügelchen wurden in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und zweimal mit PBS 3 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und ca. 100  $\mu\text{l}$  von dem Zelllysate (siehe Abschnitt 3.6) zu den Agarosekügelchen pipettiert. Diese Mischung kam für 10 Minuten in einen Thermomixer bei  $4^\circ\text{C}$ . Danach wurde 10

Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und in ein neues Zentrifugenröhrchen verbracht. Die Agarosekügelchen wurden danach nicht mehr gebraucht. Die Proteinkonzentration wurde photometrisch bestimmt, um die entsprechende Menge vom jeweiligen monoklonalen Antikörper zu dem Zelllysate zu geben. Die Proben wurden über Nacht in einem Thermomixer bei 4°C geschüttelt.

Nach der Kälteinkubation wurden die Agarosekügelchen, wie oben beschrieben, nochmals aufbereitet und danach der jeweilige sekundäre Antikörper zu der Agarose gegeben. Die Proben kamen für 2 Stunden bei 4°C in den Thermomixer. Anschließend wurden die Proben dreimal 5 Sekunden bei 13000 rpm mit Waschpuffer 1 zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, die Agarose mit Sample buffer versetzt und dann 5 Minuten gekocht. Nach dem Kochen wurde 5 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und in Zentrifugenröhrchen gegeben. Die Proben wurden in ein Gel geladen (siehe Abschnitt 3.7.1).

### **3.14 Proteindetektion durch spezifischen Antikörper**

Die an die Nitrocellulose-Membran gebundenen, aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers, der mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP) markiert war, detektiert. Nach Zugabe eines Chemolumineszenz-Substrats katalysiert die Peroxidase die Oxidation von Luminol. Das dabei entstehende angeregte Dioxetan zerfällt unter Lichtabgabe, was auf einem Röntgenfilm dokumentiert werden kann.

#### **Material**

Antikörper SA-HRP 1:10000 mit PBS-T verdünnt

Super Signal West Pico Chemoluminescent Substrate

Kodak BioMax MR (Röntgenfilm)

## **Durchführung**

Die Membran wurde mit Non-Fat Dry Milk für 1 Stunde geblockt und danach einmal 15 Minuten in 0,05%tigem PBS-T gewaschen. Die Nitrocellulose-Membran wurde im Anschluss mit dem Antikörper Streptavidin-HRP 2 Stunden inkubiert. Der überschüssige Antikörper wurde durch Waschen mit PBS-T von einmal 15 Minuten und fünfmal 5 Minuten entfernt. Letztlich wurde die Membran mit Chemolumineszenz-Substrat für 5 Minuten inkubiert und entwickelt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Übersicht

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei Fusionen durchgeführt. Mäuse wurden mit adhärenen Zellen aus dem Rattenknochenmark immunisiert und Ratten bekamen adhärenente Zellen aus dem Mausknochenmark appliziert. Alle Überstände aus sechs 96-Lochplatten jeder Fusion wurden zuerst in Form von zwei Pools aus jeweils drei Platten im FACS getestet. In einem zweiten Screening wurden dann die jeweils positiven Klone ausfindig gemacht und subkloniert. Die Klone wurden wieder im FACS und außerdem immunhistochemisch auf adhärenen Knochenmarkzellen getestet. Die positiven Klone wurden anhand der Färbung von Zellpopulationen in frischen Knochenmarkzellen und drei Tage adhärenen Knochenmarkzellen im FACS und bei der immunhistochemischen Direktcharakterisierung in Zellkulturplatten ermittelt.

Tabelle 1: Übersicht Fusionen Maus/Ratte

Empfängertier	Ratte	Ratte	Maus
Material	Mausknochenmark	Mausknochenmark	Rattenknochenmark
Applikationsart	s. c.	i. p.	s. c.
Positive Klone	7	8	13
FACS positive Klone*	12	15	37
IHC** in Platten pos. Klone*	9	7	32
IHC** auf Knochen-Schnitten pos. Klone*	5	4	15

\* nach Subklonierung

\*\* Immunhistochemie

Beim FACS-Screening wurde besonders auf Klone geachtet, die bei den frischen Knochenmarkzellen nur wenige Zellen anfärben und beim Test von adhärenenten Knochenmarkzellen einen deutlich höheren Anteil positiver Zellen aufweisen. Außerdem wurde die positive Zellfraktion im Forward-Sideward-Scatter (FSC/SSC) beurteilt: Charakteristisch für wenig differenzierte Stammzellen sind eine geringe Größe und geringe Granularität. Besonders interessante Klone für die Isolierung von Knochenmarkstromazellen wären somit die, bei denen positive Zellen sich im FSC/SSC als klein und wenig granuliert darstellen.

Zur Direktcharakterisierung in Zellkulturplatten wurden 64 Maussubklone und 27 Rattensubklone getestet. Die positiven Überstände wurden als erster Antikörper für einen immunhistochemischen Nachweis verwendet. Positive Überstände führen zu einer Rotfärbung der adhärenenten Zellen. Dabei fielen Klone auf, die so gut wie alle adhärenenten Zellen anfärbten, während andere Klone nur vereinzelte adhärenente Zellen färbten.

Klone, die in der Immunhistochemie in Platten positiv waren, wurden auch auf Paraffinschnitten von Knochen getestet. Insgesamt wurden 23 Mausklone auf Knochenschnitten getestet, wobei acht Klone negativ und 15 Klone positiv waren.

12 Klone von den i. p. immunisierten Ratten wurden auf Knochenschnitten getestet. Davon waren vier Klone positiv und acht Klone negativ. Ebenfalls 12 Klone von den s. c. immunisierten Ratten wurden auf Knochenschnitten getestet. Hier reagierten fünf Klone positiv und sieben Klone negativ.

Die Klone, die auf den Knochenschnitten positive Ergebnisse zeigten, wurden nachfolgend auch auf verschiedenen Organschnitten getestet. Eine Übersicht der positiven und negativen Klone in verschiedenen Screening-Methoden geben die Tabellen 2 und 4. Eine Übersicht der positiven und negativen Ergebnisse auf verschiedenen Organschnitten findet sich in den Tabellen 3 und 5. Die Details der FACS-Analyse und der Immunhistologie (auf Paraffinschnitten) werden bei der Charakterisierung der einzelnen Klone im Folgenden dargestellt.

Bei mehreren ausgewählten Klonen wurde außerdem versucht, die Größe des erkannten Proteins mittels Western Blot und Immunpräzipitation festzustellen. Die Einzelheiten werden in Abschnitt 4.5 Western Blot und in Abschnitt 4.6 Immunpräzipitation beschrieben.



Tabelle 2: Ergebnisse Klone Maus s. c.

Klon-Nr.	FACS	Immunhistologie in Platten	Immunhistologie Knochen
1B1C12	-	-	n. g.
1B11D12	-	-	n. g.
1B11E12	-	-	n. g.
1F12C12	-	-	n. g.
1F12D4	-	-	n. g.
1F12D7	-	-	n. g.
1F12D12	-	-	n. g.
1F12F10	+	+	+
1F12G10	-	-	n. g.
1F12H6	-	-	n. g.
1G1B9	-	-	n. g.
1G1B11	-	-	n. g.
1G1D9	-	-	n. g.
1G1E11	-	-	n. g.
1G1G9	-	-	n. g.
1G1G11	-	-	n. g.
1G1H9	-	-	n. g.
1G1H11	-	-	n. g.
2C8A4	-	-	n. g.
2C8B4	-	-	n. g.
2C8C4	-	-	n. g.
2C8D4	-	-	n. g.
2C8E6	-	-	n. g.
2C8F8	-	-	n. g.
2C8G8	-	-	n. g.
2C8H8	-	-	n. g.
2E12E4	-	-	n. g.
2E12F12	-	-	n. g.
2G10A5	+	-	n. g.

2G10B5	+	-	n. g.
2G10F6	+/-	-	n. g.
2G10G5	+/-	-	n. g.
3C2B7	+	+	-
3C2C2	+	+	-
3C2C4	+	+	n. g.
3C2G4	+	+	-
3C2G11	+	+	n. g.
3D10D12	+	+	-
3D10F4	+	+	-
3D10F8	+	+	+
3D10G12	+	+	n. g.
3G3A11	+	+	+
3G3B12	+	+	+
3G3C10	+	+	+
3G3D4	+	+	+
3G3E6	+	+	+
3G3F2	+	+	+
3G3G12	+	+/-	-
3H10A12	+	+	+
3H10C12	+	+	+
3H10E12	+	+	+
3H10F11	+	+	n. g.
3H10G3	+	-	n. g.
3H10G12	+	+	+
5C10C9	+	+	-
5C12H2	+	+/-	n. g.
5C12A10	+	+	+
5C12B1	+	+	-
5C12B3	+	+	+
5C12B12	+	+	+
5C12D10	+	+	n. g.
5C12E5	+	+	n. g.

5C12E9	+	+/-	n. g.
5C12G11	+	+/-	n. g.

+ positiv, +/- schwach positiv, - negativ, n. g. nicht getestet

Tabelle 3: Ergebnisse Immunhistologie verschiedene Gewebe

Maus s. c. Klon-Nr.	1F12F10	3C2B7	3D10F8	3G3G12	3H10A12	5C12B12
Pankreas	+	-	+	-	++	+
Darm	-	-	-	-	++	-
Haut	-	-	-	-	++	+/-
Muskel	-	-	-	-	++	-
Wirbel	+	-	+	-	++	+
Leber	+	-	+	-	++	+
Niere	+	-	+	-	++	+
Milz	+	-	+	-	++	+
Lunge	-	-	+	-	++	+/-
Herz	-	-	+	-	++	-

Tabelle 4: Ergebnisse Klone Ratte i. p. und Ratte s. c.

Ratte i. p. Klon-Nr.	FACS	Immunhistologie in Platten	Immunhistologie Knochen
1E7D3	+	-	n. g.
1E7F12	+	-	-
1E7G4	+	-	-
2G7C4	+	-	-
2G7C5	+	+/-	+/-
4H11C10	+	-	n. g.
4H11D11	+	+	+
4H11E9	+	+/-	+

4H11F10	+	-	n. g.
4H11G6	+	-	-
6A8C8	+	+	-
6A8D3	+	+	-
6A8E10	+	+	-
6A8F2	+	-	-
6F8E12	+	+	+
Ratte s. c. Klon-Nr.			
3H6A3	+	-	+/-
3H6B2	+	+	+/-
3H6G2	+	-	-
3H6H7	+	+/-	-
4E12H2	+	-	-
5C10B3	+	+	-
5C10G5	+	+	-
5C10H10	+	+/-	-
6B10B6	+	+	+
6B10B10	+	+	+
6B10D12	+	+	-
6B10H8	+	+	+

Tabelle 5: Ergebnisse Immunhistologie verschiedene Gewebe

Gewebe	Ratte s. c. 6B10B6	Ratte i. p. 6A8C8	Ratte i. p. 6F8E12
Pankreas	+	-	+
Haut	+	-	+
Muskel	+	-	+
Knochen	+	+	+
Leber	+	-	+
Niere	+	-	+
Milz	+	+	+

Lunge	+	+	+
Herz	+	-	+

## 4.2 Klone von der s. c. immunisierten Maus

### 4.2.1 Klon 2G10A5

Der Klon 2G10A5 stellt sich nur im FACS (Abb. 1) positiv dar. Bei den frischen Knochenmarkzellen reagieren ca. 9% der Zellen mit dem Antikörper 2G10A5, bei den adhärenen Zellen fast 40%. Im FSC/SSC der adhärenen Knochenmarkzellen fällt auf, dass hier v. a. größere und stärker granulierten Zellen gefärbt werden. Sowohl in der Immunhistochemie auf den Platten als auch in der Immunhistologie auf den Knochenschnitten sind keine positiven Ergebnisse sichtbar.

## Klon 2G10A5

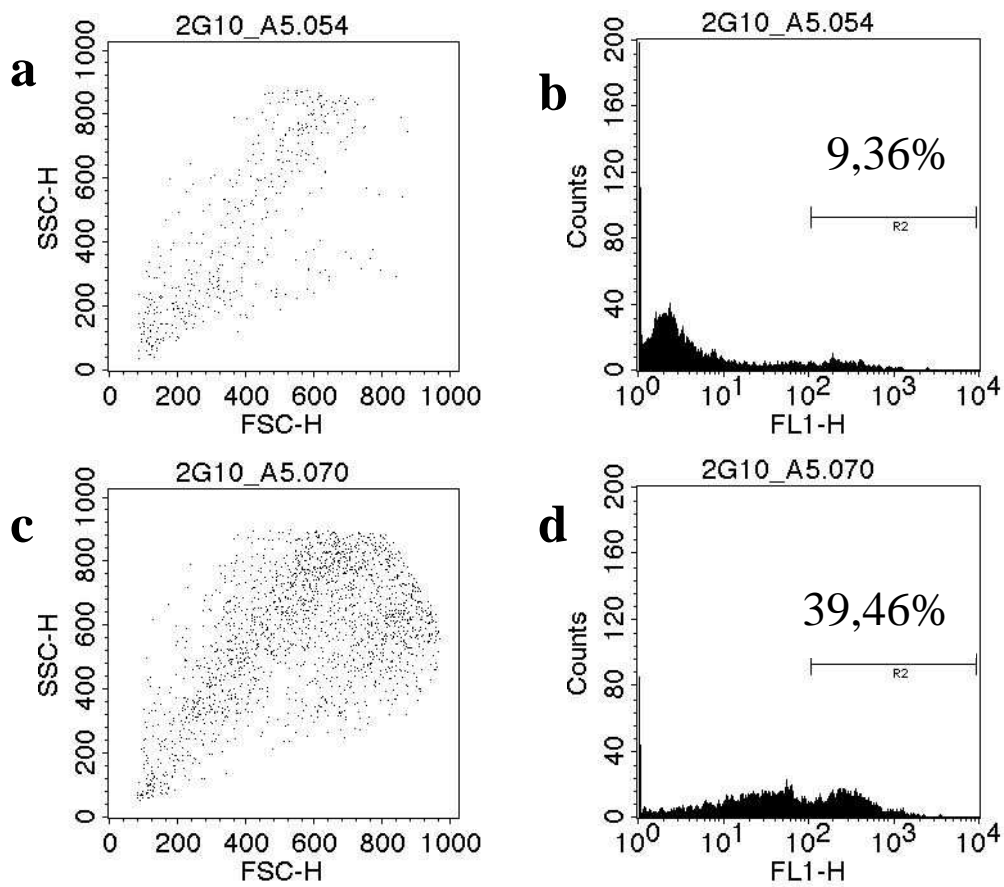


Abb. 1: Überstand des Klons 2G10A5 mit frischen Knochenmarkzellen (a, b) und mit einem Tag adhärenen Knochenmarkzellen (c, d). Die Diagramme des Forward-Sideward- Scatter (a, c) zeigen die positiven Zellpopulationen unter dem Gate R2 im Histogramm (b, d). Im Histogramm (b, d) ist die Prozentzahl der positiven Zellen angegeben.

### 4.2.2 Klon 3C2B7

Der Klon 3C2B7 konnte im FACS (Abb. 2) und in der Immunhistochemie auf Platten als positiv beurteilt werden. Bei den frischen Knochenmarkzellen reagieren 5,6% der Zellen mit dem Antikörper 3C2B7. Bei den adhärennten Zellen reagieren sogar fast 42% mit dem Überstand des Klons 3C2B7. Im FSC/SSC der adhärennten Knochenmarkzellen kann man eine starke Zunahme von kleinen, wenig granulierten Zellen beobachten. In der Immunhistologie auf Knochenschnitten kamen negative Ergebnisse heraus.

### Klon 3C2B7

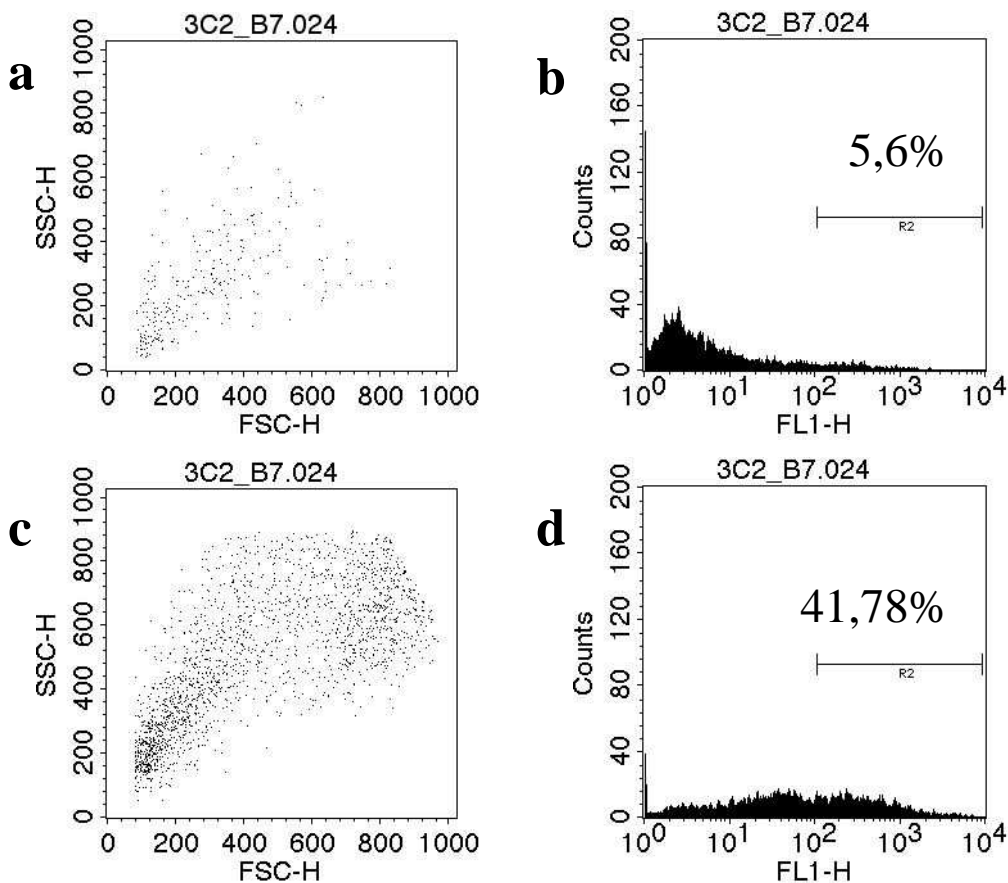


Abb. 2: Überstand des Klons 3C2B7 mit frischen Knochenmarkzellen (a, b) und mit einen Tag adhärennten Knochenmarkzellen (c, d). Die Diagramme des Forward-Sideward- Scatter (a, c) zeigen die positiven Zellpopulationen unter dem Gate R2 im Histogramm (b, d). Im Histogramm (b, d) ist die Prozentzahl der positiven Zellen angegeben.

### 4.2.3 Klon 5C10C9

Auch der Klon 5C10C9 stellt sich nur im FACS (Abb. 3) und in der Immunhistochemie auf Platten positiv dar. Nur 4,24% der Zellen reagieren bei den frischen Knochenmarkzellen mit dem Überstand des Klons 5C10C9. Bei den adhärennten Zellen reagieren knapp über 43% der Zellen mit dem Antikörper 5C10C9. Im FSC/SSC der adhärennten Knochenmarkzellen kann verfolgt werden, dass hier vermehrt größere und stärker granuliert Zellen gefärbt werden. Die Immunhistologie auf Knochenschnitten war negativ.

### Klon 5C10C9

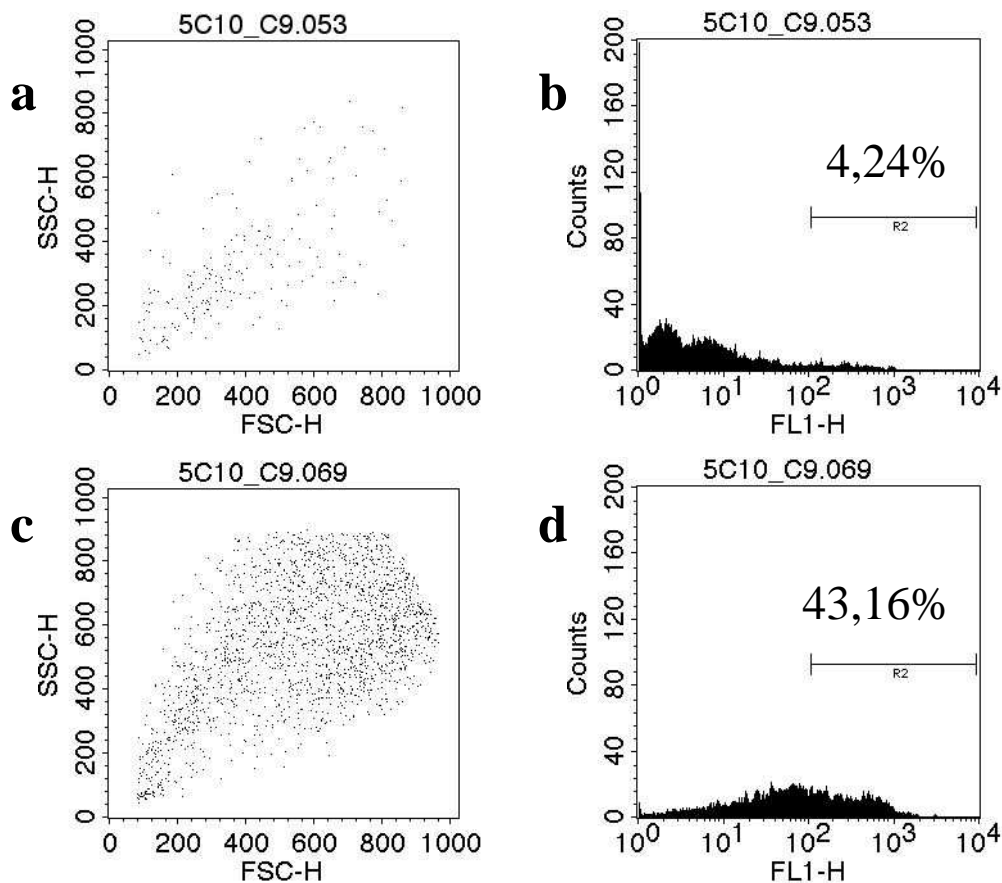


Abb. 3: Überstand des Klons 5C10C9 mit frischen Knochenmarkzellen (a, b) und mit einen Tag adhärennten Knochenmarkzellen (c, d). Die Diagramme des Forward-Sideward- Scatter (a, c) zeigen die positiven Zellpopulationen unter dem Gate R2 im Histogramm (b, d). Im Histogramm (b, d) ist die Prozentzahl der positiven Zellen angegeben.



#### 4.2.4 Klon 3D10F8

Der Klon 3D10F8 ist im FACS (Abb. 4) und in den immunhistologischen Untersuchungen positiv. Bei den frischen Knochenmarkzellen reagieren 3,32% der Zellen mit dem Antikörper 3D10F8 und bei den adhärennten Zellen sind es 30,46%, die mit dem Überstand des Klons 3D10F8 reagieren. Im FSC/SSC bei den adhärennten Zellen ist eine Zunahme der größeren, stärker granulierten Zellen zu sehen.

Die Ergebnisse der Immunhistologie ähneln denen des Klons 1F12F10 und werden deshalb hier nur kurz ohne Abbildungen beschrieben.

Auf den Knochenschnitten in der Immunhistologie sieht man im Knochenmark kleine Zellen mit großem Kern und wenig Zytoplasma, die positiv sind. Die Osteoblasten und Osteozyten sind nur vereinzelt als positiv zu beurteilen.

Die Immunhistologie auf den verschiedenen Organen zeigt, dass die Schnitte von Darm, Haut und Muskel negativ sind, während die anderen getesteten Organe positiv ausfallen. Das Pankreas zeigt, dass die Inseln im Gegensatz zum negativen exokrinen Pankreas, sehr stark gefärbt sind. In der Leber sind die Hepatozyten und das Gallengangsepithel gefärbt. Auch das Bronchusepithel und die Gefäßmuskulatur in der Lunge sind als positiv zu beurteilen, während sich im Herzen die Cardiomyozyten nur als schwach gefärbt darstellen. In der Niere sind nur die Tubuli positiv. In der Milz stellen sich der Endothelsinus, die weiße Milzpulpa und die Lymphfollikel, insbesondere im Randbereich, als positiv dar, wobei der Endothelsinus sogar als stark positiv zu beurteilen ist.

## Klon 3D10F8

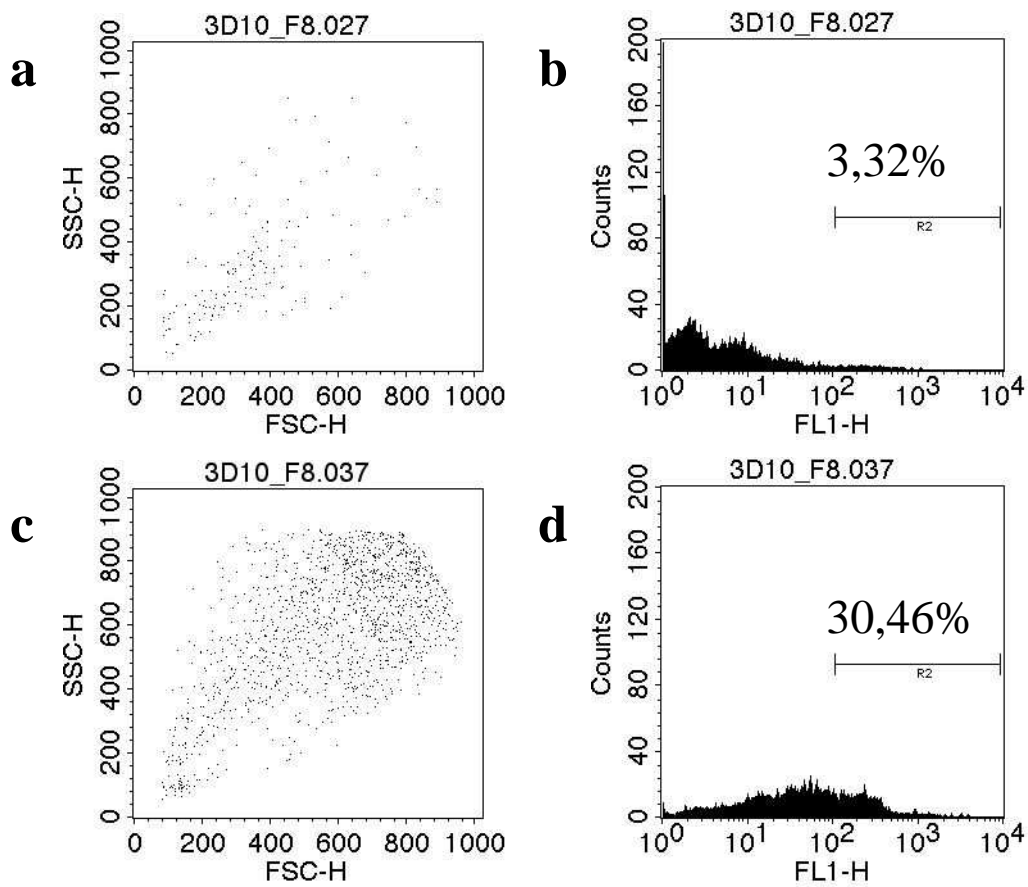


Abb. 4: Überstand des Klons 3D10F8 mit frischen Knochenmarkzellen (a, b) und mit einen Tag adhärenen Knochenmarkzellen (c, d). Die Diagramme des Forward-Sideward- Scatter (a, c) zeigen die positiven Zellpopulationen unter dem Gate R2 im Histogramm (b, d). Im Histogramm (b, d) ist die Prozentzahl der positiven Zellen angegeben.

#### **4.2.5 Klon 3G3A11**

Der Klon 3G3A11 konnte im FACS (Abb. 5), in der Immunhistochemie auf Platten und in der Immunhistologie auf Knochenschnitten als positiv beurteilt werden. Bei den frischen Knochenmarkzellen reagieren 5,46% der Zellen mit dem Überstand des Klons 3G3A11, bei den adhärennten Zellen sind es 27,5% der Zellen, die mit dem Antikörper reagieren. Im FSC/SSC der adhärennten Zellen ist eine deutliche Zunahme der größeren und stärker granulierten Zellen sichtbar. Aber auch kleinere, wenig granuliert Zellen nehmen etwas zu.

Auf den Knochenschnitten sind Zellen im Knochenmark und die Osteoblasten stark positiv. Vereinzelt sind schwach gefärbte Osteozyten sichtbar. Die Chondrozyten und Myozyten sind nicht gefärbt (ohne Abb.). Ähnliche Ergebnisse ergaben sich bei den Klonen 3G3B12, 3G3C10, 3G3D4, 3G3F2 und 3G3E6.

## Klon 3G3A11

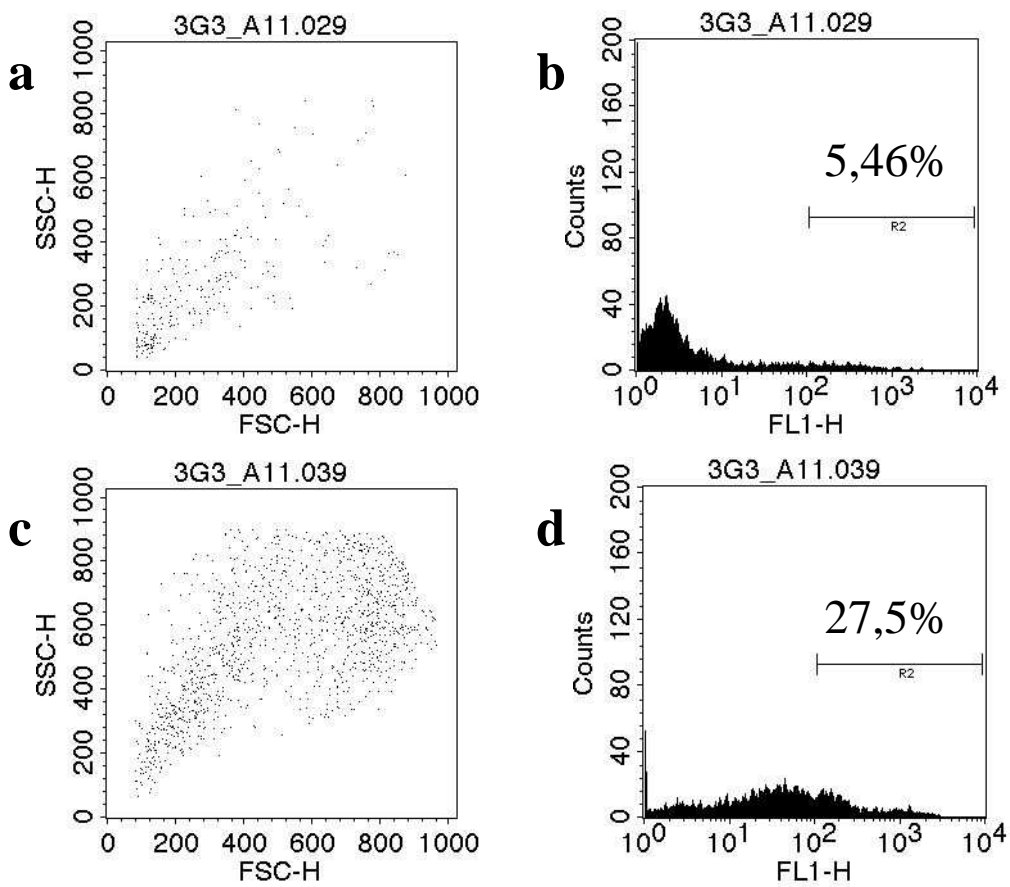


Abb. 5: Überstand des Klons 3G3A11 mit frischen Knochenmarkzellen (a, b) und mit einen Tag adhärenen Knochenmarkzellen (c, d). Die Diagramme des Forward-Sideward-Scatter (a, c) zeigen die positiven Zellpopulationen unter dem Gate R2 im Histogramm (b, d). Im Histogramm (b, d) ist die Prozentzahl der positiven Zellen angegeben.

### 4.2.6 Klon 1F12F10

Der Klon 1F12F10 ist im FACS (Abb. 6) und in den immunhistologischen Untersuchungen positiv. Der Klon ist ebenfalls auf verschiedenen Organschnitten getestet worden.

Bei den frischen Knochenmarkzellen reagieren nur 2,92% der Zellen mit dem Antikörper 1F12F10, während bei den adhärennten Zellen nur ca. 14% mit dem Überstand des Klons 1F12F10 reagieren. Im FSC/SSC der adhärennten Zellen ist eine Zunahme der größeren, stärker granulierten Zellen zu beobachten.

In der Immunhistologie wurde der Klon sowohl auf Knochenschnitten als auch auf verschiedenen Organschnitten getestet. Im Knochenmark sind positive kleine Zellen mit großem Kern und wenig Zytoplasma zu sehen. Die Osteoblasten und die Osteozyten sind nur vereinzelt als positiv zu beurteilen (Abb. 6.2 und Abb. 6.3). Zum Vergleich wurde zusätzlich eine Negativ-Kontrolle auf einem Knochenschnitt durchgeführt (Abb. 6.1). Unter anderem wurde der Klon auf den Organen Darm, Haut, Muskel, Lunge und Herz getestet, wobei negative Ergebnisse herauskamen (ohne Abb.).

Im Leberschnitt lassen sich die Hepatozyten und das Gallengangsepithel als positiv beurteilen (siehe Abb. 6.4). In der Milz sind die weiße Milzpulpa und die Lymphfollikel, insbesondere im Randbereich positiv, während der Endothelsinus als stark positiv beurteilt werden kann (Abb. 6.5). Im Nierenschnitt sieht man, dass die Tubuli positiv und die Glomerula negativ sind (Abb. 6.6). Die Inseln des Pankreas sind stark positiv, während das exokrine Pankreas sich negativ darstellt (Abb. 6.7).

## Klon 1F12F10

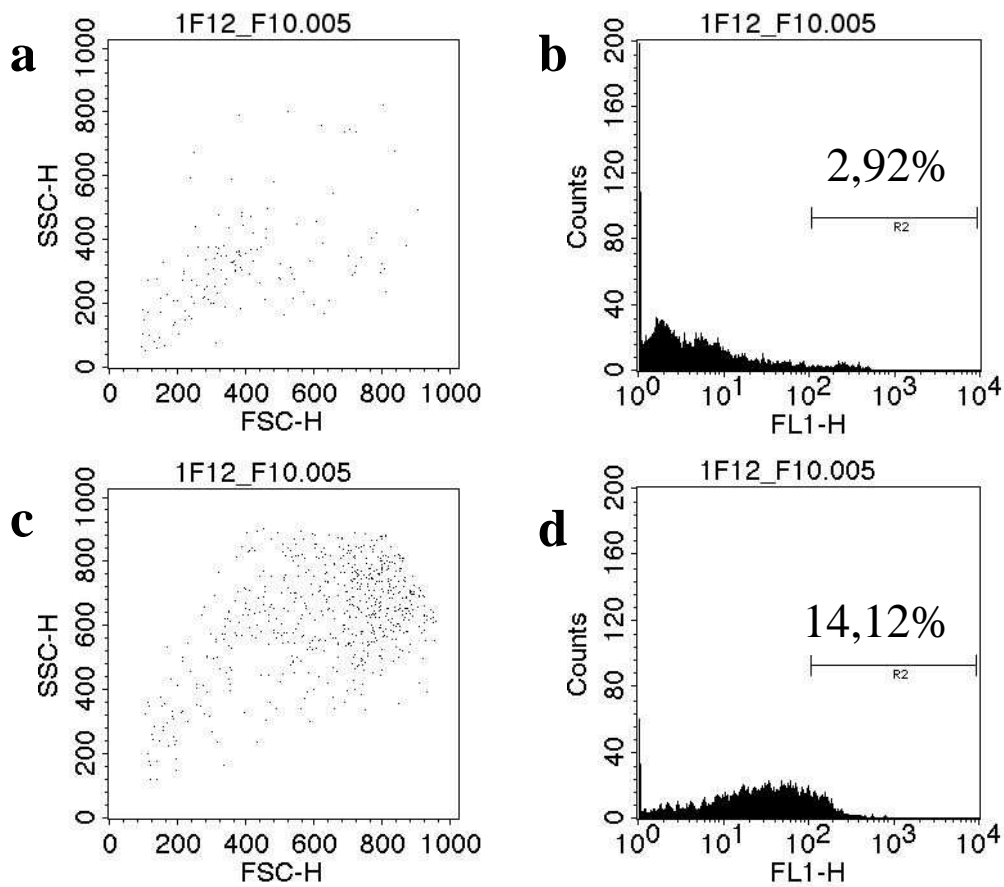


Abb. 6: Überstand des Klons 1F12 F10 mit frischen Knochenmarkzellen (a, b) und mit einen Tag adhärenen Knochenmarkzellen (c, d). Die Diagramme des Forward-Sideward- Scatter (a, c) zeigen die positiven Zellpopulationen unter dem Gate R2 im Histogramm (b, d). Im Histogramm (b, d) ist die Prozentzahl der positiven Zellen angegeben.

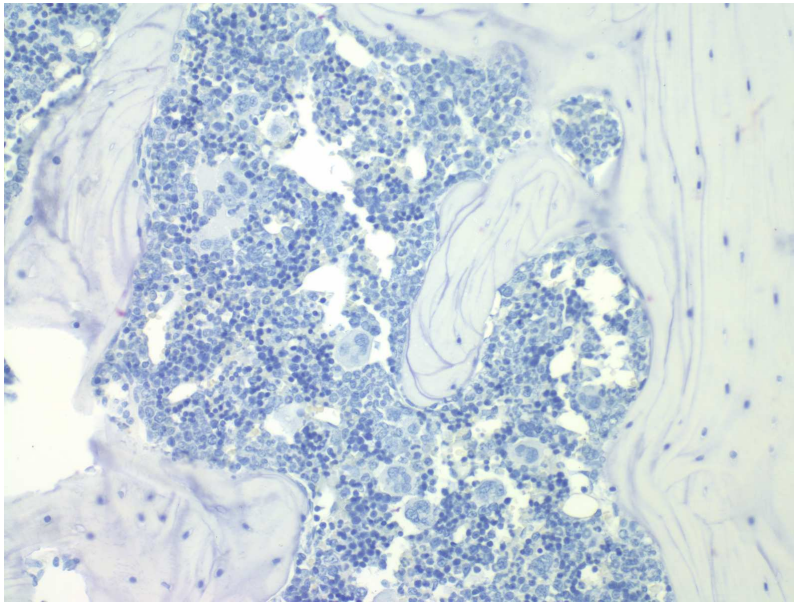


Abb. 6.1

NEGATIV-KONTROLLE

Vergrößerung: 400x

Färbung mit Fast Red

Gegenfärbung mit Hämalaun

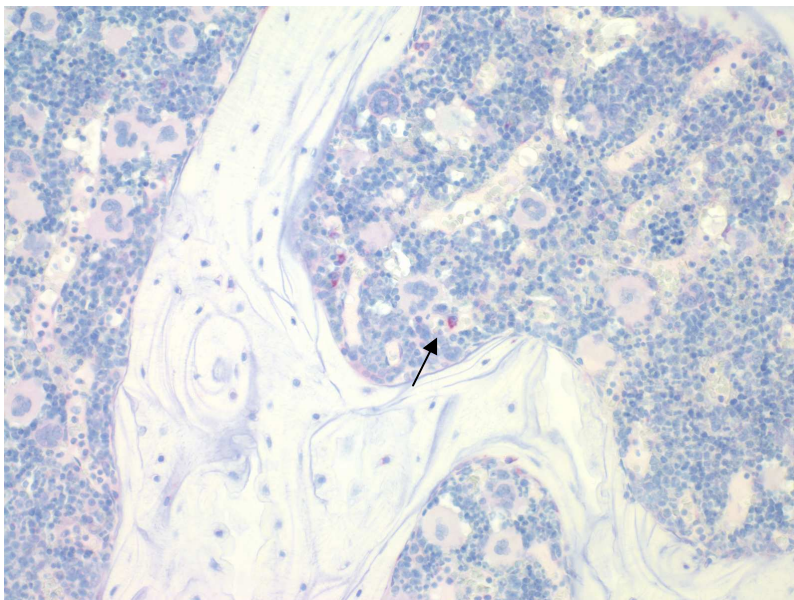


Abb. 6.2

Klon 1F12F10 auf einem  
Knochenschnitt

Vergrößerung: 100x

Färbung mit Fast Red

Gegenfärbung mit Hämalaun

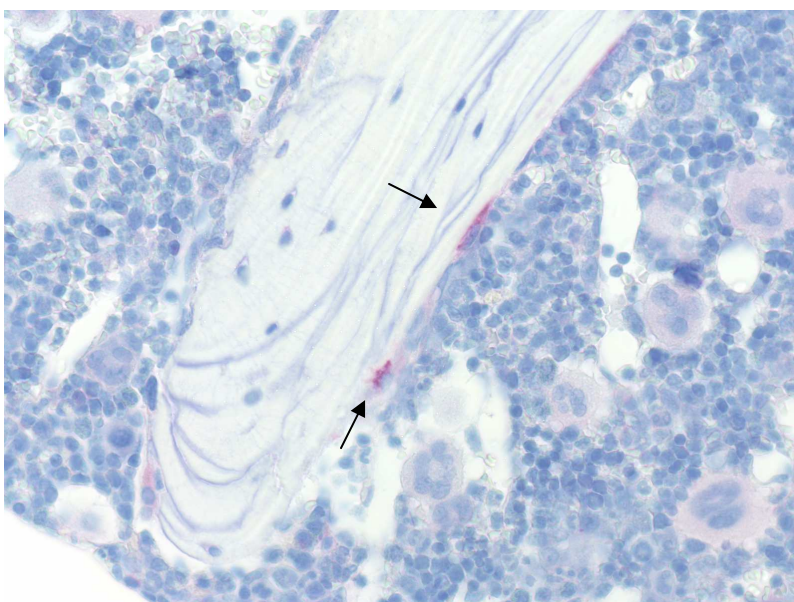


Abb. 6.3

Klon 1F12F10 auf einem  
Knochenschnitt

Vergrößerung: 400x

Färbung mit Fast Red

Gegenfärbung mit Hämalaun

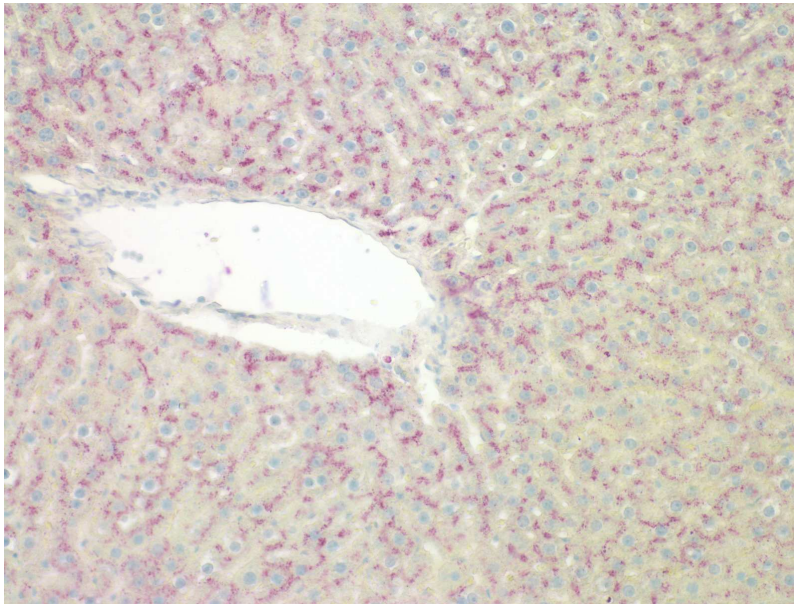


Abb. 6.4

Klon 1F12F10 auf einem  
Leberschnitt

Vergrößerung: 200x

Färbung mit Fast Red

Gegenfärbung mit Hämalaun

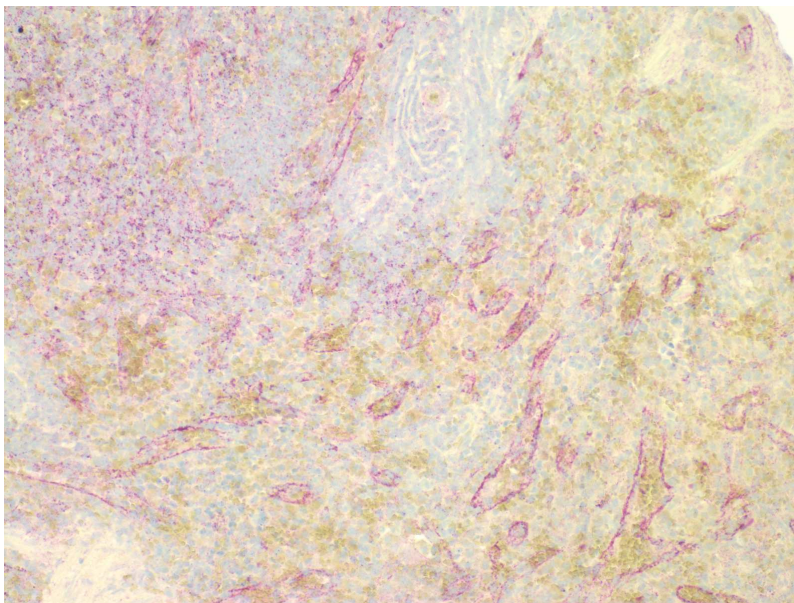


Abb. 6.5

Klon 1F12F10 auf einem  
Milzschnitt

Vergrößerung: 200x

Färbung mit Fast Red

Gegenfärbung mit Hämalaun

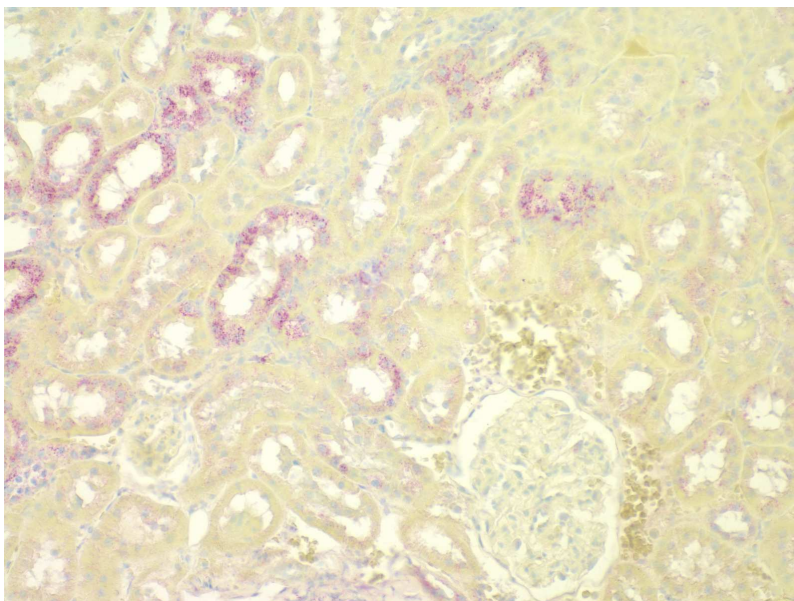


Abb. 6.6

Klon 1F12F10 auf einem  
Nierenschnitt

Vergrößerung: 200x

Färbung mit Fast Red

Gegenfärbung mit Hämalaun



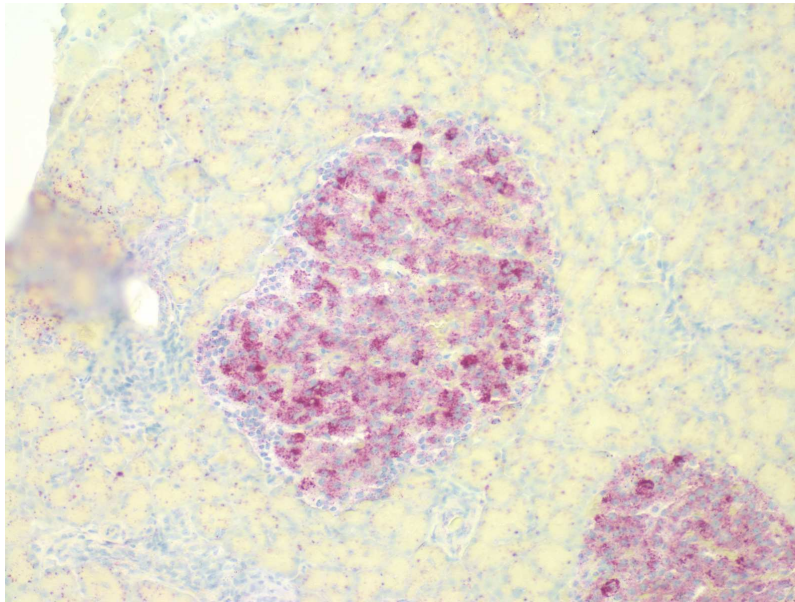


Abb. 6.7

Klon 1F12F10 auf einem  
Pankreasschnitt

Vergrößerung: 200x

Färbung mit Fast Red

Gegenfärbung mit Hämalaun

### 4.2.7 Klon 3H10A12

Der Klon 3H10A12 ist sowohl im FACS (Abb. 7) als auch in den immunhistologischen Untersuchungen positiv. Bei den frischen Knochenmarkzellen reagieren ca. 3% der Zellen mit dem Antikörper 3H10A12, während bei den adhärennten Zellen knapp über 30% mit dem Überstand des Klons 3H10A12 reagieren. Im FSC/SSC der adhärennten Zellen fällt auf, dass sowohl die kleineren, wenig granulierten Zellen als auch die größeren, stärker granulierten Zellen gefärbt werden.

In den immunhistologischen Untersuchungen zeigt sich, dass sich dieser Klon überwiegend als positiv bis stark positiv bewerten lässt. Im Knochenmark ist eine große Anzahl an Osteoblasten und Osteozyten stark positiv. Auch die Chondrozyten, Myozyten, Fibroblasten und viele Zellen im Knochenmark sind ebenfalls als positiv zu beurteilen (Abb. 7.1).

Betrachtet man den Darm, ist sichtbar, dass sich das Zottenstroma anfärben lässt und die Neuronen des Plexus submucosus und des Plexus myentericus ebenfalls positiv sind (Abb. 7.2). Das Ausführungsgang-Epithel, das endokrine und das exokrine Pankreas stellen sich im histologischen Schnitt als positiv dar, wobei das endokrine Pankreas sogar als stark positiv zu beurteilen ist (Abb. 7.3). Auf dem histologischen Schnitt der Haut sieht man, dass sich neben den Haarbälgen und den Talgdrüsen auch das Plattenepithel und die Subcutis anfärben lassen (Abb. 7.4). In der Lunge stellen sich das Bronchusepithel, die Alveolen und die Gefäß-Media, nicht aber das Gefäßendothel, als positiv dar (Abb. 7.5), während sich in der Milz sowohl die weiße als auch die rote Milzpulpa anfärben lassen (ohne Abb.). Auf einem Muskelschnitt, der hier nicht abgebildet ist, färben sich die Myozyten. In der Leber sind die Hepatozyten und das Gallengangsepithel positiv, wobei sich das Endothel nicht anfärben lässt (ohne Abb.). Die Sammelrohre und Tubuli der Niere sind im Gegensatz zu den Glomerula als positiv zu beurteilen (ohne Abb.). Im Herzschnitt sind die Cardiomyozyten als positiv zu bewerten und das lymphatische Gewebe und auch das Bindegewebe stellen sich sogar als stark positiv dar (ohne Abb.).

Die gleichen Ergebnisse erbrachten die immunhistologischen Untersuchungen bei dem Klon 3H10E12, der hier nicht abgebildet ist.

Im Western Blot zeigt der Klon 3H10A12 ebenfalls positive Ergebnisse (siehe Abschnitt 4.5 Western Blot).

## Klon 3H10A12

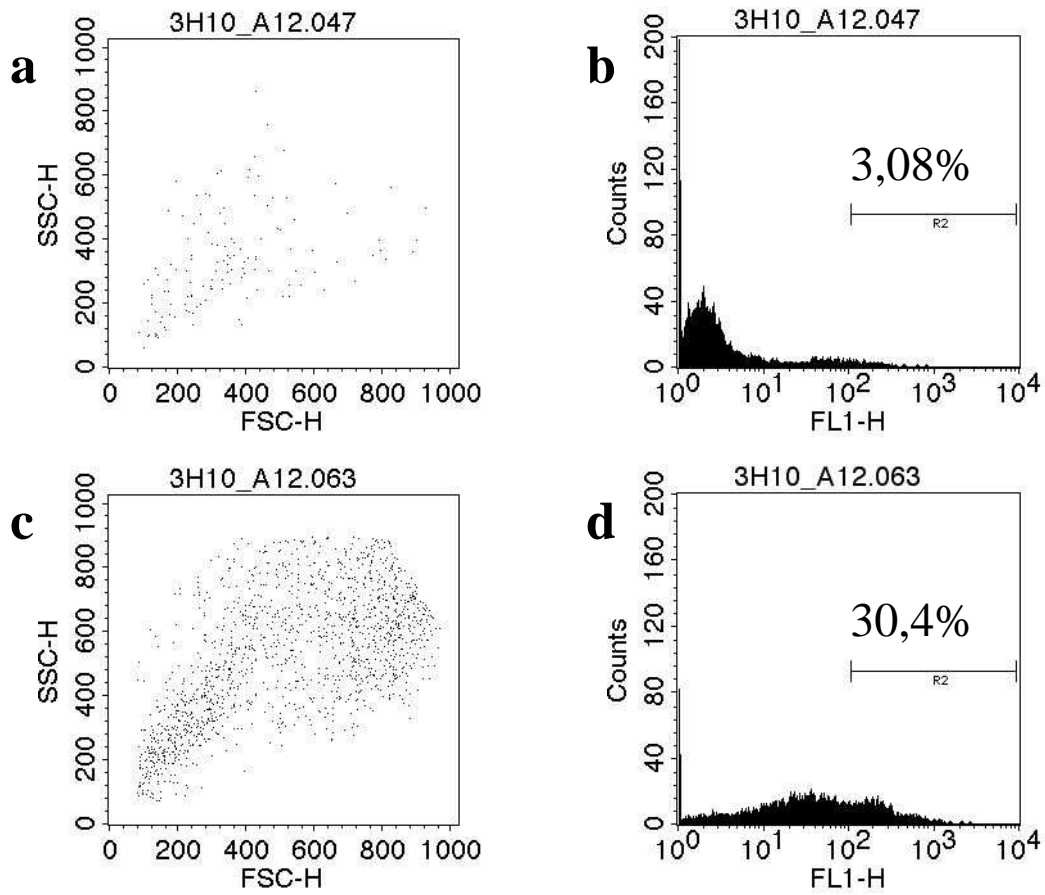


Abb. 7: Überstand des Klons 3H10A12 mit frischen Knochenmarkzellen (a, b) und mit einen Tag adhärennten Knochenmarkzellen (c, d). Die Diagramme des Forward-Sideward- Scatter (a, c) zeigen die positiven Zellpopulationen im Histogramm (b, d). Im Histogramm (b, d) ist die Prozentzahl der positiven Zellen angegeben.

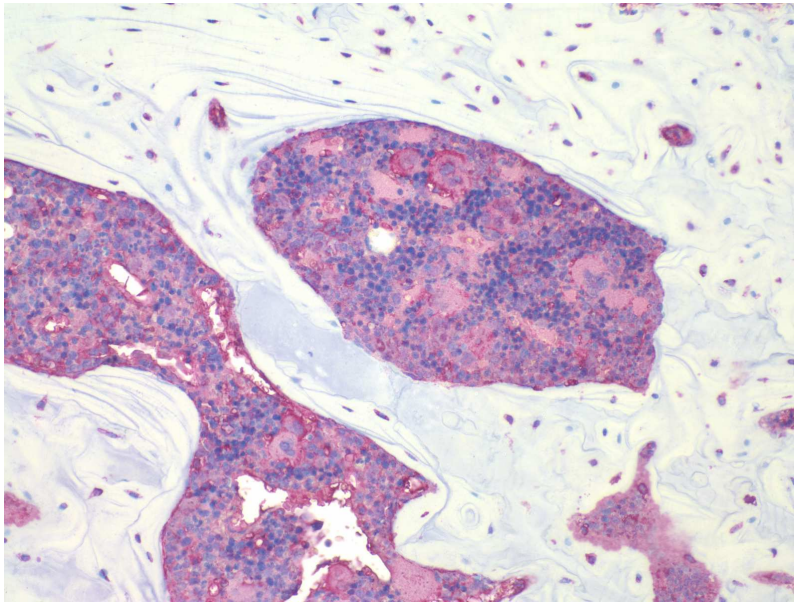


Abb. 7.1

Klon 3H10A12 auf einem  
Knochenschnitt

Vergrößerung: 200x

Färbung mit Fast Red

Gegenfärbung mit Hämalaun

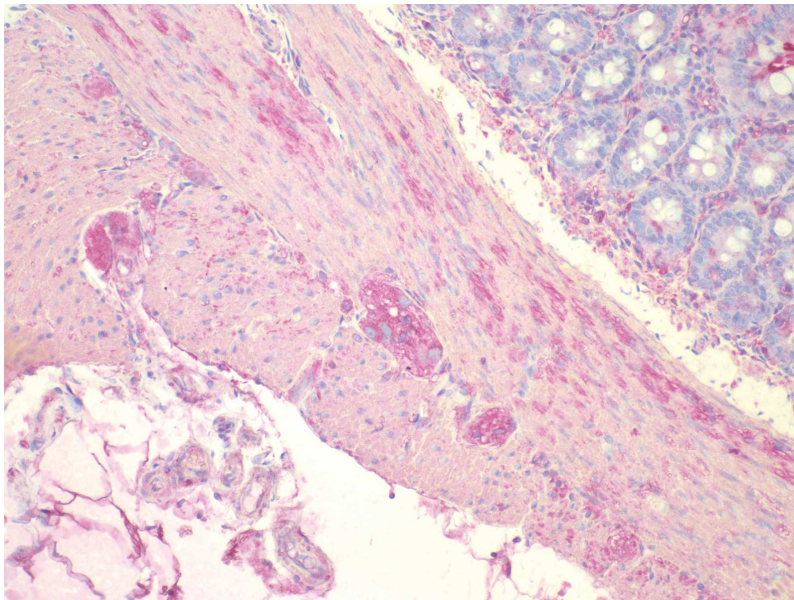


Abb. 7.2

Klon 3H10A12 auf einem  
Darmschnitt

Vergrößerung: 200x

Färbung mit Fast Red

Gegenfärbung mit Hämalaun

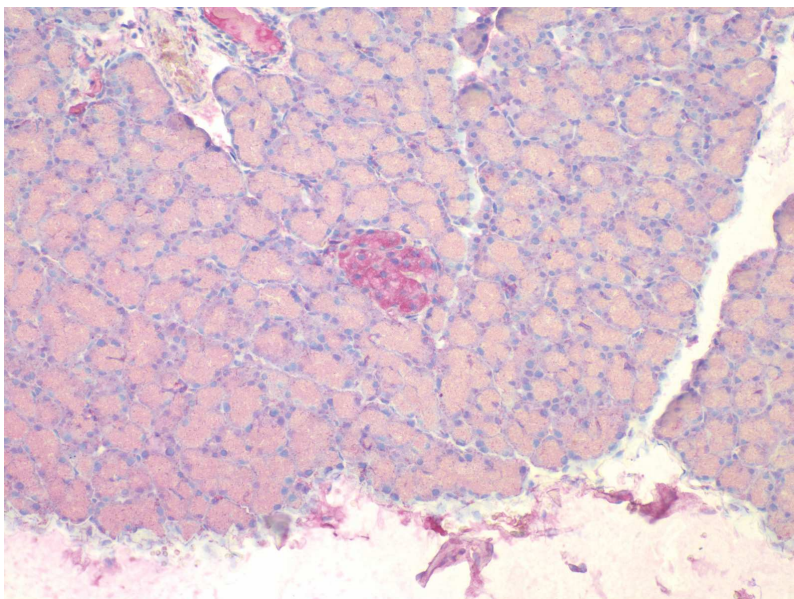


Abb. 7.3

Klon 3H10A12 auf einem  
Pankreasschnitt

Vergrößerung: 200x

Färbung mit Fast Red

Gegenfärbung mit Hämalaun

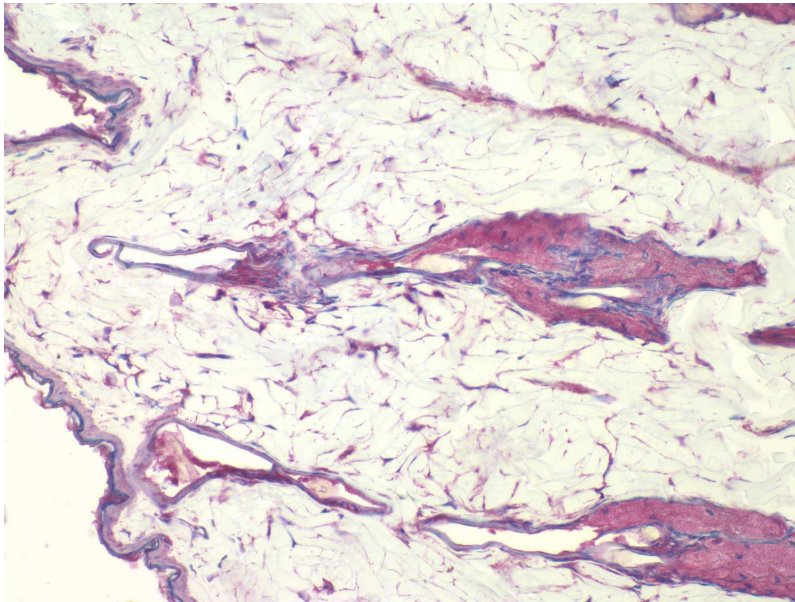


Abb. 7.4

Klon 3H10A12 auf einem  
Hautschnitt

Vergrößerung: 200x

Färbung mit Fast Red

Gegenfärbung mit Hämalaun

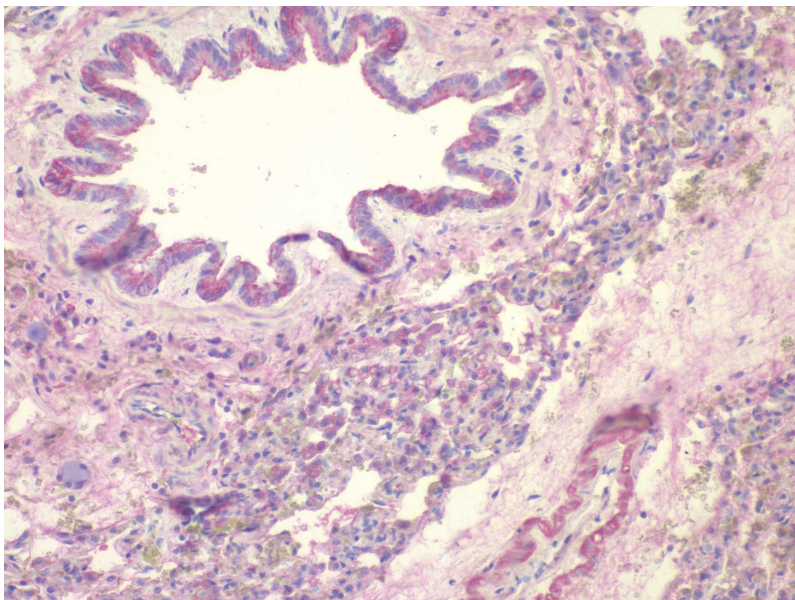


Abb. 7.5

Klon 3H10A12 auf einem  
Lungenschnitt

Vergrößerung: 200x

Färbung mit Fast Red

Gegenfärbung mit Hämalaun

### 4.2.8 Klon 5C12B12

Der Klon 5C12B12 ist sowohl im FACS (Abb. 8) als auch in den immunhistologischen Untersuchungen positiv. Bei den frischen Knochenmarkzellen reagieren knapp über 4% der Zellen mit dem Antikörper 5C12B12, bei den adhärenen Zellen reagieren knapp 30% mit dem Überstand des Klons 5C12B12. Im FSC/SSC der adhärenen Zellen fällt auf, dass vermehrt größere, stärker granuliert Zellen gefärbt werden.

In der Immunhistologie sieht man, dass sich vereinzelt kleine positive Zellen im Knochenmark befinden sowie einige wenige Osteozyten und Osteoblasten ebenfalls positiv sind (Abb. 8.1). Die immunhistologischen Untersuchungen verschiedener Organe (ohne Abb.) ergaben, dass die Schnitte von Darm, Muskel und Herz negativ ausfallen, während andere untersuchte Organe positive Ergebnisse zeigen. So sind die Pankreasinseln als stark positiv zu beurteilen. Im Gegensatz dazu zeigt das exokrine Pankreas nur ein schwach positives Ergebnis. Das Bronchusepithel ist neben den Alveolarmakrophagen als schwach positiv zu bewerten, während sich die Gefäß-Media als deutlich positiv darstellt. Als ebenfalls nur schwach positiv sind die Talgdrüsen im Hautschnitt zu bewerten. In der Milz sind die Lymphfollikel, insbesondere im Randbereich gefärbt sowie das Sinusendothel. Auch die Hepatozyten und das Gallengangsepithel stellen sich positiv dar, während sich in der Niere die Glomerula nicht anfärben lassen, wohl aber die Tubuli.

Ähnliche Ergebnisse fanden sich bei den Klonen 5C12A10 und 5C12B3.

## Klon 5C12B12

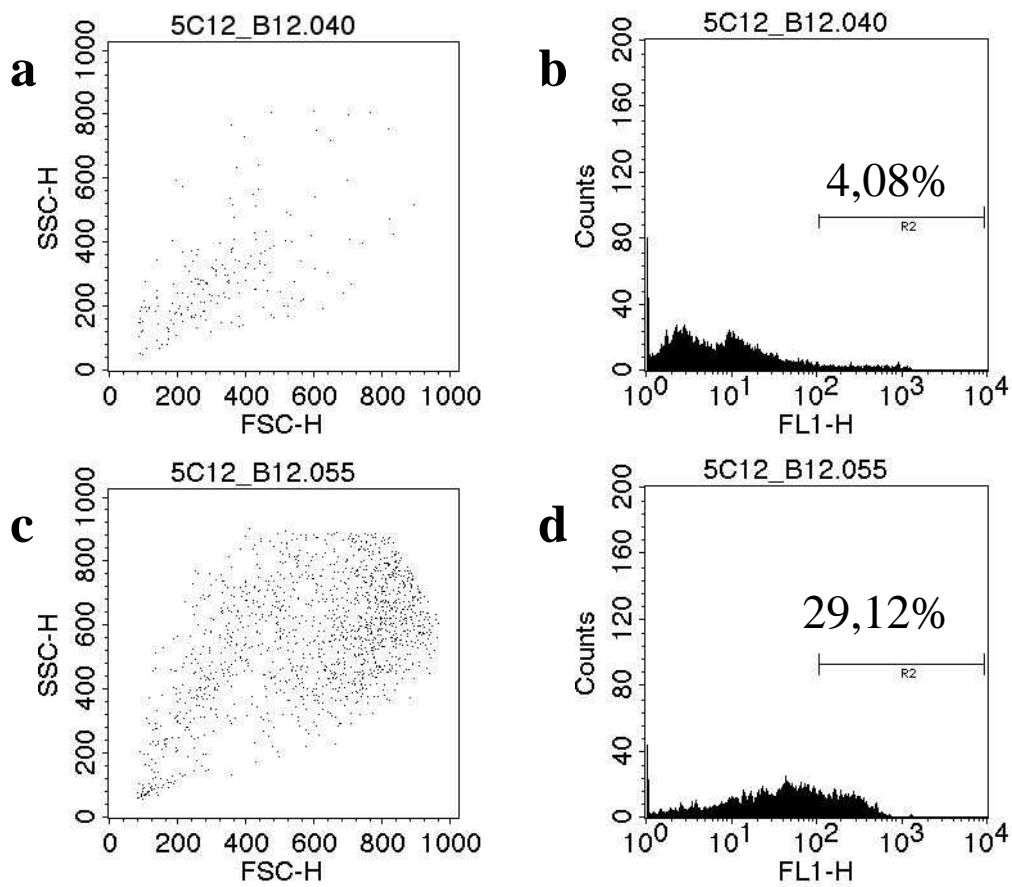


Abb. 8: Überstand des Klons 5C12B12 mit frischen Knochenmarkzellen (a, b) und mit einen Tag adhärenen Knochenmarkzellen (c, d). Die Diagramme des Forward-Sideward- Scatter (a, c) zeigen die positiven Zellpopulationen im Histogramm (b, d). Im Histogramm (b, d) ist die Prozentzahl der positiven Zellen angegeben.

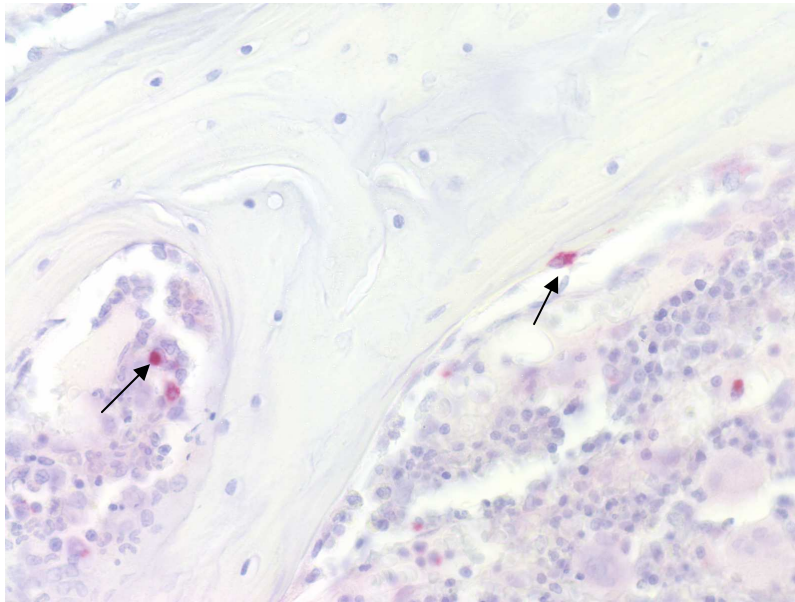


Abb. 8.1  
Klon 5C12B12 auf einem  
Knochenschnitt

Vergrößerung: 400x

Färbung mit Fast Red

Gegenfärbung mit Hämalaun

### 4.3 Klone von den s. c. und i. p. immunisierten Ratten

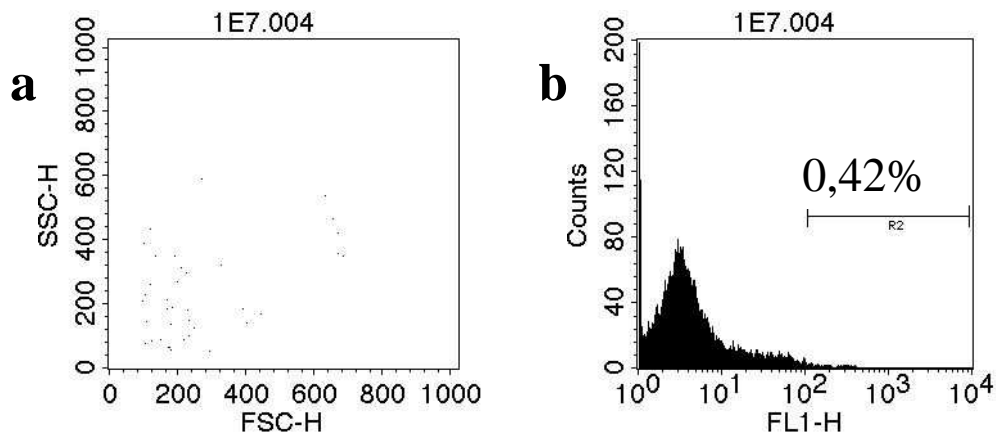
#### 4.3.1 Klone aus der Kavität 1E7 und Klon 1E7F12

Der Klon 1E7F12 wurde im FACS (Abb. 9) als positiv beurteilt. Bei den frischen Knochenmarkzellen reagieren nur 0,42% der Zellen mit dem Überstand 1E7, während bei den adhärenen Zellen 7,24% mit dem Antikörper 1E7F12 reagieren. Im FSC/SSC der adhärenen Zellen sind vermehrt die kleinen, wenig granulierten Zellen gefärbt.

In den immunhistologischen Untersuchungen wurden keine positiven Zellen gefunden.



## Klone aus der Kavität **1E7**



## Klon **1E7F12**

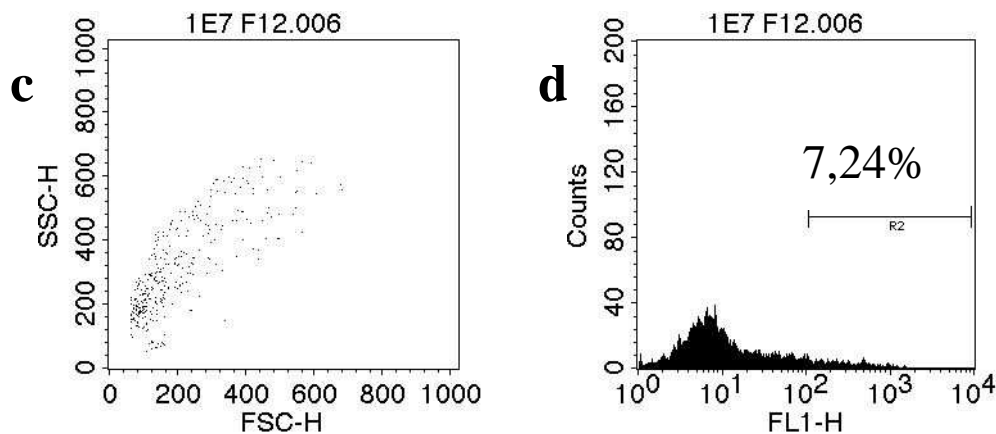


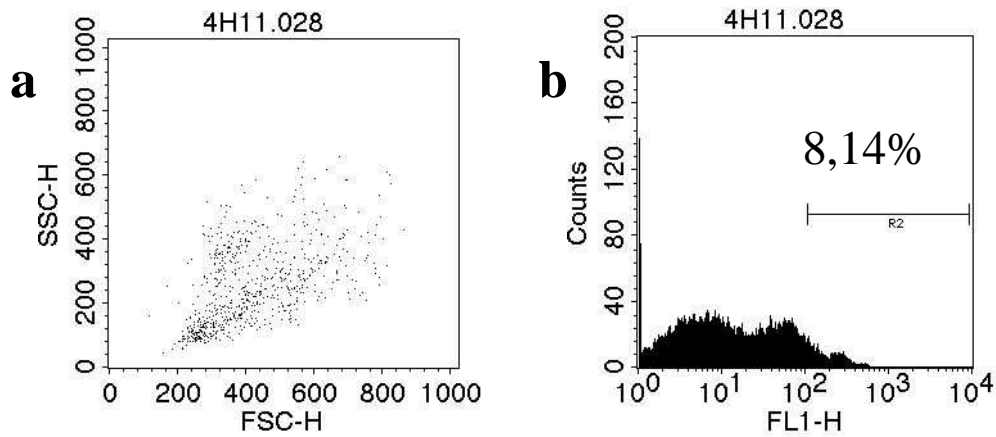
Abb. 9: Überstand der Klone aus der Kavität 1E7 mit frischen Knochenmarkzellen (a, b) und Überstand des Klons 1E7F12 mit einen Tag adhärenen Knochenmarkzellen (c, d). Die Diagramme des Forward-Sideward- Scatter (a, c) zeigen die positiven Zellpopulationen unter dem Gate R2 im Histogramm (b, d). Im Histogramm (b, d) ist die Prozentzahl der positiven Zellen angegeben.

### **4.3.2 Klone aus der Kavität 4H11 und Klon 4H11D11**

Der Klon 4H11D11 ist sowohl im FACS (Abb. 10) positiv als auch in den immunhistologischen Untersuchungen. Bei den frischen Knochenmarkzellen reagieren knapp über 8% der Zellen mit dem Überstand aus der Kavität 4H11, während bei den adhärennten Zellen fast 65% mit dem Antikörper 4H11D11 reagieren. Im FSC/SSC des Klons 4H11D11 sind vermehrt die kleineren Zellen gefärbt.

In den Knochenschnitten (ohne Abb.) sind zahlreiche Zellen im Knochenmark schwach gefärbt. Die Megakaryozyten sind nicht gefärbt. Ähnliche Ergebnisse ergaben auch die Untersuchungen des Klons 4H11E9.

## Klone aus der Kavität **4H11**



## Klon **4H11D11**

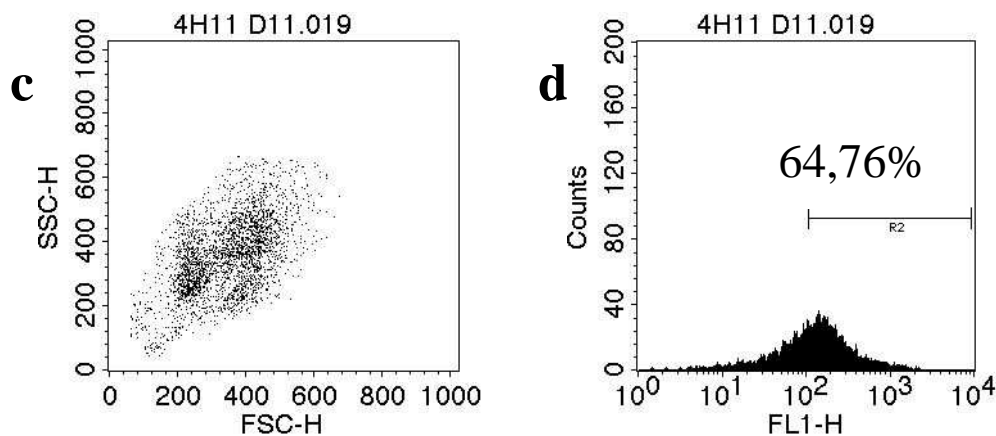


Abb. 10: Überstand der Klone aus der Kavität 4H11 mit frischen Knochenmarkzellen (a, b) und Überstand des Klons 4H11D11 mit einen Tag adhärennten Knochenmarkzellen (c, d). Die Diagramme des Forward-Sideward- Scatter (a, c) zeigen die positiven Zellpopulationen unter dem Gate R2 im Histogramm (b, d). Im Histogramm (b, d) ist die Prozentzahl der positiven Zellen angegeben.

### 4.3.3 Klone aus der Kavität 6F8 und Klon 6F8E12

Der Klon 6F8E12 ist im FACS (Abb. 11) positiv. Der Überstand aus der Kavität 6F8 reagiert mit ca. 45% der Zellen bei den frischen Knochenmarkzellen und der Antikörper 6F8E12 reagiert mit ca. 88% bei den adhärennten Zellen. Im FSC/SSC der adhärennten Zellen fällt auf, dass die kleineren, wenig granulierten Zellen vermehrt gefärbt werden.

Die immunhistologischen Untersuchungen ergaben ebenfalls positive Ergebnisse. Zellen im Knochenmark, Osteoblasten und hypertrophe Chondrozyten stellen sich positiv dar, während die Osteozyten und Fibroblasten als negativ bewertet wurden (Abb. 11.1). Die Ergebnisse der Organschnitte sind vergleichbar mit dem Klon 6B10B6 (siehe Klon 6B10B6).

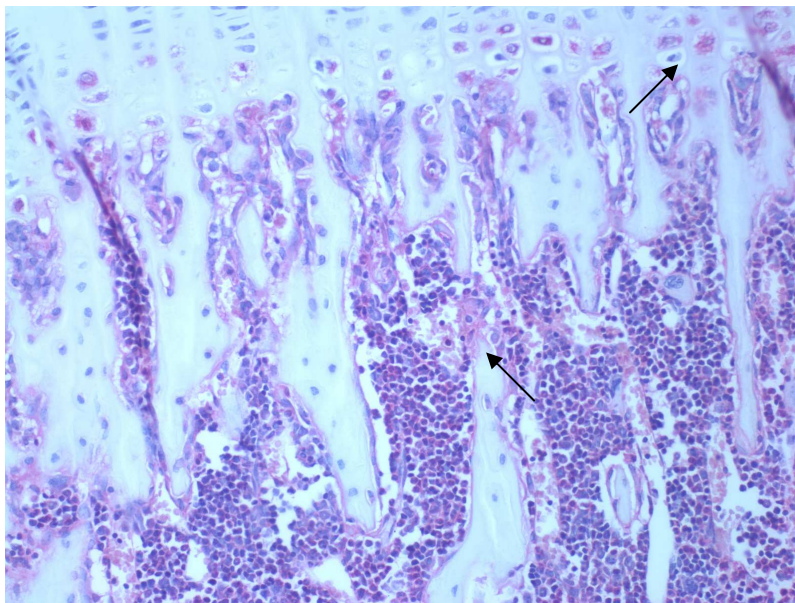


Abb. 11.1

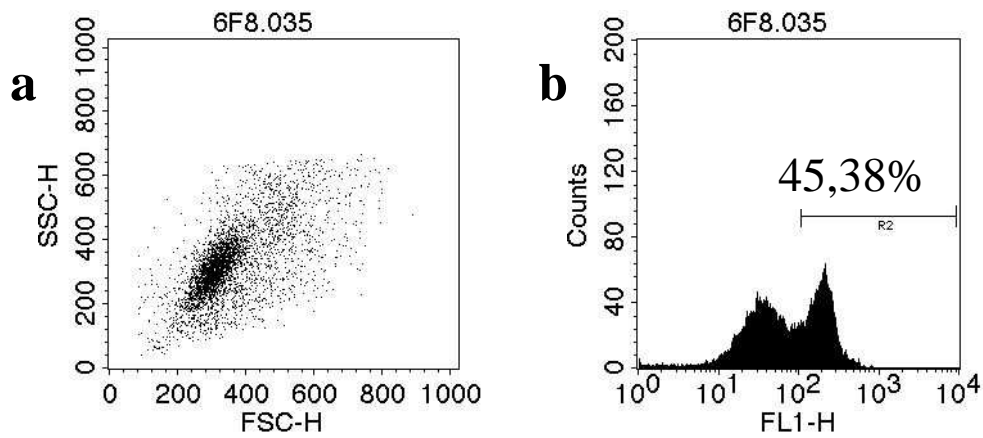
Klon 6F8E12 auf einem  
Knochenschnitt;

Vergrößerung: 100x

Färbung mit Fast Red

Gegenfärbung mit Hämalaun

## Klone aus der Kavität **6F8**



## Klon **6F8E12**

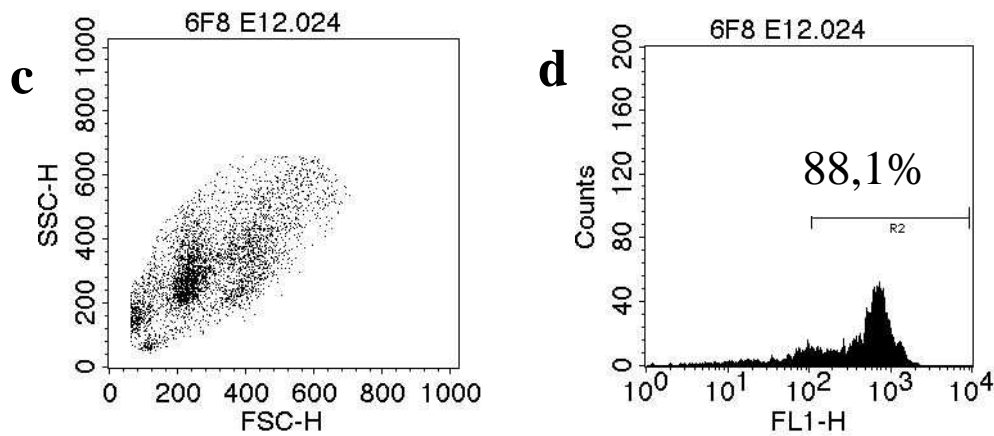


Abb. 11: Überstand der Klone aus der Kavität 6F8 mit frischen Knochenmarkzellen (a, b) und Überstand des Klons 6F8E12 mit einen Tag adhärenen Knochenmarkzellen (c, d). Die Diagramme des Forward-Sideward- Scatter (a, c) zeigen die positiven Zellpopulationen unter dem Gate R2 im Histogramm (b, d). Im Histogramm (b, d) ist die Prozentzahl der positiven Zellen angegeben.

#### 4.3.4 Klon 6B10B6

Der Klon 6B10B6 ist im FACS (Abb. 12) als positiv beurteilt worden. Auch die immunhistologischen Untersuchungen zeigten positive Zellen. Bei den adhärennten Knochenmarkzellen reagieren knapp 11% der Zellen mit dem Antikörper 6B10B6. Im FSC/SSC werden kleine, wenig granulierte Zellen gefärbt.

Im Knochenschnitt sind Osteoblasten und hypertrophe Chondrozyten sowie Zellen im Knochenmark als positiv zu beurteilen (Abb. 12.1). Die immunhistologischen Untersuchungen auf verschiedenen Organschnitten ergaben überwiegend positive Ergebnisse. So stellen sich im Hautschnitt die Epidermis, die Subcutis, die Muskeln und das Bindegewebe als positiv dar, die Talgdrüsen sind sogar als stark positiv zu bewerten (Abb. 12.2). In der Nebenschilddrüse sind die Hauptzellen stark gefärbt und in der Schilddrüse wird nur das Stroma gefärbt (Abb. 12.3). Das endokrine Pankreas ist, im Gegensatz zum exokrinen Pankreas, positiv (Abb. 12.4). Die im Folgenden beschriebenen Organe sind ohne Abbildung. Im Darm sind neben dem Zottenstroma die Muskelschicht und die submucösen Drüsen als positiv zu beurteilen und im Muskelschnitt sind positive Myozyten zu sehen. Die Hepatozyten und das Gefäßendothel stellen sich positiv dar, während das Gallengangsepithel negative Ergebnisse zeigt. In der Niere sind die Tubuli und die Sammelrohre positiv und die Glomerula lassen sich nicht färben. In der Milz ist zu beobachten, dass sowohl die rote als auch die weiße Milzpulpa positiv sind. Das Bronchusepithel, die Alveolen und auch das Gefäßendothel in der Lunge stellen sich positiv dar, während die Cardiomyozyten und auch das Endothel im Herz ebenfalls positiv sind.

Ähnliche Ergebnisse ergaben die Untersuchungen der Klone 6B10B10 und 6B10H8.

## Klon 6B10B6

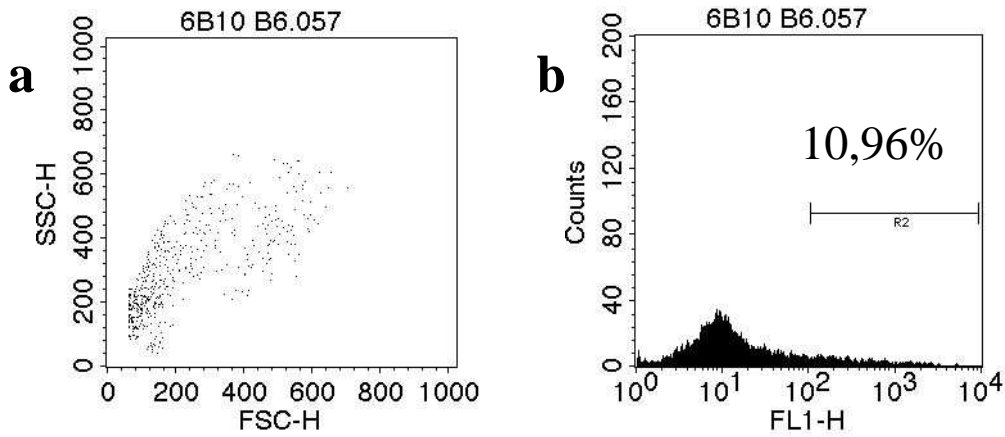


Abb. 12: Überstand des Klons 6B10B6 mit einen Tag adhärennten Knochenmarkzellen (a, b). Das Diagramm des Forward-Sideward- Scatter (a) zeigt die positive Zellpopulation unter dem Gate R2 im Histogramm (b).

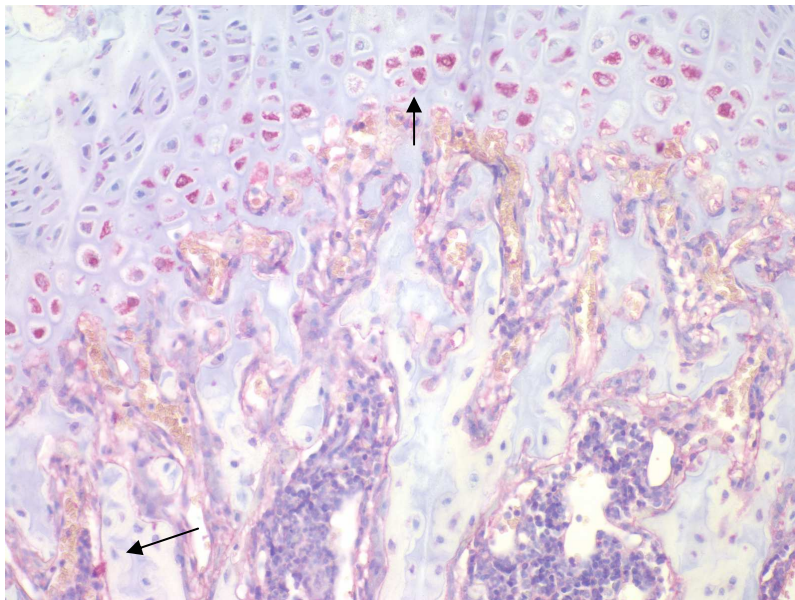


Abb. 12.1

Klon 6B10B6 auf einem  
Knochenschnitt;

Vergrößerung: 200x

Färbung mit Fast Red

Gegenfärbung mit Hämalaun

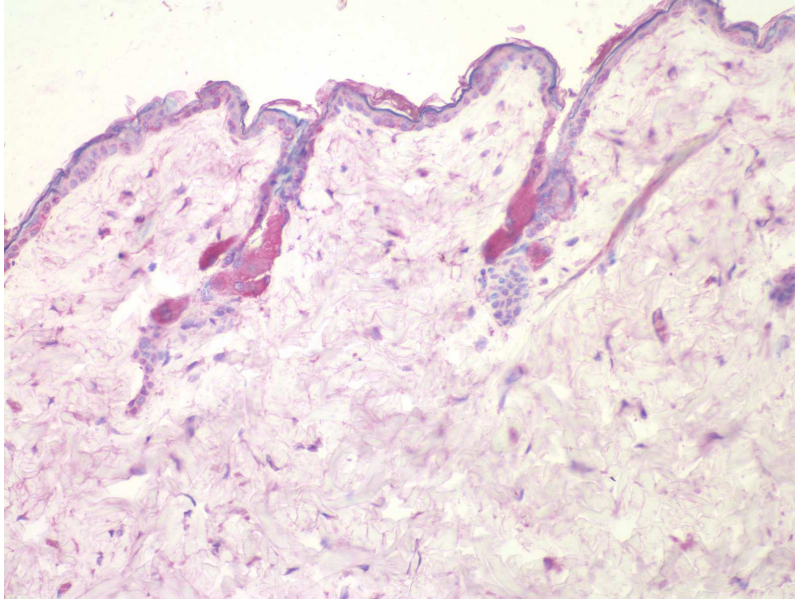


Abb. 12.2

Klon 6B10B6 auf einem  
Hautschnitt;

Vergrößerung: 200x

Färbung mit Fast Red

Gegenfärbung mit Hämalaun

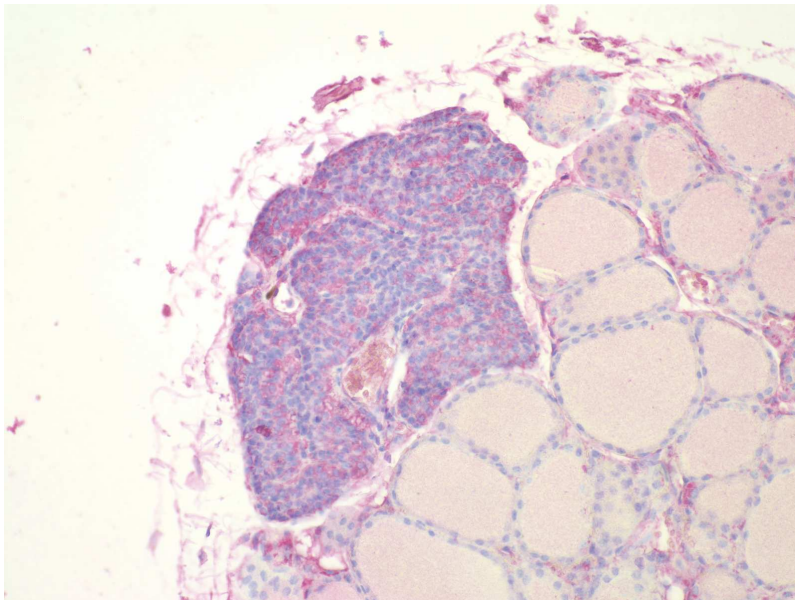


Abb. 12.3

Klon 6B10B6 auf einem  
Schilddrüsen/  
Nebenschilddrüsenchnitt

Vergrößerung: 200x

Färbung mit Fast Red

Gegenfärbung mit Hämalaun

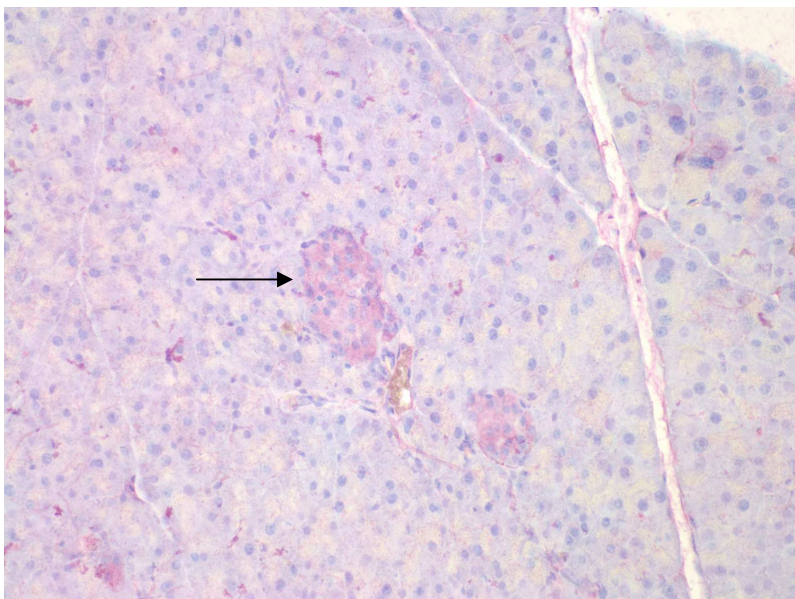


Abb. 12.4

Klon 6B10B6 auf einem  
Pankreasschnitt

Vergrößerung: 200x

Färbung mit Fast Red

Gegenfärbung mit Hämalaun



### 4.3.5 Klon 6B10H8

Der Klon 6B10H8 ist sowohl im FACS (Abb. 13) positiv als auch bei den immunhistologischen Untersuchungen. Bei den adhärennten Knochenmarkzellen reagieren fast 25% der Zellen mit dem Antikörper 6B10H8. Im FSC/SSC werden überwiegend kleine, wenig granulierte Zellen gefärbt. Die immunhistologischen Untersuchungen sind auf den Knochenschnitten und auf den verschiedenen Organschnitten vergleichbar mit dem Klon 6B10B6.

### Klon 6B10H8

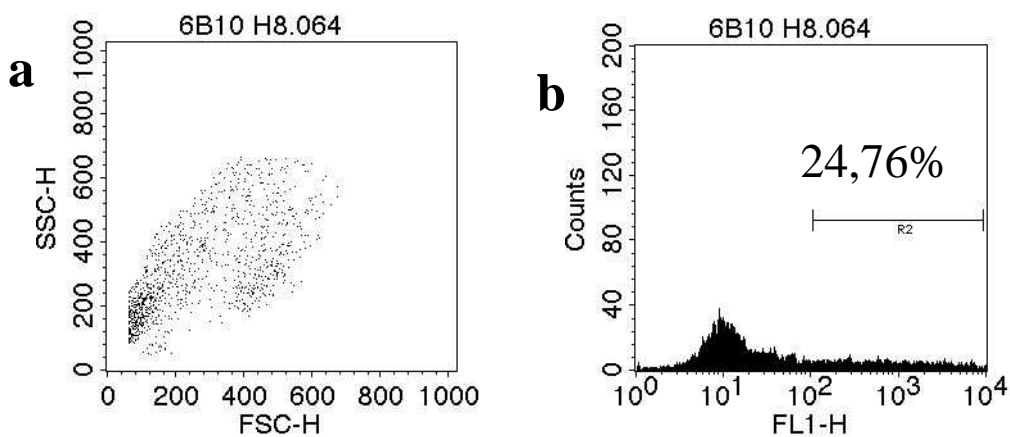


Abb. 13: Überstand des Klons 6B10H8 mit einen Tag adhärennten Knochenmarkzellen (a, b). Das Diagramm des Forward-Sideward- Scatter (a) zeigt die positive Zellpopulation unter dem Gate R2 im Histogramm (b). Im Histogramm (b) ist die Prozentzahl der positiven Zellen angegeben.

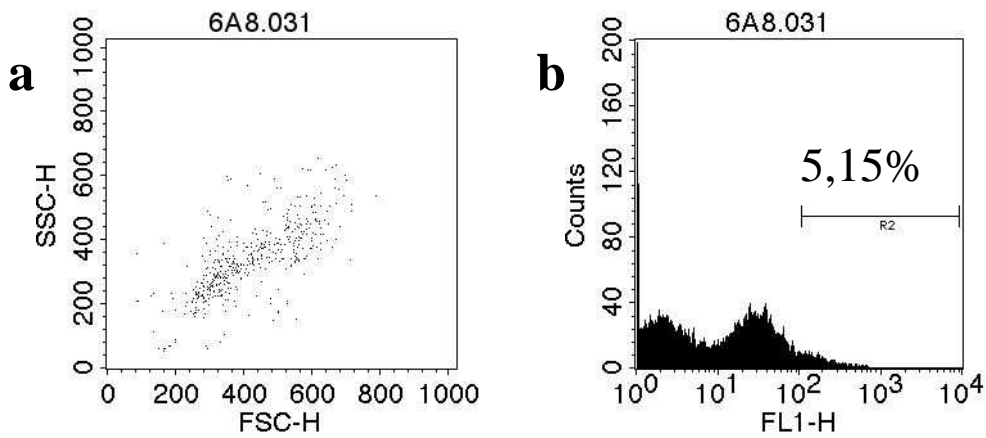
### **4.3.6 Klone aus der Kavität 6A8 und Klon 6A8C8**

Der Klon 6A8C8 ist im FACS (Abb. 14) positiv. Auch die immunhistologischen Untersuchungen zeigen positive Ergebnisse. Bei den frischen Knochenmarkzellen reagieren 5,15% der Zellen des Überstandes aus der Kavität 6A8 positiv und bei den adhärennten Knochenmarkzellen reagieren ca. 43% der Zellen des Überstandes 6A8C8 positiv. Im FSC/SSC der adhärennten Zellen werden überwiegend kleine, wenig granulierte Zellen gefärbt.

Die immunhistologische Untersuchung zeigt, dass sich im Knochenmark vereinzelt Zellen befinden, die positiv bis stark positiv sind, während die Osteoblasten, Osteozyten, Fibroblasten und Chondrozyten negativ sind (Abb. 14.1). Die Immunhistologie von den verschiedenen Organen zeigte, dass die Schnitte von Pankreas, Haut, Muskel, Leber, Niere, Herz und Darm negativ sind (ohne Abb.). Nur in der Milz sind vereinzelt positive Zellen in den Lymphfollikeln zu sehen und in der Lunge sind nur einzelne Alveolarmakrophagen gefärbt (Abb. 14.2 und Abb. 14.3).

Im Western Blot zeigt der Klon eine spezifische Bande (siehe Abschnitt 4.5 Western Blot).

## Klone aus der Kavität **6A8**



## Klon **6A8C8**

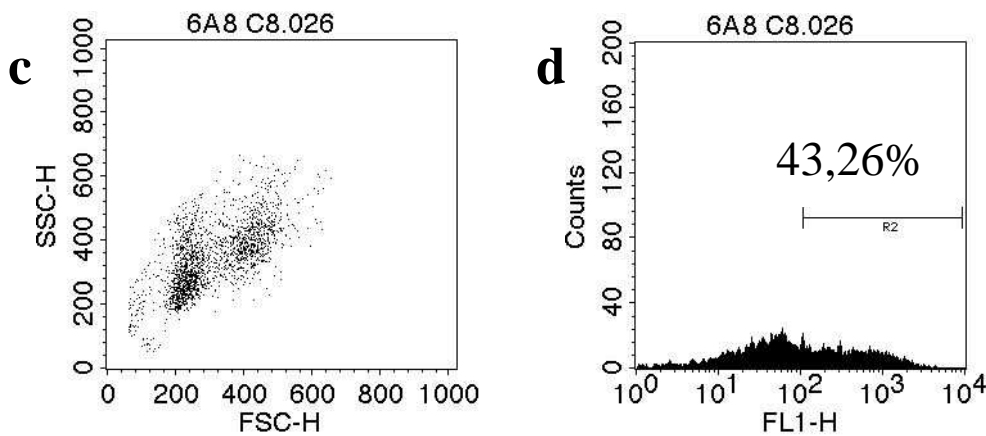


Abb. 14: Überstand der Klone aus der Kavität 6A8 mit frischen Knochenmarkzellen (a, b) und Überstand des Klons 6A8C8 mit einen Tag adhärennten Knochenmarkzellen (c, d). Die Diagramme des Forward-Sideward- Scatter (a, c) zeigen die positiven Zellpopulationen unter dem Gate R2 im Histogramm (b, d). Im Histogramm (b, d) ist die Prozentzahl der positiven Zellen angegeben.

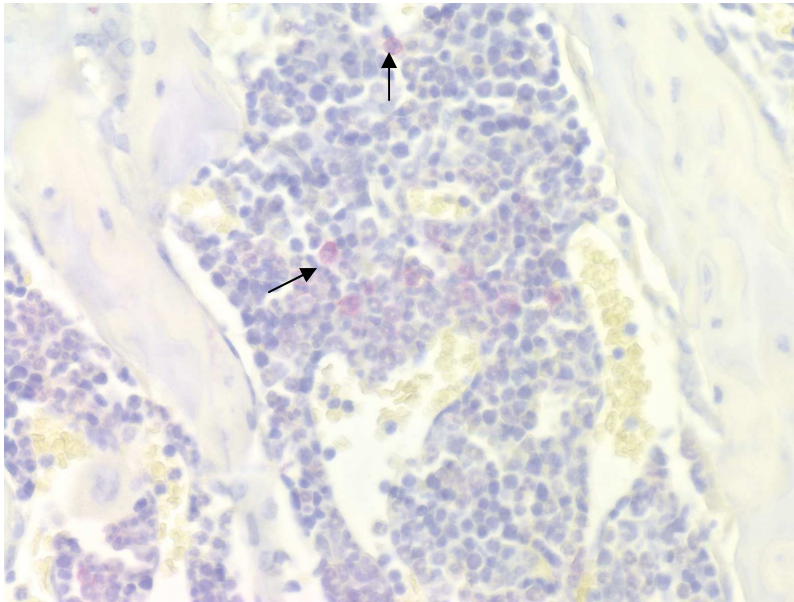


Abb. 14.1

Klon 6A8C8 auf einem  
Knochenschnitt

Vergrößerung: 400x

Färbung mit Fast Red

Gegenfärbung mit Hämalaun

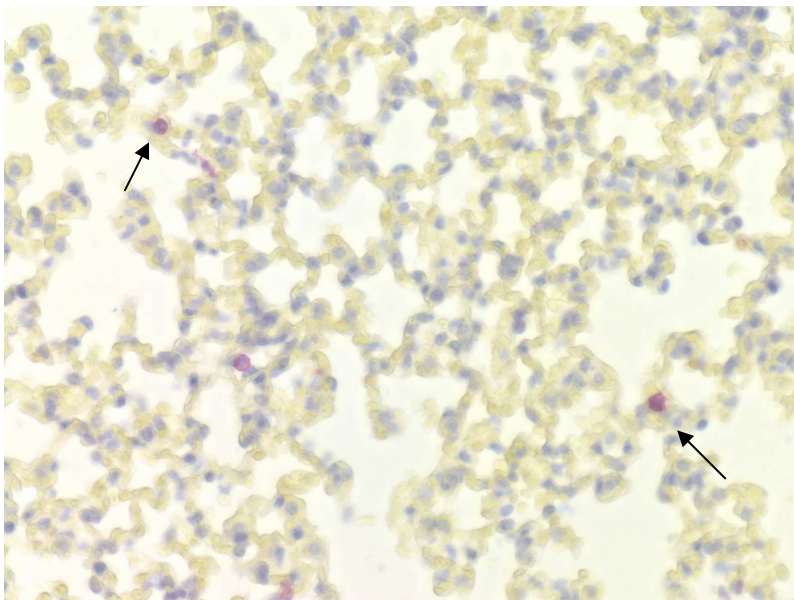


Abb. 14.2

Klon 6A8C8 auf einem  
Lungenschnitt

Vergrößerung: 400x

Färbung mit Fast Red

Gegenfärbung mit Hämalaun

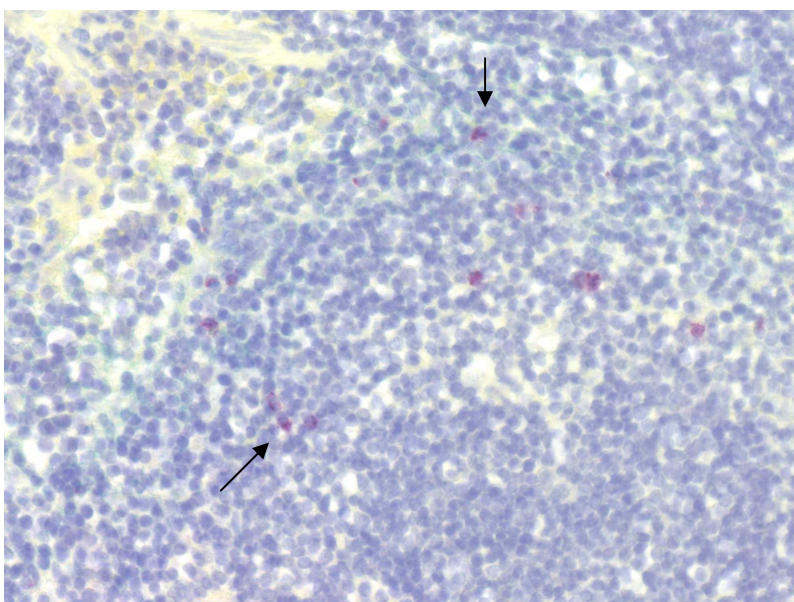


Abb. 14.3

Klon 6A8C8 auf einem Milzschnitt

Vergrößerung: 400x

Färbung mit Fast Red

Gegenfärbung mit Hämalaun

#### 4.4 Affinitätschromatographie

Insgesamt wurde Protein von sechs Maus-Klonen aufgereinigt und im Anschluss im Photometer gemessen.

Tabelle 6: Konzentrationen der aufgereinigten Proteine

<b>Klone Maus s. c.</b>	<b>Proteinkonzentration in mg/ml</b>
1F12F10	0,280
3C2B7	0,111
3D10F8	0,074
3G3G12	0,077
3H10A12	0,065
5C12B12	0,069

#### 4.5 Western Blot

Für den Western Blot wurden sowohl aufgereinigte Antikörper als auch Zellkulturüberstände verwendet. Insgesamt wurden sechs Maus-Klone und drei Ratten-Klone getestet, wobei jeweils einer aus beiden Gruppen im Western Blot ein positives Signal zeigte. Die Klone wurden mit frischen Knochenmarkzellen und mit einen Tag adhärennten Knochemarkzellen getestet.

Die unspezifischen Reaktionen des zweiten Antikörpers im Western Blot kommen durch Kreuzreaktionen des anti-Ratte-IgG mit Maus-Protein bzw. anti-Maus-IgG mit Ratten-Protein zustande, weil diese zwei Systeme sich sehr ähnlich sind. Dadurch ist die Spezifität bei dem Western Blot nicht so hoch. Viele unspezifische Banden sind bei den einzelnen Klonen zu sehen.

Der Maus-Klon 3H10A12 (Zellkulturüberstand) zeigt eine spezifische Bande bei ca. 30 kDa sowie mehrere unspezifische Banden. Bei den anderen getesteten Klonen sowie in der Negativ-Kontrolle nur mit dem zweiten Antikörper sind die unspezifischen Banden zu sehen, die durch Kreuzreaktionen des Gewebes mit dem zweiten Antikörper zustande kommen (Abb. 15). Der Maus-Klon 3H10A12 wurde auch auf Lungen-, Milz-, Leber- und Nierengewebe

getestet. Bei diesen Geweben findet sich ebenfalls ein deutliches Signal bei 30 kDa sowie mehrere unspezifische Banden, die auch bei dem im Vergleich getesteten negativen Klon 3D10F8 sichtbar werden (Abb. 16).

Die Ratten-Klone 6A8C8, 6B10B6 und 6F8E12 (Zellkulturüberstand) wurden mit frischen Mausknochenmarkzellen und mit einem Tag adhärenthem Knochenmarkzellen getestet. Dabei zeigte nur der Klon 6A8C8 eine spezifische Bande bei 98 kDa. Hier sind die anderen zu sehenden Banden ebenfalls unspezifisch. Die Klone 6B10B6 und 6F8E12 sowie eine Negativ-Kontrolle ohne ersten Antikörper wiesen nur einige unspezifische Banden auf, die auch hier durch Kreuzreaktionen des zweiten Antikörpers zustande kommen (Abb. 17).

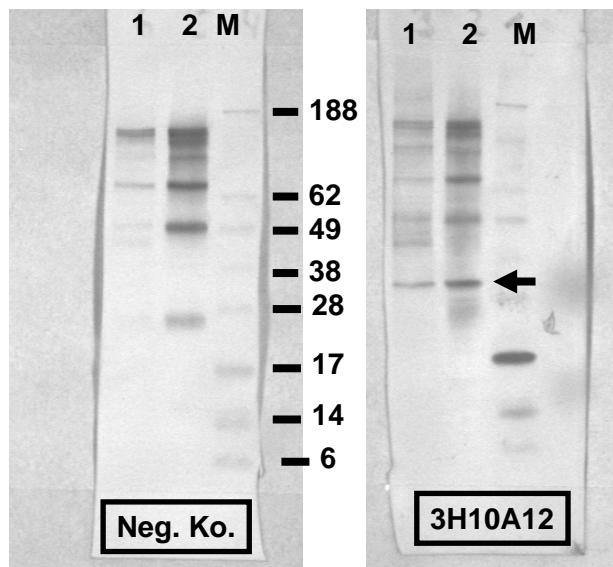


Abb. 15: Western Blot mit Gesamt-Protein von frischen Knochenmarkzellen (Bahn 1) und einen Tag adhärenthem Knochenmarkzellen (Bahn 2)  
Negativ-Kontrolle: RPMI-Medium mit FCS  
Bahn 1: frische Knochenmarkzellen; Bahn 2: ein Tag adhärenthem Knochenmarkzellen; M=Marker  
Spezifische Reaktion bei ca. 30 kDa (Pfeil)

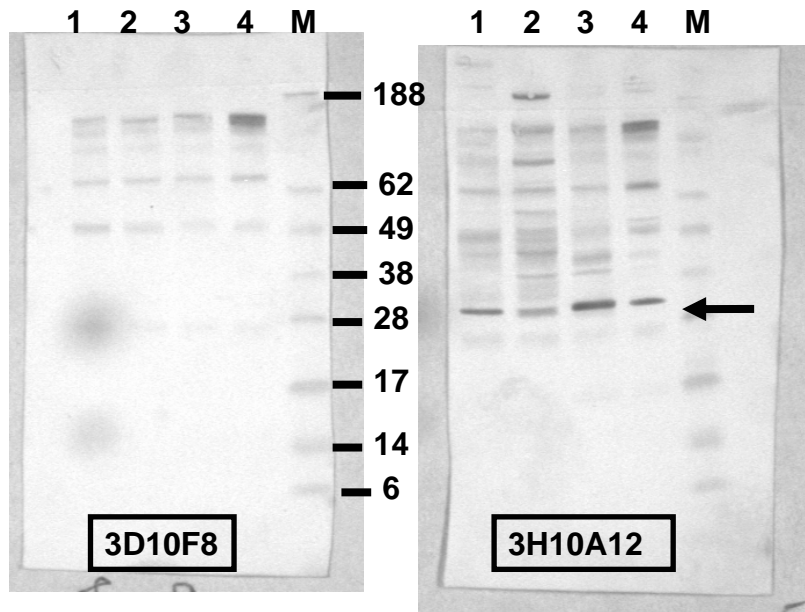


Abb. 16: Western Blot mit Gesamt-Protein verschiedener Organe  
 Bahn 1: Niere; Bahn 2: Leber; Bahn 3: Milz; Bahn 4: Lunge;  
 M=Marker  
 Spezifische Bande in allen getesteten Organen bei ca. 30 kDa

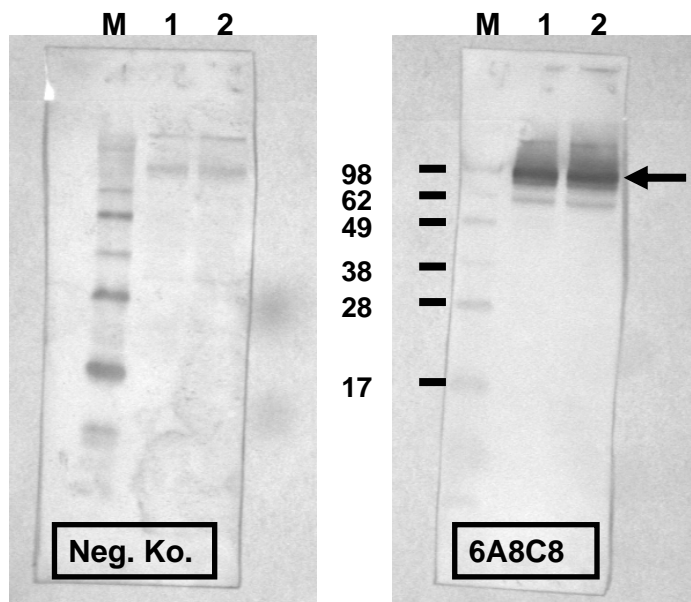


Abb. 17: Western Blot mit Gesamt-Protein von frischen Knochenmarkzellen (Bahn 1) und einen Tag adhärennten Knochenmarkzellen (Bahn 2)  
 Negativ-Kontrolle: RPMI-Medium mit FCS  
 Bahn 1: frische Knochenmarkzellen; Bahn 2: ein Tag adhärennte Knochenmarkzellen; M=Marker  
 Spezifische Bande bei ca. 98 kDa (Pfeil)

## 4.6 Oberflächenbiotinylierung und Immunpräzipitation

Die Technik der Oberflächenbiotinylierung und anschließender Immunpräzipitation wurde gewählt, um die starken Kreuzreaktionen, die sich im Western Blot durch viele unspezifische Banden äußern, zu umgehen. Der zweite Antikörper bei der Oberflächenbiotinylierung ist gegen das Biotin gerichtet. Dieses Prinzip umgeht also damit die Kreuzreaktionen zwischen Maus-Proteinen mit anti-Ratten-Antikörpern und Ratten-Proteinen mit anti-Maus-Antikörpern und ist somit wesentlich spezifischer. Außerdem werden durch die Oberflächenbiotinylierung gezielt Zellmembranproteine markiert. Bei dem Western Blot kann der Antikörper sowohl mit Oberflächenproteinen als auch mit intrazellulären Proteinen reagieren.

Der Ratten-Klon 6A8C8 wurde mit frischen Mausknochenmarkzellen getestet. Die spezifische Bande liegt knapp über 98 kDa. Als Negativ-Kontrolle wurde ein Ratten-IgG verwendet, der bei Mausknochenmarkzellen keine Bindungsstellen finden sollte. Wir verwendeten dazu einen anti-BrdU Ratten-IgG (Abb. 18). Vergleicht man die Bahn der Negativ-Kontrolle mit der des Klons, sieht man zwei unspezifische Banden, die beide größer sind als die spezifische Bande (188 kDa und größer).

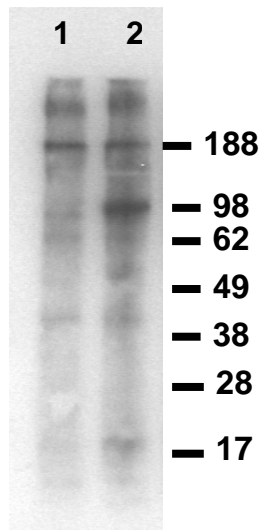


Abb. 18: Immunpräzipitation von biotinylierten Oberflächenproteinen von Mausknochenmarkzellen  
Bahn 1: Negativ-Kontrolle (anti-BrdU)  
Bahn 2: 6A8C8  
Spezifische Bande bei ca. 98 kDa



## 5 Diskussion

### 5.1 Einleitung

Knochenmarkstromazellen werden seit fast 30 Jahren durch selektive Anheftung an die Plastikoberfläche von Zellkulturgefäßen gewonnen und sind in vielfältigen Studien untersucht worden. Ihr tatsächlicher *in vivo* Phänotyp ist jedoch nicht bekannt. Die Erzeugung monoklonaler Antikörper gegen Zellen des Stromazell-Systems erfolgte mit dem Ziel, über ihre molekularen Charakteristika Hinweise auf den *in vivo* Phänotyp der Knochenmarkstromazellen zu erhalten.

Im Allgemeinen bestehen momentan die Forschungsstrategien darin, mesenchymale Stammzellen durch geeignete Maßnahmen aus dem isolierten Knochenmark zu gewinnen und nachfolgend z.B. mit Hilfe der Durchflußzytometrie zu untersuchen [BADDOO et al., 2003; MEIRELLES und NARDI, 2003]. Andere Studien berichten über das Differenzierungspotential mesenchymaler Stammzellen [ALLAN et al., 2003; TROPEL et al., 2004], oder über Therapieversuche in Tiermodellen, z. B. über die intravenöse Verabreichung von mesenchymalen Stammzellen bei Ratten mit myocardialem Infarkt [NAGAYA et al., 2004]. In dieser Arbeit aber bestand die Idee darin, Stromazellen aus dem Knochenmark von Mäusen und Ratten zu gewinnen, die nachfolgend zur Immunisierung anderer Ratten und Mäuse eingesetzt werden, um monoklonale Antikörper gegen die Zellen des Stromazell-Systems herzustellen und diese zu charakterisieren.

Im Folgenden werden die beschriebenen Ergebnisse mit Ergebnissen anderer Studien verglichen. Für die Immunisierung der Ratten wurde Knochenmark von der Maus verwendet und umgekehrt wurde für die Immunisierung der Mäuse Rattenknochenmark verwendet. Das Knochenmark wurde wie im Abschnitt 3.2 kultiviert und wir ließen die Zellen über Nacht adhären. Adhärenz gegenüber Plastikoberflächen ist ein Hauptcharakteristikum mesenchymaler Stammzellen. Nicht-hämatopoetische Stammzellen des Knochenmarkstromas wurden zuerst von Alexander Friedenstein als adhärente, koloniebildende, fibroblastähnliche Zellen beschrieben („colony-forming units fibroblasts“=CFU-F), die in der Lage sind, sich spontan in Knochen- und Knorpelzellen zu differenzieren. In weiteren Arbeiten konnten FRIEDENSTEIN et al. (1968, 1970, 1974) zeigen, dass ein Tag adhärente Zellen typische Charakteristika mesenchymaler Stammzellen aufweisen.

Die Tierarten Maus und Ratte sind nah verwandte Nagetiere und die wohl am häufigsten verwendeten Modelltiere für wissenschaftliche Studien. In dieser Arbeit wurden beide Tierarten verwendet, um die Ergebnisse bezüglich Ähnlichkeit in der Morphologie und Epitop-Verteilung vergleichen zu können.

## 5.2 Untersuchungsmethoden

Im Vergleich zu bisherigen Methoden, fällt auf, dass im Allgemeinen die isolierten Knochenmarkstammzellen wesentlich länger kultiviert wurden. Die Kultivierungszeit betrug bis zu vier Wochen [TROPEL et al., 2004; PEISTER et al., 2004; MEIRELLES und NARDI, 2003]. Unter anderem wurde unter Zugabe von verschiedenen Chemikalien bzw. Pharmaka versucht, die isolierten Knochenmarkstammzellen in eine bestimmte Differenzierungsrichtung zu lenken [TROPEL et al., 2004; PEISTER et al., 2004]. Die Langzeit-Kultivierung von Zellen kann außerdem die Expression von Oberflächen-Markern verändern, weshalb uns die Immunisierung mit Zellen aus einer Kurzzeit-Kultur (ein Tag adhärenente Zellen) als geeignet erschien, die Charakteristika primärer Stammzellen darzustellen. Um die Expression von Zelloberflächenantigenen zu untersuchen, wurden FACS-Analysen der Klon-Überstände durchgeführt. Im FSC/SSC wird die Größe und die Granularität der Zellen beurteilt. Für mesenchymale Stammzellen ist es charakteristisch, klein und wenig granuliert zu sein. Die Klone wurden jeweils mit frischen Knochenmarkzellen und mit einem Tag adhärenente Knochenmarkzellen getestet. Da die Tiere mit adhärenente Zellen immunisiert worden sind, wurden die Klone auch mit einen Tag adhärenente Knochenmarkzellen getestet.

Betrachtet man die Ergebnisse der FACS-Analyse, fällt auf, dass im Allgemeinen die positiven Zellen im frischen Knochenmark um ein Vielfaches geringer ausfallen als im adhärenente Knochenmark. Vergleicht man die Klone, die mit frischen Knochenmarkzellen und mit einen Tag adhärenente Knochenmarkzellen getestet wurden, jeweils miteinander, nimmt die Zahl an positiven Zellen bei den adhärenente Knochenmarkzellen um das 4 bis 10fache zu. Bei den Klonen, die mit frischen Knochenmarkzellen getestet wurden und ihrem jeweils dazugehörigen Subklon, der mit einen Tag adhärenente Knochenmarkzellen getestet wurde, nimmt die Zahl der positiven Zellen zwischen dem 2fachen bis sogar 17fachen zu. Das heißt, dass die Zellen, die im frischen Knochenmark erkannt wurden, teilweise nur sehr selten vorhanden sind.

Vergleicht man die Morphologie der Knochenmarkzellen, die von den jeweiligen Überständen markiert wurden, fällt auf, dass bei den 14 beschriebenen Klonen, die mit adhärennten Knochenmarkzellen getestet wurden, die Anzahl der kleinen, wenig granulierten Zellen bei 7 Klonen zunimmt. 5 Klone zeigen, dass vermehrt größere, stärker granulierte Zellen bei den adhärennten Knochenmarkzellen gefärbt werden und 2 Klone zeigen eine Färbung von sowohl kleineren, wenig granulierten Zellen als auch eine Färbung von größeren, stärker granulierten Zellen.

Aussagen bezüglich der Größe und Granularität der Zellen lässt die FACS-Analyse zu, nicht aber Aussagen über die genaue Zuordnung der positiven Zellen zu bestimmten Zellpopulationen, da keine Lineage-spezifischen Antikörper zusammen mit den Zellkulturüberständen verwendet wurden. Das FACS-Screening wurde hier nur verwendet, um einen Überblick über die Anzahl an positiven Zellen zu bekommen, im Gegensatz zu der Studie von PEISTER et al. (2004). Sie führten eine Studie mit fünf verschiedenen Maus-Inzuchtstämmen durch (C57Bl/6J, BALB/c, FVB/N, DBA1 und C57Bl/6-GFPtg), um u. a. zu testen, welche Epitope die isolierten mesenchymalen Stammzellen nach mehrwöchiger Kultivierung exprimieren. Ihre Ergebnisse zeigen, dass die Epitop-Verteilung unter den verschiedenen Mausstämmen sehr variiert. Sie unterscheiden sich in der CD34-Expression und auch in der Sca-1-Expression sowie in der CD106-Expression. Die einzige Gemeinsamkeit, die die mesenchymalen Stammzellen der fünf verschiedenen Stämme aufweisen, ist, dass sie alle negativ auf den hämatopoetischen Marker CD45 sind [PEISTER et al., 2004]. Diese Studie zeigt deutlich, dass Aussagen bezüglich der Epitop-Verteilung auf mesenchymalen Stammzellen sehr schwierig sind. Einen mesenchymalen Stammzellenspezifischen Marker oder ein definiertes Markermuster gibt es derzeit noch nicht. Trotzdem scheint eine Kombination monoklonaler Antikörper gegen Oberflächenmarker mesenchymaler Stammzellen (z.B. Stro-1, SH2, SH3, SH4) [GRONTHOS et al., 1994; HAYNESWORTH et al., 1992], die *in vitro* gezüchtet wurden, eine Immunophänotypisierung in Zukunft möglich zu machen.

Die immunhistochemische Untersuchung der adhärennten Knochenmarkzellen in Zellkulturplatten wurde durchgeführt, um einen Überblick zu bekommen, wie viele Klone positiv reagieren. Dieses Screening soll Aufschluss über die Häufigkeit der Zellen geben, die das Antigen exprimieren. 9 der 12 untersuchten Klone der *s. c.* immunisierten Ratten stellen sich in der Immunhistochemie als positiv dar, bei den *i. p.* immunisierten Ratten sind es 7 Klone von 15 untersuchten Klonen. 64 Klone der *s. c.* immunisierten Maus wurden in der

Immunhistochemie auf Platten untersucht, wobei 32 Klone als positiv bewertet werden konnten. Die positiven Klone wurden anschließend durch eine Immunhistologie auf Knochenschnitten näher untersucht. Dabei kam heraus, dass von 9 positiven Klonen (s. c. immunisierte Ratte) der Immunhistochemie auf Platten nur 5 Klone in der Immunhistologie auf Knochenschnitten positiv sind. Die i. p. immunisierten Ratten wiesen 7 positive Klone in der Immunhistochemie auf Platten auf, wovon 4 Klone auch in der Immunhistologie auf Knochenschnitten positiv ausfielen. 32 Klone der s. c. immunisierten Mäuse sind in der Immunhistochemie auf Platten positiv. Knapp die Hälfte der Klone (15) ist ebenfalls in der Immunhistologie auf Knochenschnitten positiv.

Die Anzahl der positiven Klone in der Immunhistologie nimmt bei allen Tieren ab. Der Verlust von erkennbaren Epitopen in der Immunhistologie lässt sich durch die Paraffineinbettung erklären. Die adhärennten Zellen in der Immunhistochemie auf Platten wurden lediglich mit Ethanol fixiert, was die Membranproteine weniger stark verändert als die Formalinfixierung mit anschließender Einbettung in 65°C heißem Paraffin.

### 5.3 Klon 1F12F10

Der Klon 1F12F10 zeigt in der FACS-Analyse (Abb. 6), dass sich bei den adhärennten Knochenmarkzellen ca. 6mal mehr positive Zellen im Vergleich zu frischen Knochenmarkzellen befinden. In der immunhistologischen Untersuchung ist zu sehen, dass positive Zellen im Knochenmark sehr vereinzelt vorkommen (Abb. 6.2). Einige positive Zellen haben Kontakt zum Knochen, sie haften an der Oberfläche von Knochen trabekeln an (Abb. 6.3). Ein ähnliches Ergebnis ist bei dem Klon 5C12B12 zu beobachten (Abb. 8.1). Vergleicht man diese Ergebnisse mit den Ergebnissen von WENG et al. (2000) (siehe Abschnitt 5.8), sind Ähnlichkeiten bezüglich der Epitop-Verteilung im Knochenmark sichtbar.

Außerdem wurden immunhistologische Untersuchungen auf anderen Organschnitten durchgeführt, auf denen ebenfalls das Epitop zu finden ist. Sowohl mesenchymales Gewebe, z. B. die Lymphfollikel in der Milz (Abb. 6.5), wie auch epitheliales Gewebe, z. B. die Nierentubuli (Abb. 6.6) und das Gallengangsepithel (Abb. 6.4), weisen dieses Epitop auf. Das Gefäßendothel der Milz (Abb. 6.5) und auch die endokrinen Zellen der Pankreasinseln (Abb. 6.7) zeigen positive Ergebnisse.

Das Epitop scheint sehr spezifisch für eine kleine Knochenmarkzellpopulation zu sein, wie die Abbildungen 6.2 und 6.3 zeigen. Das Epitop ist aber auch auf anderen Zellen, sowohl mesenchymaler als auch epithelialer Herkunft, auffindbar.

#### **5.4 Klon 3H10A12**

Der Klon 3H10A12 zeigt bei allen Analysemethoden ein weit verbreitetes Epitop. Im FACS (Abb. 7) wird deutlich, dass sich bei den adhärennten Knochenmarkzellen die fast 10fache Menge an positiven Zellen, im Vergleich zu frischen Knochenmarkzellen, befindet.

In der Immunhistologie ist auffällig, dass der Klon bei allen Schnitten ein positives bis stark positives Ergebnis zeigt. Das Epitop ist im Knochen und in allen getesteten Organen auffindbar. Es sind Zellen sowohl mesenchymaler als auch epithelialer Herkunft als positiv bewertet worden. Obwohl der Klon in der Immunhistologie als positiv bis sogar stark positiv bewertet wurde, zeigt er im Western Blot nur eine mäßig starke Bande. Der Klon wurde mit frischen Knochenmarkzellen, mit einen Tag adhärennten Knochenmarkzellen und mit verschiedenen Organextrakten im Western Blot getestet und weist bei allen Geweben eine spezifische Bande bei ca. 30 kDa auf, die, wie oben schon erwähnt, nur mäßig stark ausfällt.

Das von diesem Antikörper erkannte Epitop ist nicht sehr spezifisch für mesenchymale Knochenmarkstammzellen.

#### **5.5 Klon 6F8E12**

Der Überstand der Kavität 6F8 fiel in der FACS-Analyse (Abb. 11) mit frischen Knochenmarkzellen schon auf, da ca. 45% der Zellen positiv waren. Der dazugehörige Klon 6F8E12 weist sogar 88,1% positive Zellen bei den adhärennten Knochenmarkzellen auf. In der FACS-Analyse ist außerdem zu sehen, dass vermehrt kleine, wenig granulierte Zellen gefärbt werden.

In den immunhistologischen Untersuchungen sind viele Zellen sowohl im Knochenschnitt als auch in anderen Organen positiv.

Obwohl die Immunhistologie so ähnlich ausfällt wie die des Klons 6B10B6, handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um ein anderes Epitop, da die FACS-Analysen sehr unterschiedliche Ergebnisse zeigen (vergleiche Abb. 11 und Abb. 12).

## **5.6 Klon 6B10B6 und Klon 6B10H8**

Die beiden Klone stammen aus derselben Kavität einer 96-Lochplatte nach der Fusion und sollen deshalb hier zusammen dargestellt werden. Vergleicht man die FACS-Analysen (Abb. 12 und Abb. 13) miteinander, fällt auf, dass ähnliche Zellen gefärbt werden. Sie unterscheiden sich lediglich in der Zahl an positiven Zellen.

Die immunhistologischen Untersuchungen der Klone 6F8E12, 6B10B6 und 6B10H8 fallen sehr ähnlich aus. Folgend werden die Ergebnisse des Klons 6B10B6 beschrieben.

Im Knochenschnitt und auf den Schnitten der verschiedenen Organe sind sowohl mesenchymale Zellen, z. B. Osteoblasten, Chondrozyten (Abb. 12.1) und Myozyten (Abb. 12.2) sowie die Milz, als auch epitheliale Zellen, z. B. Hepatozyten, Epithelzellen des Gallengangs und die Nierentubuli, als positiv zu bewerten.

Da die Ergebnisse der Klone 6B10B6 und 6B10H8 sowohl in der FACS-Analyse als auch in der Immunhistologie sehr ähnlich ausfallen, wird von beiden Klonen wahrscheinlich das gleiche Epitop erkannt.

## **5.7 Klon 6A8C8**

Der Klon 6A8C8 zeigt in der FACS-Analyse (Abb. 14) der adhärennten Zellen im FSC/SSC, dass eine relativ eng begrenzte Zellpopulation gefärbt wird. Vergleicht man den Überstand aus der Kavität 6A8, der mit frischen Knochenmarkzellen getestet wurde mit dem dazugehörigen Klon 6A8C8, der mit adhärennten Knochenmarkzellen getestet wurde, fällt auf, dass der Klon 6A8C8 das über 8fache an positiven Zellen anfärbt.

In den immunhistologischen Untersuchungen ist das Epitop sowohl in dem Knochenschnitt als auch in den verschiedenen Organschnitten nur vereinzelt zu sehen. Im Knochenmark (Abb. 14.1) befinden sich nur sehr vereinzelt positive Zellen, vergleichbar mit den Ergebnissen von WENG et al. (2000). Der Antikörper 18D7 weist in einem Knochenschnitt in

der Immunhistologie ebenfalls negative Ergebnisse auf [WENG et al., 2000]. In der Milz (Abb. 14.3) sind ebenfalls nur sehr vereinzelt positive Zellen in den Lymphfollikeln zu sehen, während sich in der Lunge (Abb. 14.2) nur einzelne Alveolarmakrophagen als positiv beurteilen lassen.

Obwohl in der Immunhistologie nur ganz wenige Zellen gefärbt werden, zeigt der Klon im Western Blot (Abb. 17) ein sehr starkes Signal. Die einzelne, spezifische Bande (98 kDa) stellt sich sehr stark dar, das könnte darauf hinweisen, dass der Antikörper eine hohe Bindungsaffinität zu dem Epitop aufweist.

Die Immunpräzipitation wurde durchgeführt, um zu testen, ob das erkannte Protein im Western Blot tatsächlich ein Zellmembranprotein ist. Durch die Biotinylierung wurden gezielt nur Membranproteine markiert. Auch in der Immunpräzipitation (Abb. 18) ist eine einzelne, spezifische Bande bei 98 kDa zu sehen. Das Epitop ist mit großer Sicherheit an der Zelloberfläche exprimiert. In der von WENG et al. (2000) durchgeführten Immunpräzipitation erkennen die monoklonalen Antikörper 18D7 und 91F2 ein Oberflächenantigen, das ein molekulares Gewicht von 130 kDa aufweist und als Prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$ -Rezeptor regulatorisches Protein (FPRP) identifiziert worden ist.

## 5.8 Ergebnisse anderer Studien

WENG et al. (2000) entwickelten zwei monoklonale Antikörper 18D7 und 91F2 durch Immunisierung von Ratten mit einer murinen osteogenen Zelllinie, MN7. Beide Antikörper sind gegen das gleiche Oberflächenantigen von MN7-Zellen gerichtet. Das von den monoklonalen Antikörpern erkannte Oberflächenantigen hat ein molekulares Gewicht von 130 kDa und ist als Prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$ -Rezeptor regulatorisches Protein (FPRP) identifiziert worden. Immunhistochemische Analysen von 17 Tage alten fetalen Maus-Radien ergaben, dass sich die FPRP-Expression auf Zellen in der Knochenhaut beschränkt. In 8 Wochen alten Maus-Tibien reagierte 18D7 mit Knochenmarkzellpopulationen, die sich in der Nähe von Knochen trabekeln aufhalten. Kaum 18D7-positive Zellen wurden im Knochenmark gefunden. Osteoklasten, Osteoblasten, Osteozyten und Chondrozyten fielen in den immunhistologischen Untersuchungen negativ aus [WENG et al., 2000].

Die Ergebnisse der Immunhistologie lassen sich mit den Ergebnissen des Klons 1F12F10 vergleichen, bei dem das erkannte Epitop ebenfalls spezifisch für eine kleine Knochenmarkzellpopulation zu sein scheint. Auch der Klon 6A8C8 lässt sich mit dem Klon

18D7 vergleichen. Der Klon 6A8C8 weist in der immunhistologischen Untersuchung auf einem Knochenschnitt ebenfalls negative Ergebnisse auf. Osteoblasten, Osteozyten, Fibroblasten und Chondrozyten sind als negativ beurteilt worden (Abb. 14.1). Die Immunpräzipitation des Klons 6A8C8 zeigt, dass das erkannte Epitop ein Oberflächenprotein mit einem molekularem Gewicht von 98 kDa ist (Abb. 18).

In einer anderen Studie berichteten Forscher über den monoklonalen Antikörper HOP-26, der ein lysosomales Oberflächen-Glycoprotein, CD63, identifiziert [ZANNETTINO et al., 2003]. In einer früheren Studie berichteten JOYNER et al. (1997) schon über den monoklonalen Antikörper HOP-26 (gegen humane Stromazellen gerichtet). Dieser Antikörper zeigt auf histologischen Knochenschnitten spezifische Reaktionen mit Zellen, die sich in der Knochenhaut und zwischen Knochen trabekeln befinden. HOP-26 reagiert nicht mit Osteoblasten, Adipozyten, fibrösem Gewebe, Haut, Muskel, Blinddarm, Gehirn und Mandeln. HOP-26 identifiziert ein Epitop auf dem CD63-Glycoprotein, das eine wichtige Rolle in der Knochenbildung und Knochenhomöostase spielen könnte [ZANNETTINO et al., 2003].

RAMSHAW et al. (2001) immunisierten BALB/c-Mäuse mit humanen Knochenmarkstromazellen und fusionierten dann Milzzellen, die von den immunisierten Mäusen isoliert wurden, mit der murinen Myelom-Zelllinie NS-1. Der mit Hilfe des FACS identifizierte Antikörper BB9 bindet an ein Oberflächen-Glycoprotein, das von Knochenmarkstromazellen und primitiven hämatopoetischen Vorläuferzellen coexprimiert wird. Das von BB9 identifizierte Epitop befindet sich auf einem 160 kDa-schweren Oberflächen-Glycoprotein. Von besonderem Interesse wäre, ob der Antikörper BB9 an CD34<sup>+</sup>-Zellen mit Stammzell-Aktivität bindet [RAMSHAW et al., 2001].

Interessant sind auch die Ergebnisse von SESHU et al. (2003), die mit den in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnissen der Immunhistologie vergleichbar sind. Die Ergebnisse von SESHU et al. handeln zwar über Genexpressionen, aber diese fallen, genauso wie die Immunhistologie, sehr variabel aus. Die Studie zeigt deutlich, dass es schwierig ist, definierte Angaben über mesenchymale Stammzellen bezüglich ihres Phänotyps zu machen. In dieser Studie wurden Knochenmarkproben von vier gesunden Erwachsenen gewonnen. Die gewonnenen Knochenmarkstammzellen wurden unter Standardbedingungen kultiviert. Diese Zellen wurden nach vier Wochen mit Trypsin behandelt und die Progenitorzellen mit Hilfe eines Percoll-Gradienten aufgereinigt. Die Arbeitsgruppe untersuchte drei Probenansätze. Im



ersten Ansatz wurde die Genexpression in nicht fraktionierten Stromazellen untersucht, im zweiten Ansatz die der aufgereinigten mesenchymalen Progenitorzellen und im dritten Ansatz die Genexpression in einzelnen mesenchymalen Progenitorzellen, die mit Hilfe der „Laser capture microdissection“ gewonnen wurden. Aus den drei Probenansätzen wurde die Gesamt-RNA gewonnen, diese wurde in cDNA umgeschrieben und mit der cDNA wurde eine in vitro Transkription zur Gewinnung von biotinylierter cRNA durchgeführt. Die Genexpression wurde anschließend auf Microarrays untersucht und die Ansätze miteinander verglichen. Sowohl unfraktionierte Zellen als auch aufgereinigte Stromazellen und sogar einzelne mesenchymale Progenitorzellen exprimieren Transkripte, die auch in Osteoblasten, Fibroblasten, Muskel- und Fettzellen exprimiert werden. Gleichzeitig wurden Transkripte gefunden, die charakteristisch für epitheliale, endotheliale und neuronale Zellen sind. Außerdem fanden sich viele Transkripte, die bereits für B-Zell-Progenitorzellen beschrieben wurden. Die kultivierten Knochenmarkstromazellen sind relativ homogen und zeigen einen Phänotyp, der auf ein Multilineage-Differenzierungspotential hinweist. Weiterhin deuten die Ergebnisse darauf hin, dass nicht-hämatopoetische mesenchymale Zellen und hämatopoetische B-Lymphozyten einen gemeinsamen Vorläufer besitzen könnten. Dies ist übereinstimmend mit der Idee, dass Progenitorzellen Gene exprimieren, die charakteristisch für die multiplen Lineage-Wege sind [SESHI et al., 2003]. Die Genexpressionsanalyse zeigt deutlich, dass keine eindeutige Zuordnung der Knochenmarkstromazellen zu einem bestimmten Zelltyp möglich ist, sondern dass die Zellen vielmehr ein breites Potential an Differenzierungsmöglichkeiten besitzen

## 5.9 Ausblick

Mit dem gewählten Versuchsansatz konnten einige Antikörper produziert werden, die adhärenz Knochenmarkzellen in der Maus und auch in der Ratte erkennen. In dieser Arbeit konnten außerdem Aussagen über die Morphologie der positiven Zellen im FSC/SSC gemacht werden und über ihre Verteilung in den untersuchten Organen. Die Immunisierung führte zur Bildung von Antikörpern gegen sehr häufig vorkommende Epitope aber auch zur Bildung von Antikörpern gegen sehr selten vorkommende Epitope. Aussagen über die Struktur der erkannten Epitope bzw. um welche Membranproteine es sich handelt, können durch die Analysen nicht gemacht werden.

Zur genaueren Charakterisierung der erkannten Antigene könnten folgende Ansätze beitragen:

Mit Hilfe einer Immunpräzipitation des Antigens wären Aussagen über Membranproteine möglich. Interessante Antigene könnten nachfolgend durch eine Proteinsequenzierung analysiert und identifiziert werden. Ein anderer Ansatz wäre z. B. die Isolierung von positiven Zellen aus dem Knochenmark über Durchflußzytometrie. Die so identifizierten Zellen können nachfolgend kultiviert werden und durch entsprechende Bedingungen in bestimmte Differenzierungsrichtungen gelenkt werden. Ebenso könnte man aber auch eine spontane Differenzierung der positiven Zellen abwarten. Eine weitere Möglichkeit bestände darin, die Anzahl von mesenchymalen Vorläuferzellen durch die Behandlung der Tiere mit knochenanabolen Pharmaka zu erhöhen. Eine nachfolgende FACS-Analyse würde zeigen, ob sich die Anzahl an positiven Zellen ebenfalls erhöht.

## 6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, monoklonale Antikörper zur Charakterisierung von Stromazellen der Maus und der Ratte herzustellen. Zur Immunisierung wurden Stromazellen aus dem Knochenmark von Maus und Ratte verwendet. Aus drei Zellfusionen konnten 28 interessante Zellkulturüberstände gewonnen werden. Die Zellen aus den positiven Kavitäten wurden nachfolgend subkloniert und erneut getestet.

Die durch die Immunfluoreszenzanalyse als positiv bewerteten Klone wurden nachfolgend immunhistochemisch mit adhärennten Knochenmarkzellen in Zellkulturplatten, auf Knochenschnitten und verschiedenen Organschnitten untersucht. Der Klon 1F12F10 erkennt ein Epitop, das für eine kleine Knochenmarkzellpopulation spezifisch zu sein scheint. Das Epitop ist auch auf anderen Zellen, die mesenchymaler und epithelialer Herkunft sind, auffindbar. Der Klon 3H10A12 erkennt ein Epitop, das nicht sehr spezifisch für mesenchymale Knochenmarkstammzellen ist. Die Klone 6B10B6 und 6B10H8 zeigen ähnliche Ergebnisse und erkennen mit hoher Wahrscheinlichkeit das gleiche Epitop. Der Klon 6A8C8 weist im FACS eine relativ eng begrenzte Zellpopulation auf. In der Immunhistologie sieht man, dass nur wenige Zellen im Knochenmark positiv sind. Durch Western Blot und Immunpräzipitation konnte die Größe eines Ratten- und eines Maus-Oberflächenproteins, das durch die jeweiligen Antikörper erkannt wird, festgestellt werden. Über die Struktur der Epitope, die von den Antikörpern der Klone erkannt werden, können keine weiteren Aussagen gemacht werden.

In dieser Arbeit konnten Aussagen über die Morphologie der positiven Zellen und ihrer Verteilung in den verschiedenen Geweben gemacht werden. Um die Struktur der erkannten Proteine zu identifizieren, wären weitere Versuchsansätze nötig. Durch eine Proteinsequenzierung könnte das Antigen analysiert und identifiziert werden. Positive Zellen aus dem Knochenmark, die mittels Durchflußzytometrie isoliert werden können, könnten in weiteren Versuchen in vitro auf ihre Differenzierungsfähigkeit getestet werden. Weiterhin könnte man mit der Applikation von knochenanabolen Pharmaka in vivo die Anzahl der Stromazellen erhöhen. Die Veränderung der Knochenmark-Zellpopulation sollte dann mit unseren Antikörpern messbar sein.

## 7 Summary

### **Characterization of monoclonal antibodies specific for rat and murine bone marrow stromal cells**

This work was initiated to produce monoclonal antibodies for the characterization of bone marrow stromal stem cells of mouse and rat. For immunisation, we used stromal cells isolated from bone marrow of the mouse and the rat by adhesion to plastic. Three cell fusions yielded 28 supernatants with interesting characteristics. Cells from these cavities were subsequently subcloned and their characteristics reassessed.

The clones analyzed as positive by fluorescence activated cell sorting (FACS) were examined by immunohistochemistry (IHC) on adherent bone marrow cells in cell culture plates and in paraffin sections of bone and several other organs. The clone 1F12F10 recognizes an epitope that seems to be specific for a minor bone marrow cell population. The epitope can also be found on cells of mesenchymal and epithelial origin. The clone 3H10A12 recognizes a common epitope which is not very specific for bone marrow stem cells. The clones 6B10B6 and 6B10H8 show similar results and probably recognize the same epitope. The clone 6A8C8 shows a small positive cell population by FACS, and the distribution of the epitope as analyzed by IHC is restricted to few bone marrow and lung cells. Western Blot and immunoprecipitation revealed the size of one mouse and one rat cell surface epitope which are recognized by our monoclonal antibodies. The structures of the recognized epitopes were not analyzed any further.

In this work the morphology and the fraction of the positive cells in bone marrow and cultivated bone marrow cells and their distribution in different tissues was analyzed. In order to identify the structure of the recognized proteins further experimental approaches would be necessary: Antigen retrieved by immunoprecipitation or Western Blot could be identified by protein sequencing. Positive cells from the bone marrow isolated by FACS could be tested for their potential to differentiate in vitro. Furthermore, in vivo experiments with bone anabolic substances could be done to increase the number of stromal stem cells, and shifts in bone marrow populations should be recognized by our antibodies.

**Abkürzungsverzeichnis**

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
°C	Grad Celsius
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CD	Cluster of differentiation
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
DMEM	Dulbeccocs Modified Eagle`s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FCS	Fetal Calf Serum
FCA	Freund`s Adjuvant Complete
FSC	Forward Scatter
FIA	Freund`s Adjuvant Incomplete
FITC	Fluorescin-Isothiocyanat
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistologie
g	Gramm
GFP	Green Fluorescent Protein
HCl	Salzsäure
H <sub>2</sub> O	Wasser
HRP	Meerrettich-Peroxidase (engl. Horse Reddish Peroxidase)
IGF II	Insulin like Growth Factor II
IL-3	Interleukin 3
i. p.	intra peritoneal
M	Molar
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minuten
ml	Milliliter

---

mm	Millimeter
mAk	monoklonaler Antikörper
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (engl. Phosphate Buffered Saline)
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polyethylenglycol
PFA	Paraformaldehyd
P/S	Penicillin/Streptomycin
rpm	rounds per minute
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SA	Streptavidin
s. c.	subcutan
SSC	Sideward Scatter
TBS	Tris gepufferte Salzlösung (engl. Tris Buffered Saline)
TGF-β	Tissue Growth Factor-β
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween	Polyoxyethylenesorbitan Monolaurate
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter

## Anhang A: Verwendete Materialien und Geräte

### Materialien

Calciumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Chemolumineszenz-Substrat	Pierce, Rockford Illinois, USA
Chloralhydrat	Merck, Darmstadt
Citronensäure	Merck, Darmstadt
Dialysierschlauch VISKING	Roth, Karlsruhe
Dimethyl Sulphoxide (DMSO)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
DMEM	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Elektrophoresekammer (XCell™ Blot Module)	Novex, San Diego, USA
Ethanol (verschieden %tig)	Merck, Darmstadt
FACS-Röhrchen	Miconic Systems, Lelystad, NL
Fast Red Tablets, 2 mg	Kem-En-Tec Diagnostics, Kopenhagen, Dänemark
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Filterpapier	Whatman, Maidstone, GB
96-Flachlochplatten	Nunc GmbH & CoKG, Wiesbaden
Freunds Adjuvant Complete	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Freunds Adjuvant Incomplete	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Glycin	AppliChem, Darmstadt
HAT-Lösung	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt
HT-Lösung	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Kaisers Glyceringelantine	Merck, Darmstadt
Kalialaun	Merck, Darmstadt
Kaninchen anti-Ratte-IgG, biotinyliert	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Kodak Bio Max MR	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
24-Lochplatten	Nunc GmbH & CoKG, Wiesbaden
96-Loch Rundbodenplatte	Nunc GmbH & CoKG, Wiesbaden
Magermilchpulver (Non-Fat dry milk)	Bio-Rad, München

Magnesiumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Mausmyelomzelllinie x 63-Ag 8.653	Dr. J. Wehland, GBF, Braunschweig
Modifizierte Neubauer Zählkammer	Brand GmbH & CoKG, Wertheim
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumjodat	Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat	Merck, Darmstadt
Nitro Pure, Pure Nitrocellulose	Osmonics, Westborough, MA, USA
Normal horse serum 20%	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Normal rabbit serum	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
NuPAGE® 4-12% Bis-Tris Gel	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE MES SDS Running Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE® LDS-Sample Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE® Transfer Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Pferd anti-Maus-IgG, biotinyliert	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Pferd anti-Ratte-IgG, biotinyliert	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Polyethylenglycol (PEG)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Power Ease 500	Novex, San Diego, USA
Protease Inhibitor	Roche Diagnostics, Mannheim
Protein-L-Agarosekügelchen	Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, USA
Protein LA-Agarose	Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, USA
PVDF Western Blotting Membranes	Roche Diagnostics, Mannheim
RIPA-Puffer	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
RPMI 1640	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Salzsäure	AppliChem, Darmstadt
See Blue® Plus 2 Pre-Stained Standard	Invitrogen, Karlsruhe
Streptavidin-HRP	Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, USA
Sulfo-NHS-Biotin	Pierce, Rockford Illinois, USA
Triton X-100	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Trypanblau	AppliChem, Darmstadt
Tween 20	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Vectastain® ABC-AP Kit	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA



Vector® Red, Substrate Kit I	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Western Breeze® Chromogenic Immunodetection System	Invitrogen, Karlsruhe
Xylol	Merck, Darmstadt
Zellkulturflaschen (versch. Größen)	Nunc GmbH & CoKG, Wiesbaden
Zellkulturschalen (versch. Größen)	Corning Incorporated, NY, USA
Zellschaber	Nunc GmbH & CoKG, Wiesbaden
Ziege anti-Maus-IgG, AP-konjugiert	ANAWA Trading SA, Wangen, Schweiz
Ziege anti-Ratte-IgG, AP-konjugiert	ANAWA Trading SA, Wangen, Schweiz
Ziege anti-Maus-IgG, FITC-markiert	ANAWA Trading SA, Wangen, Schweiz
Ziege anti-Ratte-IgG, FITC-markiert	ANAWA Trading SA, Wangen, Schweiz

**Geräte****Brutschrank**CO<sub>2</sub>-Auto-Zero

Heraeus Instruments GmbH, München

Hera cell

Heraeus Instruments GmbH, München

**Fluorescence activated cell scanner**

FACScan

Becton Dickinson, Heidelberg

Software: Cell Quest pro™

Becton Dickinson, Heidelberg

**Mikroskope**

Leica, Bensheim

Zeiss, Deutschland

**Photometer**

Photometer

Eppendorf Köln

Quartz-Küvette

Sigma, USA

**Sterile Werkbank**

Mikroflow

Nunc GmbH &amp; Co KG, Wiesbaden

Hera safe

Heraeus Instruments GmbH, München

**Zentrifugen**

Biofuge Pico

Heraeus Instruments GmbH, München

GS-6KR

Beckman Instruments GmbH, München

Sigma 4K15

Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

## Anhang B: Abbildungen und Tabellen

### Abbildungen

- Abb. 1: FACS-Analyse von dem Klon 2G10A5
- Abb. 2: FACS-Analyse von dem Klon 3C2B7
- Abb. 3: FACS-Analyse von dem Klon 5C10C9
- Abb. 4: FACS-Analyse von dem Klon 3D10F8
- Abb. 5: FACS-Analyse von dem Klon 3G3A11
- Abb. 6: FACS-Analyse von dem Klon 1F12F10
- Abb. 6.1: Immunhistologie auf einem Knochenschnitt: Negativ-Kontrolle
- Abb. 6.2: Klon 1F12F10 auf einem Knochenschnitt; Vergrößerung 100x
- Abb. 6.3: Klon 1F12F10 auf einem Knochenschnitt; Vergrößerung 400x
- Abb. 6.4: Klon 1F12F10 auf einem Leberschnitt; Vergrößerung 200x
- Abb. 6.5: Klon 1F12F10 auf einem Milzschnitt; Vergrößerung 200x
- Abb. 6.6: Klon 1F12F10 auf einem Nierenschnitt; Vergrößerung 200x
- Abb. 6.7: Klon 1F12F10 auf einem Pankreasschnitt; Vergrößerung 200x
- Abb. 7: FACS-Analyse von dem Klon 3H10A12
- Abb. 7.1: Klon 3H10A12 auf einem Knochenschnitt; Vergrößerung 200x
- Abb. 7.2: Klon 3H10A12 auf einem Darmschnitt; Vergrößerung 200x
- Abb. 7.3: Klon 3H10A12 auf einem Pankreasschnitt; Vergrößerung 200x
- Abb. 7.4: Klon 3H10A12 auf einem Hautschnitt; Vergrößerung 200x
- Abb. 7.5: Klon 3H10A12 auf einem Lungenschnitt; Vergrößerung 200x
- Abb. 8: FACS-Analyse von dem Klon 5C12B12
- Abb. 8.1: Klon 5C12B12 auf einem Knochenschnitt; Vergrößerung 400x
- Abb. 9: FACS-Analyse von den Klonen 1E7 und von dem Klon 1E7F12
- Abb. 10: FACS-Analyse von den Klonen 4H11 und dem Klon 4H11D11
- Abb. 11: FACS-Analyse von den Klonen 6F8 und dem Klon 6F8E12
- Abb. 11.1: Klon 6F8E12 auf einem Knochenschnitt; Vergrößerung 100x
- Abb. 12: FACS-Analyse von dem Klon 6B10B6
- Abb. 12.1: Klon 6B10B6 auf einem Knochenschnitt; Vergrößerung 200x
- Abb. 12.2: Klon 6B10B6 auf einem Hautschnitt; Vergrößerung 200x
- Abb. 12.3: Klon 6B10B6 auf einem Schilddrüsen/Nebenschilddrüsenchnitt
- Abb. 12.4: Klon 6B10B6 auf einem Pankreasschnitt; Vergrößerung 200x

- Abb. 13: FACS-Analyse von dem Klon 6B10H8
- Abb. 14: FACS-Analyse von den Klonen 6A8 und dem Klon 6A8C8
- Abb.14.1: Klon 6A8C8 auf einem Knochenschnitt; Vergrößerung 400x
- Abb. 14.2: Klon 6A8C8 auf einem Lungenschnitt; Vergrößerung 400x
- Abb. 14.3: Klon 6A8C8 auf einem Milzschnitt; Vergrößerung 400x
- Abb. 15: Western Blot mit Gesamt-Protein von frischen Knochenmarkzellen und einen Tag adhärenen Knochenmarkzellen
- Abb. 16: Western Blot mit Gesamt-Protein verschiedener Organe
- Abb. 17: Western Blot mit Gesamt-Protein von frischen Knochenmarkzellen und einen Tag adhärenen Knochenmarkzellen
- Abb. 18: Immunpräzipitation von biotinylierten Oberflächenproteinen von Maus-Knochenmark

## **Tabellen**

- Tabelle 1: Übersicht Fusionen Maus/Ratte
- Tabelle 2: Ergebnisse Klon Maus s. c.
- Tabelle 3: Ergebnisse Immunhistologie (Maus) verschiedene Gewebe
- Tabelle 4: Ergebnisse Klon Ratte i. p. und Ratte s. c.
- Tabelle 5: Ergebnisse Immunhistologie (Ratte) verschiedene Gewebe
- Tabelle 6: Konzentrationen der aufgereinigten Proteine

## 8 Literaturverzeichnis

- Akiyama, Y., C. Radtke, and J. D. Kocsis. 2002. "Remyelination of the rat spinal cord by transplantation of identified bone marrow stromal cells." *J Neurosci* 226623-30.
- Allan, E. H., P. W. Ho, A. Umezawa, J. Hata, F. Makishima, M. T. Gillespie, and T. J. Martin. 2003. "Differentiation potential of a mouse bone marrow stromal cell line." *J Cell Biochem* 158-69.
- Allay, J. A., J. E. Dennis, S. E. Haynesworth, M. K. Majumdar, D. W. Clapp, L. D. Shultz, A. I. Caplan, and S. L. Gerson. 1997. "LacZ and interleukin-3 expression in vivo after retroviral transduction of marrow-derived human osteogenic mesenchymal progenitors." *Hum Gene Ther* 81417-27.
- Anderson, D. J., F. H. Gage, and I. L. Weissman. 2001. "Can stem cells cross lineage boundaries?" *Nat Med* 7393-5.
- Aubin, J. E., F. Liu, L. Malaval, and A. K. Gupta. 1995. "Osteoblast and chondroblast differentiation." *Bone* 1777S-83S.
- Aubin, J. E. 1998. "Bone stem cells." *J Cell Biochem Suppl* 30-3173-82.
- Baddoo, M., K. Hill, R. Wilkinson, D. Gaupp, C. Hughes, G. C. Kopen, and D. G. Phinney. 2003. "Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection." *J Cell Biochem* 891235-49.
- Badiavas, E. V., M. Abedi, J. Butmarc, V. Falanga, and P. Quesenberry. 2003. "Participation of bone marrow derived cells in cutaneous wound healing." *J Cell Physiol* 245-50.
- Bianco, P. and P. G. Robey. 2001. "Stem cells in tissue engineering." *Nature* 414118-21.
- Bittira, B., D. Shum-Tim, A. Al-Khaldi, and R. C. Chiu. 2003. "Mobilization and homing of bone marrow stromal cells in myocardial infarction." *Eur J Cardiothorac Surg* 24393-8.
- Bittner, R. E., C. Schafer, K. Weitpoltshammer, B. Streubel, E. Hauser, M. Freilinger, H Hoger, A. Elbe-Bürger, and F. Wachtler. 1999. "Recruitment of bone marrow-derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice." *Anat Embryol* 391-6.
- Black, I. B. and D. Woodbury. 2001. "Adult rat and human bone marrow stromal stem cells differentiate into neurons." *Blood Cells Mol Dis* 27632-6.
- Brittan, M., T. Hunt, R. Jeffery, R. Poulson, S. J. Forbes, K. Hodivala-Dilke, J. Goldman, M. R. Alison, and N. A. Wright. 2002. "Bone marrow derivation of pericyptal myofibroblasts in the mouse and human small intestine and colon." *Gut* 50752-7.
- Broxmeyer, H. E., G. Hangoc, S. Cooper, R. C. Ribeiro, V. Graves, M. Yoder, J. Wagner, S. Vadhan-Raj, L. Benninger, P. Rubinstein, and et al. 1992. "Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation in adults." *Proc Natl Acad Sci U S A* 894109-13.

- Bruder, S. P., D. J. Fink, and A. I. Caplan. 1994. "Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy." *J Cell Biochem* 56283-94.
- Bruder, S. P., M. C. Horowitz, J. D. Mosca, and S. E. Haynesworth. 1997. "Monoclonal antibodies reactive with human osteogenic cell surface antigens." *Bone* 21225-35.
- Campion, D. R. 1984. "The muscle satellite cell: a review." *Int Rev Cytol* 87225-51.
- Caplan, A. I. 1991. "Mesenchymal stem cells." *J Orthop Res* 9641-50.
- Chopp, M., X. H. Zhang, Y. Li, L. Wang, J. Chen, D. Lu, M. Lu, and M. Rosenblum. 2000. "Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation." *Neuroreport* 113001-5.
- Collin, P., J. R. Nefussi, A. Wetterwald, V. Nicolas, M. L. Boy-Lefevre, H. Fleisch, and N. Forest. 1992. "Expression of collagen, osteocalcin, and bone alkaline phosphatase in a mineralizing rat osteoblastic cell culture." *Calcif Tissue Int* 50175-83.
- Cornacchia, F., A. Fornoni, A. R. Plati, A. Thomas, Y. Wang, L. Inverardi, L. J. Striker, and G. E. Striker. 2001. "Glomerulosclerosis is transmitted by bone marrow-derived mesangial cell progenitors." *J Clin Invest* 1081649-56.
- Cowles, E. A., M. E. DeRome, G. Pastizzo, L. L. Brailey, and G. A. Gronowicz. 1998. "Mineralization and the expression of matrix proteins during in vivo bone development." *Calcif Tissue Int* 6274-82.
- Deb, A., S. Wang, K. A. Skelding, D. Miller, D. Simper, and N. M. Caplice. 2003. "Bone marrow-derived cardiomyocytes are present in adult human heart: A study of gender-mismatched bone marrow transplantation patients." *Circulation* 1071247-9.
- Deng, W., M. Obrocka, I. Fischer, and D. J. Prockop. 2001. "In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP." *Biochem Biophys Res Commun* 282148-52.
- Diduch, D. R., L. C. Jordan, C. M. Mierisch, and G. Balian. 2000. "Marrow stromal cells embedded in alginate for repair of osteochondral defects." *Arthroscopy* 16571-7.
- Ferrari, G., G. Cusella-De Angelis, M. Coletta, E. Paolucci, A. Stornaiuolo, G. Cossu, and F. Mavilio. 1998. "Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors." *Science* 2791528-30.
- Friedenstein, A. J., K. V. Petrakova, A. I. Kurolesova, and G. P. Frolova. 1968. "Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues." *Transplantation* 6230-47.
- Friedenstein, A. J., R. K. Chailakhjan, and K. S. Lalykina. 1970. "The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells." *Cell Tissue Kinet* 3393-403.

- Friedenstein, A. J., U. F. Deriglasova, N. N. Kulagina, A. F. Panasuk, S. F. Rudakowa, E. A. Luria, and I. A. Ruadkow. 1974. "Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method." *Exp Hematol* 283-92.
- Friedenstein, A. J., R. K. Chailakhyan, N. V. Latsinik, A. F. Panasyuk, and I. V. Keiliss-Borok. 1974. "Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo." *Transplantation* 17331-40.
- Friedenstein, A. J. 1982. "Stromal bone marrow cells and the hematopoietic microenvironment." *Arkh Patol* 3-11.
- Fuchs, S., L. F. Satler, R. Kornowski, P. Okubagzi, G. Weisz, R. Baffour, R. Waksman, N. J. Weissman, M. Cerqueira, M. B. Leon, and S. E. Epstein. 2003. "Catheter-based autologous bone marrow myocardial injection in no-option patients with advanced coronary artery disease: a feasibility study." *J Am Coll Cardiol* 411721-4.
- Gage, F. H., P. W. Coates, T. D. Palmer, H. G. Kuhn, L. J. Fisher, J. O. Suhonen, D. A. Peterson, S. T. Suhr, and J. Ray. 1995. "Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain." *Proc Natl Acad Sci U S A* 9211879-83.
- Galfre, G. and C. Milstein. 1981. "Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures." *Methods Enzymol* 733-46.
- Grimm, P. C., P. Nickerson, J. Jeffery, R. C. Savani, J. Gough, R. M. McKenna, E. Stern, and D. N. Rush. 2001. "Neointimal and tubulointerstitial infiltration by recipient mesenchymal cells in chronic renal-allograft rejection." *N Engl J Med* 34593-7.
- Gronthos, S., S. E. Graves, S. Ohta, and P. J. Simmons. 1994. "The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors." *Blood* 844164-73.
- Gupta, S., C. Verfaillie, D. Chmielewski, Y. Kim, and M. E. Rosenberg. 2002. "A role for extrarenal cells in the regeneration following acute renal failure." *Kidney Int* 621285-90.
- Gussoni, E., Y. Soneoka, C. D. Strickland, E. A. Buzney, M. K. Khan, A. F. Flint, L. M. Kunkel, and R. C. Mulligan. 1999. "Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation." *Nature* 401390-4.
- Haynesworth, S. E., M. A. Baber, and A. I. Caplan. 1992. "Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies." *Bone* 1369-80.
- Haynesworth, S. E., M. A. Baber, and A. I. Caplan. 1996. "Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha." *J Cell Physiol* 166585-92.
- Hematti, P., E. M. Sloand, C. A. Carvallo, M. R. Albert, C. L. Yee, M. M. Fuehrer, J. K. Blancato, W. G. Kearns, J. A. Barrett, R. W. Childs, J. C. Vogel, and C. E. Dunbar. 2002. "Absence of donor-derived keratinocyte stem cells in skin tissues cultured from patients

- after mobilized peripheral blood hematopoietic stem cell transplantation." *Exp Hematol* 30943-9.
- Herzog, E. L., L. Chai, and D. S. Krause. 2003. "Plasticity of marrow-derived stem cells." *Blood* 1023483-93.
- Holden, C. and G. Vogel. 2002. "Stem cells. Plasticity: time for a reappraisal?" *Science* 2962126-9.
- Horwitz, E. M., P. L. Gordon, W. K. Koo, J. C. Marx, M. D. Neel, R. Y. McNall, L. Muul, and T. Hofmann. 2002. "Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone." *Proc Natl Acad Sci U S A* 998932-7.
- Hows, J. M., B. A. Bradley, J. C. Marsh, T. Luft, L. Coutinho, N. G. Testa, and T. M. Dexter. 1992. "Growth of human umbilical-cord blood in longterm haemopoietic cultures." *Lancet* 34073-6.
- Huber, H. M., M. Heiden, and R. Seitz. 1999. "Hämatopoetische Stammzellen: Zulassung und Qualitätskontrollen." *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 105-11.
- Ito, T., A. Suzuki, E. Imai, M. Okabe, and M. Hori. 2001. "Bone marrow is a reservoir of repopulating mesangial cells during glomerular remodeling." *J Am Soc Nephrol* 122625-35.
- Jaiswal, R. K., N. Jaiswal, S. P. Bruder, G. Mbalaviele, D. R. Marshak, and M. F. Pittenger. 2000. "Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase." *J Biol Chem* 2759645-52.
- Jiang, Y., B. N. Jahagirdar, R. L. Reinhardt, R. E. Schwartz, C. D. Keene, X. R. Ortiz-Gonzalez, M. Reyes, T. Lenvik, T. Lund, M. Blackstad, J. Du, S. Aldrich, A. Lisberg, W. C. Low, D. A. Largaespada, and C. M. Verfaillie. 2002. "Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow." *Nature* 41841-9.
- Jiang, Y., D. Henderson, M. Blackstad, A. Chen, R. F. Miller, and C. M. Verfaillie. 2003. "Neuroectodermal differentiation from mouse multipotent adult progenitor cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 Suppl 111854-60.
- Jin, H. K., J. E. Carter, G. W. Huntley, and E. H. Schuchman. 2002. "Intracerebral transplantation of mesenchymal stem cells into acid sphingomyelinase-deficient mice delays the onset of neurological abnormalities and extends their life span." *J Clin Invest* 1091183-91.
- Johansson, C. B., S. Momma, D. L. Clarke, M. Risling, U. Lendahl, and J. Frisen. 1999. "Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system." *Cell* 9625-34.



- Joyner, C. J., A. Bennett, and J. T. Triffitt. 1997. "Identification and enrichment of human osteoprogenitor cells by using differentiation stage-specific monoclonal antibodies." *Bone* 211-6.
- Kabos, P., M. Ehtesham, A. Kabosova, K. L. Black, and J. S. Yu. 2002. "Generation of neural progenitor cells from whole adult bone marrow." *Exp Neurol* 178288-93.
- Kadiyala, S., R. G. Young, M. A. Thiede, and S. P. Bruder. 1997. "Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro." *Cell Transplant* 6125-34.
- Kale, S., A. Karihaloo, P. R. Clark, M. Kashgarian, D. S. Krause, and L. G. Cantley. 2003. "Bone marrow stem cells contribute to repair of the ischemically injured renal tubule." *J Clin Invest* 11242-9.
- Kasugai, S., R. Todescan, Jr., T. Nagata, K. L. Yao, W. T. Butler, and J. Sodek. 1991. "Expression of bone matrix proteins associated with mineralized tissue formation by adult rat bone marrow cells in vitro: inductive effects of dexamethasone on the osteoblastic phenotype." *J Cell Physiol* 147111-20.
- Kearney, J. F., A. Radbruch, B. Liesegang, and K. Rajewsky. 1979. "A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines." *J Immunol* 1231548-50.
- Kleeberger, W., T. Rothamel, S. Glockner, P. Flemming, U. Lehmann, and H. Kreipe. 2002. "High frequency of epithelial chimerism in liver transplants demonstrated by microdissection and STR-analysis." *Hepatology* 35110-6.
- Kohler, G. and C. Milstein. 1975. "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity." *Nature* 256495-7.
- Kohyama, J., H. Abe, T. Shimazaki, A. Koizumi, K. Nakashima, S. Gojo, T. Taga, H. Okano, J. Hata, and A. Umezawa. 2001. "Brain from bone: efficient "meta-differentiation" of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with Noggin or a demethylating agent." *Differentiation* 68235-44.
- Kon, E., A. Muraglia, A. Corsi, P. Bianco, M. Marcacci, I. Martin, A. Boyde, I. Ruspantini, P. Chistolini, M. Rocca, R. Giardino, R. Cancedda, and R. Quarto. 2000. "Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones." *J Biomed Mater Res* 49328-37.
- Kopen, G. C., D. J. Prockop, and D. G. Phinney. 1999. "Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains." *Proc Natl Acad Sci U S A* 9610711-6.
- Korbling, M., R. L. Katz, A. Khanna, A. C. Ruifrok, G. Rondon, M. Albitar, R. E. Champlin, and Z. Estrov. 2002. "Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells." *N Engl J Med* 346738-46.

- Kotton, D. N., B. Y. Ma, W. V. Cardoso, E. A. Sanderson, R. S. Summer, M. C. Williams, and A. Fine. 2001. "Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium." *Development* 1285181-8.
- Krause, D. S., N. D. Theise, M. I. Collector, O. Henegariu, S. Hwang, R. Gardner, S. Neutzel, and S. J. Sharkis. 2001. "Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell." *Cell* 105369-77.
- Lagaaij, E. L., G. F. Cramer-Knijnenburg, F. J. van Kemenade, L. A. van Es, J. A. Bruijn, and J. H. van Krieken. 2001. "Endothelial cell chimerism after renal transplantation and vascular rejection." *Lancet* 35733-7.
- Lagasse, E., H. Connors, M. Al-Dhalimy, M. Reitsma, M. Dohse, L. Osborne, X. Wang, M. Finegold, I. L. Weissman, and M. Grompe. 2000. "Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo." *Nat Med* 61229-34.
- Leboy, P. S., J. N. Beresford, C. Devlin, and M. E. Owen. 1991. "Dexamethasone induction of osteoblast mRNAs in rat marrow stromal cell cultures." *J Cell Physiol* 146370-8.
- Lemischka, I. 1999. "The power of stem cells reconsidered?" *Proc Natl Acad Sci U S A* 9614193-5.
- Lisanti, N. "Biotinylation and Analysis of Membrane-Bound and Soluble Proteins." In *Current Protocols in Immunology*, J. E. Coligan, Editor. 1994., John Wiley et Sons. Inc. p. 8.16.1-8., 16.5.
- Liu, F., L. Malaval, A. K. Gupta, and J. E. Aubin. 1994. "Simultaneous detection of multiple bone-related mRNAs and protein expression during osteoblast differentiation: polymerase chain reaction and immunocytochemical studies at the single cell level." *Dev Biol* 166220-34.
- Lu, L., and A. G. Mikos. 1996. "The importance of new processing techniques in tissue engineering." *MRS Bull* 28-32.
- Mackay, A. M., S. C. Beck, J. M. Murphy, F. P. Barry, C. O. Chichester, and M. F. Pittenger. 1998. "Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow." *Tissue Eng* 4415-28.
- Majumdar, M. K., M. A. Thiede, J. D. Mosca, M. Moorman, and S. L. Gerson. 1998. "Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells." *J Cell Physiol* 17657-66.
- Mahmood, A., D. Lu, M. Lu, and M. Chopp. 2003. "Treatment of traumatic brain injury in adult rats with intravenous administration of human bone marrow stromal cells." *Neurosurgery* 679-702.
- Maniopoulos, C., J. Sodek, and A. H. Melcher. 1988. "Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats." *Cell Tissue Res* 254317-30.

- Martin, D. R., N. R. Cox, T. L. Hathcock, G. P. Niemeyer, and H. J. Baker. 2002. "Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow." *Exp Hematol* 30:879-86.
- Mason, R. J., M. C. Williams, H. L. Moses, S. Mohla, and M. A. Berberich. 1997. "Stem cells in lung development, disease, and therapy." *Am J Respir Cell Mol Biol* 16:355-63.
- Mauro, A. 1961. "Satellite cell of skeletal muscle fibers." *J Biophys Biochem Cytol* 9:493-5.
- Maximov, A. 1906. "Über experimentelle Erzeugung von Knochenmarkgewebe." *Anat Anz* 60:9-12.
- McKee, M. D. and A. Nanci. 1996. "Osteopontin at mineralized tissue interfaces in bone, teeth, and osseointegrated implants: ultrastructural distribution and implications for mineralized tissue formation, turnover, and repair." *Microsc Res Tech* 33:141-64.
- Meirelles Lda, S. and N. B. Nardi. 2003. "Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization." *Br J Haematol* 123:702-11.
- Minguell, J. J., A. Erices, and P. Conget. 2001. "Mesenchymal stem cells." *Exp Biol Med (Maywood)* 226:507-20.
- Mosca, J. D., J. K. Hendricks, D. Buyaner, J. Davis-Sproul, L. C. Chuang, M. K. Majumdar, R. Chopra, F. Barry, M. Murphy, M. A. Thiede, U. Junker, R. J. Rigg, S. P. Forestell, E. Bohnlein, R. Storb, and B. M. Sandmaier. 2000. "Mesenchymal stem cells as vehicles for gene delivery." *Clin Orthop* 371:S71-S90.
- Moss, F. P. and C. P. Leblond. 1971. "Satellite cells as the source of nuclei in muscles of growing rats." *Anat Rec* 170:421-35.
- Nagaya, N., T. Fujii, T. Iwase, H. Ohgushi, T. Itoh, M. Uematsu, M. Yamagishi, H. Mori, K. Kangawa, and S. Kitamura. 2004. "Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287:H2670-H2676.
- Nefussi, J. R., G. Brami, D. Modrowski, M. Oboeuf, and N. Forest. 1997. "Sequential expression of bone matrix proteins during rat calvaria osteoblast differentiation and bone nodule formation in vitro." *J Histochem Cytochem* 45:493-503.
- Nichols, J., B. Zevnik, K. Anastassiadis, H. Niwa, D. Klewe-Nebenius, I. Chambers, H. Scholer, and A. Smith. 1998. "Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4." *Cell* 95:379-91.
- Ohgushi, H., V. M. Goldberg, and A. I. Caplan. 1989. "Repair of bone defects with marrow cells and porous ceramic. Experiments in rats." *Acta Orthop Scand* 60:334-9.
- Okamoto, R., T. Yajima, M. Yamazaki, T. Kanai, M. Mukai, S. Okamoto, Y. Ikeda, T. Hibi, J. Inazawa, and M. Watanabe. 2002. "Damaged epithelia regenerated by bone marrow-derived cells in the human gastrointestinal tract." *Nat Med* 8:1011-7.

- Orlic, D., J. Kajstura, S. Chimenti, F. Limana, I. Jakoniuk, F. Quaini, B. Nadal-Ginard, D. M. Bodine, A. Leri, and P. Anversa. 2001. "Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival." *Proc Natl Acad Sci U S A* 9810344-9.
- Ortiz, L. A., F. Gambelli, C. McBride, D. Gaupp, M. Baddoo, N. Kaminski, and D. G. Phinney. 2003. "Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects." *Proc Natl Acad Sci U S A* 1008407-11.
- Osawa, M., K. Hanada, H. Hamada, and H. Nakauchi. 1996. "Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell." *Science* 273242-5.
- Oshima, H., A. Rochat, C. Kedzia, K. Kobayashi, and Y. Barrandon. 2001. "Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells." *Cell* 104233-45.
- Peister, A., J. A. Mellad, B. L. Larson, B. M. Hall, L. F. Gibson, and D. J. Prockop. 2004. "Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential." *Blood* 1031662-8.
- Pereira, R. F., K. W. Halford, M. D. O'Hara, D. B. Leeper, B. P. Sokolov, M. D. Pollard, O. Bagasra, and D. J. Prockop. 1995. "Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 924857-61.
- Pereira, R. M., A. M. Delany, and E. Canalis. 2001. "Cortisol inhibits the differentiation and apoptosis of osteoblasts in culture." *Bone* 28484-90.
- Perin, E. C., H. F. Dohmann, R. Borojevic, S. A. Silva, A. L. Sousa, C. T. Mesquita, M. I. Rossi, A. C. Carvalho, H. S. Dutra, H. J. Dohmann, G. V. Silva, L. Belem, R. Vivacqua, F. O. Rangel, R. Esporcatte, Y. J. Geng, W. K. Vaughn, J. A. Assad, E. T. Mesquita, and J. T. Willerson. 2003. "Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure." *Circulation* 1072294-302.
- Petersen, B. E., W. C. Bowen, K. D. Patrene, W. M. Mars, A. K. Sullivan, N. Murase, S. S. Boggs, J. S. Greenberger, and J. P. Goff. 1999. "Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells." *Science* 2841168-70.
- Pfeffer, M. A. and E. Braunwald. 1990. "Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications." *Circulation* 811161-72.
- Phinney, D. G. 2002. "Building a consensus regarding the nature and origin of mesenchymal stem cells." *J Cell Biochem Suppl* 387-12.
- Pittenger, M. F., A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig, and D. R. Marshak. 1999. "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." *Science* 284143-7.

- Poulsom, R., S. J. Forbes, K. Hodivala-Dilke, E. Ryan, S. Wyles, S. Navaratnarasah, R. Jeffery, T. Hunt, M. Alison, T. Cook, C. Pusey, and N. A. Wright. 2001. "Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration." *J Pathol* 195229-35.
- Quarto, R., M. Mastrogiacomo, R. Cancedda, S. M. Kutepov, V. Mukhachev, A. Lavroukov, E. Kon, and M. Marcacci. 2001. "Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells." *N Engl J Med* 344385-6.
- Ramshaw, H. S., D. Haylock, B. Swart, S. Gronthos, M. J. Horsfall, S. Niutta, and P. J. Simmons. 2001. "Monoclonal antibody BB9 raised against bone marrow stromal cells identifies a cell-surface glycoprotein expressed by primitive human hemopoietic progenitors." *Exp Hematol* 29981-92.
- Reyes, M., T. Lund, T. Lenvik, D. Aguiar, L. Koodie, and C. M. Verfaillie. 2001. "Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells." *Blood* 982615-25.
- Reynolds, B. A. and S. Weiss. 1992. "Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system." *Science* 2551707-10.
- Richards, L. J., T. J. Kilpatrick, and P. F. Bartlett. 1992. "De novo generation of neuronal cells from the adult mouse brain." *Proc Natl Acad Sci U S A* 898591-5.
- Sanchez-Ramos, J., S. Song, F. Cardozo-Pelaez, C. Hazzi, T. Stedeford, A. Willing, T. B. Freeman, S. Saporta, W. Janssen, N. Patel, D. R. Cooper, and P. R. Sanberg. 2000. "Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro." *Exp Neurol* 164247-56.
- Schwartz, R. E., M. Reyes, L. Koodie, Y. Jiang, M. Blackstad, T. Lund, T. Lenvik, S. Johnson, W. S. Hu, and C. M. Verfaillie. 2002. "Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells." *J Clin Invest* 1091291-302.
- Seshi, B., S. Kumar, and D. King. 2003. "Multilineage gene expression in human bone marrow stromal cells as evidenced by single-cell microarray analysis." *Blood Cells Mol Dis* 31268-85.
- Simmons, P. J. and B. Torok-Storb. 1991. "Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1." *Blood* 7855-62.
- Simmons, P. J. and B. Torok-Storb. 1991. "CD34 expression by stromal precursors in normal human adult bone marrow." *Blood* 782848-53.
- Svensson, H. G., H. R. Hoogenboom, and U. Sjobring. 1998. "Protein LA, a novel hybrid protein with unique single-chain Fv antibody- and Fab-binding properties." *Eur J Biochem* 258890-6.
- Taylor, G., M. S. Lehrer, P. J. Jensen, T. T. Sun, and R. M. Lavker. 2000. "Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis." *Cell* 102451-61.

- Theise, N. D., R. Saxena, B. C. Portmann, S. N. Thung, H. Yee, L. Chiriboga, A. Kumar, and J. M. Crawford. 1999. "The canals of Hering and hepatic stem cells in humans." *Hepatology* 30:1425-33.
- Tocci, A. and L. Forte. 2003. "Mesenchymal stem cell: use and perspectives." *Hematol J* 492-6.
- Toma, C., M. F. Pittenger, K. S. Cahill, B. J. Byrne, and P. D. Kessler. 2002. "Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart." *Circulation* 93-8.
- Tropel, P., D. Noel, N. Platet, P. Legrand, A. L. Benabid, and F. Berger. 2004. "Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow." *Exp Cell Res* 295:395-406.
- Tsai, R. Y. and R. D. McKay. 2000. "Cell contact regulates fate choice by cortical stem cells." *J Neurosci* 20:3725-35.
- Tsai, R. Y. and R. D. McKay. 2002. "A nucleolar mechanism controlling cell proliferation in stem cells and cancer cells." *Genes Dev* 16:2991-3003.
- Vescovi, A. L., B. A. Reynolds, D. D. Fraser, and S. Weiss. 1993. "bFGF regulates the proliferative fate of unipotent (neuronal) and bipotent (neuronal/astroglial) EGF-generated CNS progenitor cells." *Neuron* 11:951-66.
- Vogel, W., F. Grunebach, C. A. Messam, L. Kanz, W. Brugger, and H. J. Bühring. 2003. "Heterogeneity among human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and neural progenitor cells." *Haematologica* 88:126-33.
- Wakitani, S., T. Saito, and A. I. Caplan. 1995. "Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine." *Muscle Nerve* 18:1417-26.
- Weisman, H. F., D. E. Bush, J. A. Mannisi, M. L. Weisfeldt, and B. Healy. 1988. "Cellular mechanisms of myocardial infarct expansion." *Circulation* 78:186-201.
- Weng, L., N. Falla, R. Van den Heuvel, J. Raymackers, M. Karperien, R. Van Bezooijen, P. Van Vlasselaer, C. Lowik, and J. Merregaert. 2000. "The monoclonal antibodies 18d7/91f2 recognize a receptor regulatory protein on mouse bone marrow stromal cells." *J Bone Miner Res* 15:1286-300.
- Woodbury, D., E. J. Schwarz, D. J. Prockop, and I. B. Black. 2000. "Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons." *J Neurosci Res* 61:364-70.
- Zander, A. R., N. Stute, H. J. Kolb, S. Seeberger, and N. Schmitz. 2002. "Stammzellforschung: Diesseits des Rubikon." *Deutsches Ärzteblatt* A-341/B-257/C-258.
- Zannettino, A. C., K. Harrison, C. J. Joyner, J. T. Triffitt, and P. J. Simmons. 2003. "Molecular cloning of the cell surface antigen identified by the osteoprogenitor-specific monoclonal antibody, HOP-26." *J Cell Biochem* 89:56-66.

- Zhu, J. X., Y. Sasano, I. Takahashi, I. Mizoguchi, and M. Kagayama. 2001. "Temporal and spatial gene expression of major bone extracellular matrix molecules during embryonic mandibular osteogenesis in rats." *Histochem J* 3325-35.

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Dr. Reinhold G. Erben danke ich für die Überlassung des Dissertationsthemas, seine jederzeit gewährte Unterstützung und die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen.

Bei Dr. Karin Weber bedanke ich mich für die fachliche Betreuung, die Einarbeitung in die Methoden und die stete Diskussionsbereitschaft. Danke auch für die Unterstützung bei Computerfragen.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Claudia Bergow, Karin Begsteiger und Siglinde Hirmer sowie meinen Mitstreitern für das freundliche Arbeitsklima im Labor und für ihre stete Hilfsbereitschaft.

Für die Betreuung der Tiere bedanke ich mich bei Hedi Opitz, Fritz Meggendorfer und Thomas Hoschka.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir das Tiermedizinstudium ermöglicht haben. Danke auch für die unermüdliche seelische Unterstützung während des Studiums und der Doktorarbeit.