

Aus der Klinik für Allgemeine, Unfall- und Wiederherstellungschirurgie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Wolfgang Böcker

# Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf die Physiologie von mesenchymalen Vorläuferzellen der Ratte



Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der Medizinischen  
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

**Robert Nöding**  
(aus Frankfurt am Main)

2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität  
München

Berichterstatter: Prof. Dr. Matthias Schieker

Mitberichterstatter: PD Dr. Stefan Grote

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Hans Polzer

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL

Tag der mündlichen Prüfung: 23.11.2017

<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1 PROBLEMSTELLUNG</b>	<b>1</b>
1.1.1 KNOCHENHEILUNG	1
1.1.2 KRITISCHE KNOCHENDEFEKTE	1
<b>1.2 THERAPIEOPTIONEN</b>	<b>2</b>
<b>1.3 TISSUE ENGINEERING</b>	<b>3</b>
1.3.1 PRINZIP DES TISSUE ENGINEERINGS	4
1.3.2 PROBLEMATIK DES TISSUE ENGINEERINGS	5
<b>1.4 ZIELSETZUNG</b>	<b>10</b>
<b>2 MATERIALIEN UND METHODEN</b>	<b>13</b>
<b>2.1 VERSUCHSTIERE UND ZELLGEWINNUNG</b>	<b>13</b>
<b>2.2 ZELLKULTUR</b>	<b>15</b>
<b>2.3 ZELLCHARAKTERISIERUNG</b>	<b>17</b>
2.3.1 DIFFERENZIERUNG	17
2.3.2 OBERFLÄCHENPROFIL	20
<b>2.4 ZELLCHARAKTERISTIKA</b>	<b>22</b>
2.4.1 POPULATIONSDOPPLUNG	22
2.4.2 COLONY FORMING UNIT	23
2.4.3 MORPHOLOGIE	23
2.4.4 ZYTOSKELETTFÄRBUNG	24
2.4.5 ZELLMETABOLISMUS	25
2.4.6 SENESZENZ	26
<b>2.5 ÜBERLEBEN IN ANOXIE</b>	<b>27</b>
2.5.1 VERSUCHSAUFBAU	27
2.5.2 APOPTOSEFÄRBUNG	28
2.5.3 FACS AUSWERTUNG	29
<b>2.6 STATISTISCHE ANALYSE</b>	<b>29</b>
<b>3 ERGEBNISSE</b>	<b>31</b>
<b>3.1 EXTRAKTION VON ZELLEN AUS ACHT RATTEN</b>	<b>31</b>
<b>3.2 CHARAKTERISIERUNG DER ZELLEN ALS AD(MSC)RAT</b>	<b>32</b>

## Inhalt

3.2.1 SAUERSTOFFKONZENTRATION BEEINFLUSST DIFFERENZIERUNGSPOTENTIAL	32
3.2.2 OBERFLÄCHENPROFIL WEIßT STAMMZELLCHARAKTER AUF	37
<b>3.3 ZELLEIGENSCHAFTEN WERDEN DURCH HYPOXIE ENTSCHEIDEND BEEINFLUSST</b>	<b>39</b>
3.3.1 BESCHLEUNIGTES ZELLPOPULATIONSWACHSTUM UNTER HYPOXIE	39
3.3.2 HYPOXIE STEIGERT DIE KOLONIEFORMUNGSEFFEKTIVITÄT	40
3.3.3 ZELLMORPHOLOGIE LÄSST SICH DURCH SAUERSTOFFGEGHALT BEEINFLUSSEN	42
3.3.4 GRÖßENZUNAHME DER ZELLEN IN NORMOXIE	47
3.3.5 HYPOXIE STEIGERT DEN ZELLMETABOLISMUS SIGNIFIKANT	49
3.3.6 SIGNIFIKANT LANGSAMERE ZELLALTERUNG UNTER HYPOXIE	50
<b>3.4 KEIN ÜBERLEBENSVORTEIL IN ANOXIE DURCH PRÄKONDITIONIERUNG</b>	<b>51</b>
<b>4 DISKUSSION</b>	<b>53</b>
<b>4.1 ZELLGEWINNUNG</b>	<b>53</b>
4.1.1 VERSUCHSTIERE	53
4.1.2 FETTGEWEBE	53
<b>4.2 ZELLCHARAKTERISIERUNG</b>	<b>55</b>
4.2.1 DIFFERENZIERUNG	56
4.2.2 OBERFLÄCHENPROFIL	59
<b>4.3 ZELLEIGENSCHAFTEN</b>	<b>60</b>
4.3.1 POPULATIONSV ERDOPPLUNG	60
4.3.2 COLONY FORMING UNIT	61
4.3.3 MORPHOLOGIE	63
4.3.4 ZYTOSKELETTFÄRBUNG	65
4.3.5 ZELLMETABOLISMUS	66
4.3.6 SENESZENZ	67
<b>4.4 ÜBERLEBEN IN ANOXIE</b>	<b>68</b>
<b>5 AUSBLICK</b>	<b>71</b>
<b>6 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>73</b>
<b>7 ANHANG</b>	<b>75</b>
<b>7.1 ABBILDUNGEN</b>	<b>75</b>

## Inhalt

<b>7.2</b>	<b>TABELLEN</b>	<b>76</b>
<b>7.3</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>79</b>
<b>7.4</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>81</b>
<b>7.5</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>82</b>
<b>7.6</b>	<b>MATERIALIEN</b>	<b>83</b>
<b>7.7</b>	<b>VERSUCHSPROTOKOLLE</b>	<b>86</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>92</b>
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>101</b>

# **1 Einleitung**

## **1.1 Problemstellung**

### **1.1.1 Knochenheilung**

Knochengewebe ist im menschlichen Körper ständigen Umbauvorgängen unterworfen und daher lebenslang zur Regeneration fähig. Auf diese Weise ist der Knochen in der Lage entstandene Defekte in einem Toleranzbereich selbständig zu reparieren [1]. Die Knochenheilung verläuft dabei nach zwei verschiedenen Prinzipien ab.

Haben die beiden Knochenfragmente direkten Kontakt und sind stabil fixiert kommt es zur direkten (primären) Frakturheilung. Dabei wird der Frakturspalt unmittelbar mit Geflechtknochen durchbaut. Typischerweise kommt es zu dieser Art der Defektdeckung nach gut gelungenen Osteosynthesen oder bei stabilen, nicht dislozierten Frakturen.

Bei instabilen Frakturspalten mit Kontinuitätsunterbrechung von mehr als 1 mm kommt es zunächst zum Einwachsen von Gefäßen aus den stark durchbluteten distalen und proximalen Knochenfragmenten. Unter Einwanderung von Fibroblasten entsteht zunächst ein Kallus, welcher die Fraktur stabilisiert. Eine Verknöcherung tritt erst sekundär ein, weshalb man von indirekter Frakturheilung spricht [2].

Bei der Mehrzahl der Osteosyntheseverfahren liegen beide Heilungsverfahren gleichzeitig vor, wobei sich beide bezüglich Qualität und Dauer der Heilung nicht ausschlaggebend unterscheiden [3].

### **1.1.2 Kritische Knochendefekte**

Verschiedene Krankheitsbilder führen allerdings zu Defekten kritischer Größe, welche durch natürliche Heilung nicht verschlossen werden können (Kritischer Knochendefekt) und somit alternative Therapieverfahren erfordern.

Die Ursachen kritischer Knochendefekte sind vielfältig und können sowohl mechanischer als auch biologischer Natur sein. Durch Hochrasanztraumata oder im

Rahmen von Explosionsverletzungen entstandene Trümmerfrakturen können, insbesondere bei Deperiostierung zu Osteonekrosen führen, welche große knöcherne Defekte hinterlassen [4]. Offene Frakturen können zu Knocheninfektionen (Ostitis) führen, welche eine partielle Resektion von Knochen notwendig machen können [5]. Ein weiteres klinisches Problem stellt die Behandlung von Knochentumoren dar, weil diese in vielen Fällen mit großem Sicherheitsabstand operativ entfernt werden müssen. Alle aufgeführten Ursachen können zu einem Knochendefekt führen, dessen Größe die Regenerationsfähigkeit des Organismus übersteigt und damit einer komplexeren Behandlung bedürfen.

### 1.2 Therapieoptionen

Die Behandlung von Knochendefekten kritischer Größe ist Gegenstand intensiver Forschung. Es stehen heutzutage verschiedene Behandlungsoptionen zur Verfügung von denen alle mit Vor- und Nachteilen verbunden sind.

Als therapeutischer Goldstandard gilt derzeit die autologe Knochentransplantation [6-8]. Dabei wird dem Patienten aus einem gesunden Knochen, oftmals dem Darmbeinkamm, ein kortikaler Span oder Spongiosa entnommen (Hebedefekt) und in den zu überbrückenden Defekt transplantiert. Auf diese Weise gelangen osteogenetische Materialien in Form Knochensubstanz sezernierender Zellen (Osteoblasten), sowie osteoinduktive Substanzen (Wachstumsfaktoren) in den kritischen Defekt und bilden die Wachstumsgrundlage neuen Knochengewebes [9]. Die Behandlungsmethode bietet allerdings einige Risiken und Probleme. Vor allem bezüglich des Hebedefekts kann es zu schweren Komplikationen kommen. Der zusätzliche operative Eingriff an einem bis dahin gesunden Knochen birgt das Risiko für Infektionen, Wundheilungsstörungen und Blutungen. Oftmals sind dabei die postoperativen Schmerzen im Bereich des Hebedefektes größer als im eigentlich therapiebedürftigen Knochenabschnitt [10-12]. Dadurch erhöhen sich folglich auch der Schmerzmittelbedarf und die Liegedauer, welche über die Folgen für den einzelnen Patienten hinaus, auch zu einem volkswirtschaftlichen Schaden beitragen. Nicht zu vernachlässigen ist auch, dass das entnommene Gewebe sowohl quantitativ als auch qualitativ limitiert ist und bei vielen Patientengruppen (z.B. bei an

Osteoporose erkrankten Menschen) aufgrund geringerer Knochendichte nicht den optimalen therapeutischen Voraussetzungen genügt.

Um den bei der autologen Knochentransplantation notwendigen Hebedefekt zu vermeiden, bedienen sich andere Verfahren fremden Materials. Eine Möglichkeit bietet die allogene Knochentransplantation, bei der Knochengewebe von einem menschlichen Spender übertragen wird [13]. Ein entscheidender Nachteil ist in diesem Fall die begrenzte Verfügbarkeit an Spendern sowie das Risiko der Übertragung von Infektionskrankheiten [14]. Des Weiteren besteht die Gefahr der Abstoßung des Knochentransplantats durch das Immunsystem des Empfängers.

Einen weiteren Ansatz bietet in diesem Zusammenhang der Einsatz von osteokonduktiven Knochenersatzmaterialien. Dabei handelt es sich um eine Nachahmung des anorganischen Mineralkristalls des Knochens. Verschiedene Stoffe, darunter Keramiken, sowie natürliche und synthetische Polymere, befinden sich bereits in klinischem Einsatz [15]. Besonders die leichte Verfügbarkeit und das Vermeiden eines Zweiteingriffs sprechen für die Anwendung alloplastischen Materials. Die Herstellung eines in allen Eigenschaften gleichwertigen Knochenersatzes ist allerdings bis zum heutigen Stand der Technik nicht gelungen. Die Anwendung kann aufgrund der hohen Steifigkeit der Transplantate zu Veränderung der Spannungsverhältnisse im angrenzenden Knochengewebe führen. Aus diesem Grund dienen einige Fremdmaterialien, wie beispielsweise Hydroxylapatit, nur als mechanischer Platzhalter und werden nach einiger Zeit resorbiert. Sie dienen als Leitstruktur, wobei das nachwachsende organische Substrat an ihrer Oberfläche wächst [15]. Nicht zuletzt erhöhen Fremdkörper immer das Risiko einer Infektion und können zu Abstoßungsreaktionen führen und Allergien begünstigen.

### 1.3 Tissue Engineering

Eine vielversprechende Alternative zu den oben genannten Behandlungsmethoden stellt der Einsatz von autologen, multipotenten Vorläuferzellen im Rahmen des Tissue Engineerings dar [16, 17]. Mit diesem Verfahren können die Vorteile der autologen Transplantation, wie gleichwertige Knochensubstanz und fehlende

Abstoßungsreaktionen, mit denen der Knochenersatzmaterialien, unbegrenzte Knochenverfügbarkeit und geringere bis keine Hebedefektmorbidität, kombiniert werden [18].

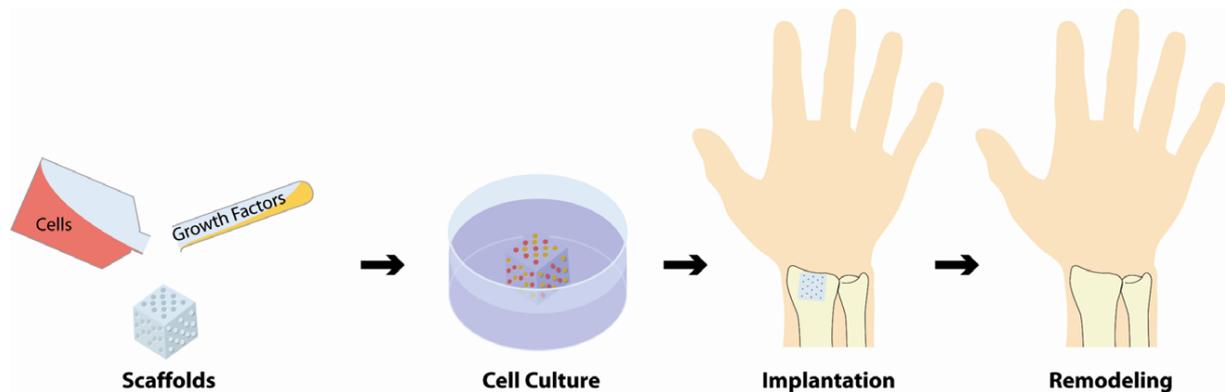
### 1.3.1 Prinzip des Tissue Engineerings

Zur Ausübung des Tissue Engineerings bedarf es einer Kombination aus naturwissenschaftlicher und technischer Forschung sowie der Zusammenarbeit zwischen einer Vielzahl von Wissenschaftlern unterschiedlicher Fachbereiche [19]. Diese können von Fluidodynamik, über Materialkunde bis hin zu Molekularbiologie reichen. Ziel ist die Herstellung biologischer Gewebe, um damit kranke oder verletzte Gewebe beim Patienten zu ersetzen. Zu diesem Zweck werden osteogenetische, osteoinduktive und osteokonduktive Eigenschaften auf sinnvolle Weise miteinander vereint.

Zunächst werden dem Patienten multipotente autologe Zellen entnommen. In der Regel muss sich der Patient dafür einer Knochenmarkspunktion bzw. einer Fettgewebspunktion unterziehen. Die auf diese Weise gewonnenen Zellen werden nun im weiteren Verlauf *in vitro* bis zur gewünschten Zellzahl expandiert [20]. Nach Erreichen einer suffizienten Zellzahl werden die Zellen mit Wachstumsfaktoren angereichert und in den Patienten reimplantiert. Zu diesem Zweck werden die Zellen zunächst auf ein biologisches Gerüst angesiedelt (**Abbildung 1**). Dabei handelt es sich um ein dreidimensionales Konstrukt, dass zumeist aus anorganischem Material wie Hydroxylapatit besteht [21]. Dieses kann mit Hilfe bildgebender Diagnostik und darauf basierenden 3D Rekonstruktionen dem Knochendefekt vorangepasst werden und dient so als ideale Leitschiene für das Zellmaterial. In einer Operation wird das Konstrukt bestehend aus multipotenten autologen Zellen, Wachstumsfaktoren und dem biologischen extrazellulären Gerüst in den kritischen Knochendefekt eingebracht.

Das fertige Implantat erfüllt demnach osteogenetische, osteoinduktive und osteokonduktive Eigenschaften [15]. Gegenüber den herkömmlichen Behandlungsmethoden ergeben sich durch dieses Vorgehen entscheidende Vorteile. So wird auf der einen Seite die komplikationsreiche autologe Knochentransplantation aus dem Beckenkamm durch ein komplikationsärmeres Extraktionsverfahren ersetzt.

Auf der anderen Seite ergibt sich aus der *in vitro* Expansion eine erheblich größere Menge an neuem Gewebe und selbst größere Knochendefekte, für welche die Knochentransplantation nicht genügend Material liefert, könnten auf diese Weise behoben werden.



**Abbildung 1: Grundprinzip des Tissue Engineerings**

Schematische Darstellung der grundsätzlichen Abläufe des Tissue Engineerings [18]. Die Zellen werden dabei nach der Entnahme expandiert und unter Zuhilfenahme einer Trägersubstanz dem Wirt wieder zugefügt.

### 1.3.2 Problematik des Tissue Engineerings

Der große Durchbruch des Tissue Engineerings ist bis heute allerdings trotz des enormen Potentials nicht gelungen. Während die grundsätzlichen technischen Voraussetzungen für Ex- und Implantation, sowie für Expansion der Zellen *in vitro* geschaffen sind, bestehen praktisch immer noch große Mängel [22]. So ist es bereits gelungen, multipotente Zellen aus verschiedenen Geweben zu entnehmen, zu expandieren und sie mittels Trägermaterialien zu reimplantieren [23].

Allerdings sind nach wie vor viele Fragen ungeklärt:

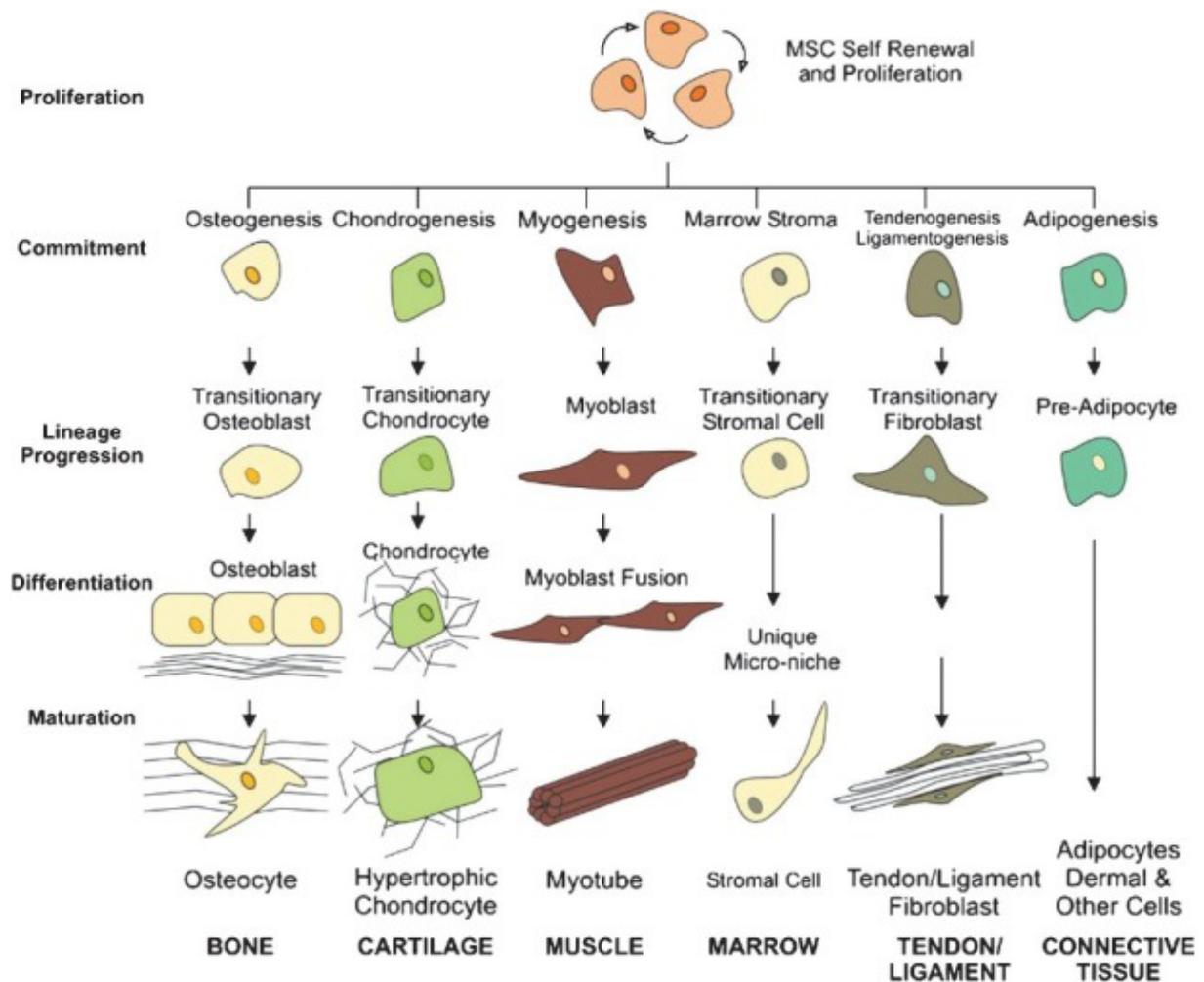
1. Welche Zellen bieten die besten Voraussetzungen für das Tissue Engineering von Knochen?
2. Wie gelingt es Erkenntnisse über die physiologische Umgebung der Zellen auf die Zellkultur zu übertragen?
3. Welchen Einfluss übt der Sauerstoffgehalt auf die Zellen aus?
4. Wie wird das Zellüberleben nach Reimplantation verbessert?

### 1.3.2.1 Verwendete Zellen

Die im Rahmen des Tissue Engineerings von Knochen am häufigsten untersuchten Zellen sind die mesenchymalen Stammzellen (MSCs). Dabei handelt es sich um eine spezielle Gruppe adulter Zellen, welche Teile des embryonalen Stammzellpotentials aufweisen. Diese besitzen im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen (ESCs) kein unbegrenztes Differenzierungs- und Wachstumspotential mehr, sind aber immer noch in der Lage eine Vielzahl von Gewebearten zu formen.

Mesenchymale Stammzellen wurden zum ersten Mal 1966 von Friedenstein beschrieben und sind seither ein wichtiger Bestandteil klinischer wie experimenteller Forschung [24-26]. Sie entstammen embryologisch dem mittleren Keimblatt (Mesoderm) und besitzen folglich die Fähigkeit, sich in Knochen-, Knorpel-, Muskel-, Fett- und Sehngewebe zu differenzieren (**Abbildung 2**) [27-31]. Dadurch ergibt sich ein enorm breites Einsatzspektrum in der Medizin, welches die hohe Stellung mesenchymaler Stammzellen in der regenerativen Forschung erklärt [32].

## Einleitung



**Abbildung 2: Mesenchymale Stammzellen**

Schematische Darstellung des Differenzierungspotentials humaner mesenchymaler Stammzellen [33]. Die Abbildung zeigt, wie aus MSCs durch Differenzierung und Zellteilung Knochen- Knorpel-, Muskel- Knochenmark-, Sehnen- und Fettgewebe entstehen kann.

Bezüglich der Isolierung mesenchymaler Stammzellen bestehen unterschiedliche Möglichkeiten. Zumeist werden diese aus dem Knochen mittels Knochenmarksaspiration gewonnen [34]. Allerdings ist es auch gelungen MSCs aus dem Fettgewebe zu isolieren [35, 36]. Diese Zellen zeigen in neueren Studien keinen Nachteil gegenüber den osteogenen MSCs und sind auf der anderen Seite deutlich leichter zugänglich [37]. So ist beim Menschen anstelle einer Knochenmarkspunktion eine Fettgewebepunktion ausreichend zur Zellisolierung [38]. Auch bieten sich neue Möglichkeiten bezüglich der Etablierung von Tiermodellen zur autologen Stammzellgewinnung.

### 1.3.2.2 Stammzellnische

Unter dem Begriff der Stammzellnische versteht man eine natürliche, physiologische Umgebung, in der Stammzellen ihren multipotenten Charakter behalten und sich nicht weiter ausdifferenzieren [39-41]. Erstmals beschrieben wurde sie 1978 von Schofield. Seitdem ist sie ein wichtiger Bestandteil der Zellforschung [39]. Für diese Nische sind ganz bestimmte Verhältnisse unterschiedlicher Einflussfaktoren von Bedeutung.

Eine wichtige Rolle dabei spielen benachbarte Zellen, sowie die Extrazellulärmatrix, welche mittels Zell-Zell-Kontakten (z.B. Hemidesmosomen und Gap-Junctions) und Zytokinen mit den Stammzellen kommunizieren. Die damit übermittelten chemischen, biochemischen und physikalischen Signale beeinflussen die Stammzelle bezüglich ihrer fortschreitenden Differenzierung bzw. im Beibehalten des inaktiven Zustands [42].

Weitere entscheidende Komponenten der Stammzellnische sind eine physiologische Temperatur des Menschen, sowie optimale Sauerstoffbedingungen. Es ist bekannt, dass niedrigen Sauerstoffbedingungen ausgesetzte Zellen, auf diesen Zustand mit einer komplexen Stoffwechsellumstellung reagieren [43-45].

Fundierte Kenntnisse über die individuellen Nischen verschiedener Stammzellen sind für die experimentelle Forschung von enormem Interesse. Ziel ist es, die physiologisch vorliegenden Bedingungen auf die Zellkultur *in vitro* zu übertragen, um den Zellen eine möglichst physiologische Umgebung zu schaffen. Viele Erkenntnisse über die ursprüngliche Umgebung von Zellen werden dabei schon seit Jahren umgesetzt. Beispielsweise werden Zellen unter 37 °C kultiviert und den Zellmedien ganz bestimmte physiologische Nährstoffe zugegeben. Andere Einflüsse wie zuvor genannte Sauerstoffbedingungen, Nachbarzellen oder Wachstumsfaktoren werden dagegen noch nicht standardisiert auf die Zellkultur von MSCs übertragen.

Festzuhalten bleibt, es gibt im menschlichen Körper eine erhebliche Anzahl von Einflussfaktoren auf das Wachstum und die Differenzierung von Vorläuferzellen. Davon sind einige bekannt, die große Mehrzahl jedoch unentdeckt. Unter den identifizierten Faktoren befinden sich beispielsweise mechanische, und thermische

Reize, verschiedene Wachstumsfaktoren sowie unterschiedliche Sauerstoffkonzentrationen [46-48]. Diese im Körper automatisch ablaufenden Einflüsse auf die Zellkultur *in vitro* zu übertragen, stellt eine der größten Herausforderungen für die experimentelle Forschung der regenerativen Medizin dar.

### **1.3.2.3 Einfluss von Sauerstoff**

Eine entscheidende Rolle in der Nische von Stammzellen nimmt, wie bereits beschrieben, der Sauerstoffgehalt ein. Dabei ist bekannt, dass der Sauerstoff nicht alleine als überlebenswichtiger Stoff zur Energiegewinnung der Zelle gebraucht wird sondern auch Signalfunktionen übernehmen kann. So wird beispielsweise über den Sauerstoffgehalt der Umgebung reguliert, ob eine Stammzelle proliferiert oder sich differenziert [49].

Der Einfluss unterschiedlicher Sauerstoffkonzentrationen auf Stammzellen wird bereits seit mehreren Jahren untersucht [50, 51]. Dabei zeigte sich bei vielen Vorläuferzellen eine gesteigerte Proliferation und besseres Aufrechterhalten des multipotenten Stammzellcharakters unter niedrigen Sauerstoffkonzentrationen (Hypoxie) [52, 53]. Auch konnte in mehreren *in vitro* Studien eine Hochregulierung von VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), unter Hypoxie, für aus Fett und Knochenmark stammenden MSCs gezeigt werden [54-56]. Als entscheidende intranuklär wirksame Proteine konnten die Hypoxie-Induzierenden Faktoren (HIFs) identifiziert werden. Dabei handelt es sich um Hypoxie gesteuerte Transkriptionsfaktoren, welche die Expression von mehreren verschiedenen Genen regulieren [57]. Sie setzen sich aus verschiedenen Untereinheiten zusammen. Unter normoxischen Bedingungen liegt die alpha-Untereinheit der HIFs in hydroxylierter Form vor. Dies führt in der Folge zu einem Abbau des Faktors durch das von Hippel-Lindau Tumor-Suppressor-Protein (VHL). In Hypoxie jedoch stabilisiert sich der Transkriptionsfaktor und übt so einen steigernden Einfluss auf die Erythropoese und Angiogenese aus [58].

Stellt man sich, aufgrund dieser Erkenntnisse, die Frage nach dem Sauerstoffgehalt der natürlichen Umgebung von mesenchymalen Stammzellen, so stellt man fest, dass MSCs sich zu allen Zeiten unter hypoxischen Bedingungen befinden. So wurde die höchste Sauerstoffkonzentration im Fett bei 3 % O<sub>2</sub> und im Knochengewebe sogar nur bei 1-2 % O<sub>2</sub> gemessen [59-61].

Es gilt also festzuhalten, dass niedrige Sauerstoffbedingungen der physiologischen Stammzellnische von MSCs entsprechen und daher als physiologisch normal einzustufen sind. Trotz allem wird in der Literatur die unter atmosphärischen Bedingungen und in herkömmlichen Zellkulturen vorliegende Konzentration von 21 % O<sub>2</sub> als gebräuchlich erachtet und mit „Normoxie“ deklariert [49, 62, 63]. Aus diesem Grund wird die Nomenklatur auch in dieser Studie beibehalten. So steht folglich „Normoxie“ für eine Sauerstoffkonzentration von 21 %, wobei der Begriff „Hypoxie“ für eine Konzentration von 2 % O<sub>2</sub> verwendet wird.

### **1.3.2.4 Überleben in Anoxie**

Das Hauptproblem des Tissue Engineerings stellt derzeit jedoch das Absterben vieler Zellen nach Reimplantation dar. So konnte gezeigt werden, dass innerhalb der ersten zwei Wochen ca. 80 % der transplantierten Zellen absterben [64, 65]. Da zur Produktion neuen Knochengewebes allerdings große Mengen von Stammzellen im Defekt benötigt werden kommt es hier nicht zur vollständigen Durchbauung des Knochens [22].

Ein entscheidender Grund für das Absterben der Zellen *in vivo* ist die mangelhafte Blutversorgung der Zellen nach Reimplantation [16, 66]. Bis zum Einwachsen der ersten Blutgefäße vergehen meist bis zu drei Wochen [67]. In dieser Zeit sind die Zellen ungenügenden Sauerstoff- und Nährstoffverhältnissen ausgesetzt. Ein Therapieansatz ist das Abhärten (Konditionieren) der Zellen gegenüber der zeitweisen Anoxie.

Die Beschriebenen Themen sollen im Rahmen dieser Studie genauer untersucht werden. Darunter die Verwendung fettgewebsentstammender MSCs, die Auswirkung von niedrigen Sauerstoffbedingungen auf das Zellverhalten *in vitro* und das Zellüberleben im sauerstofffreien Milieu.

## **1.4 Zielsetzung**

Um die Schwierigkeiten des Tissue Engineerings von Knochen zu überwinden und die Techniken weiter zu verbessern sind Kleintiermodelle unabdingbar. Es existiert eine Vielzahl von Kleintiermodellen für das Tissue Engineering von Knochen [64, 65,

68-71]. Gemeinsam ist allen Modellen jedoch die Tatsache, dass die Zellen allogenen oder xenogen transplantiert werden. Ein Modell zur autologen Stammzelltransplantation ist derzeit noch nicht etabliert. Dies liegt unter anderem daran, dass die mesenchymalen Stammzellen meist aus dem Knochenmark isoliert werden. Um auf diese Weise eine ausreichende Menge an Stammzellen zu isolieren, müssten die Tiere getötet werden um aus den großen Röhrenknochen sämtlicher Extremitäten die Zellen gewinnen zu können. Somit ist mit dieser Stammzellgewinnung keine autologe Zelltransplantation möglich. Aus diesem Grund sollen in der vorliegenden Arbeit die Eigenschaften von Zellen, welche aus dem subkutanen Fett gewonnen wurden, untersucht werden. Gelingt es daraus Stammzellen in ausreichender Zahl zu gewinnen, wäre dies ein erster Schritt in Richtung eines autologen Tiermodells.

Es ist mittlerweile bekannt dass Sauerstoff ein sehr potentes Signalmolekül darstellt und eine Vielzahl von Zellcharakteristika beeinflusst [57, 72-74]. So wurde in der Literatur die Überlegenheit der hypoxischen über die normoxische Kultivierung, bezüglich ihrer Proliferationsgeschwindigkeit, für humane MSCs beschrieben [30, 75]. Hinsichtlich der Entwicklung eines Tiermodells, zur autologen Stammzelltransplantation ist es von entscheidendem Interesse zu untersuchen welchen Einfluss der Sauerstoffgehalt *in vitro* auf die Stammzellen aus dem subkutanen Fett von Ratten hat. Daher sollen verschiedene Stammzellcharakteristika (z.B. Zellproliferation, -Morphologie, -Metabolismus, -Seneszenz, Zytoskelettmerkmale und die Fähigkeit Zellkolonien zu formen) bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen (Normoxie: 21 % und Hypoxie: 2 %) verglichen werden.

Eine weitere, wichtige Eigenschaft der Stammzellen ist die Überlebensfähigkeit unter Anoxie (0 % Sauerstoff), da dies nach Transplantation *in vivo* das Zellüberleben entscheidend mit beeinflusst. Wie oben ausgeführt, gehen während des Versuchs Stammzellen zu transplantieren der überwiegende Anteil an Zellen u.a. aufgrund von fehlender Sauerstoffversorgung innerhalb der ersten Tage verloren. Ein wichtiger Schritt wäre es die Zahl der vitalen Zellen innerhalb der ersten Woche nach Transplantation *in vivo* zu steigern. Ein Ansatz dies zu erreichen ist möglicherweise die Zellkultur in Hypoxie, da dies unter Umständen zur Abhärtung (Präkonditionierung) gegenüber den anoxischen Bedingungen führt.

Daraus ergeben sich die folgenden Fragen:

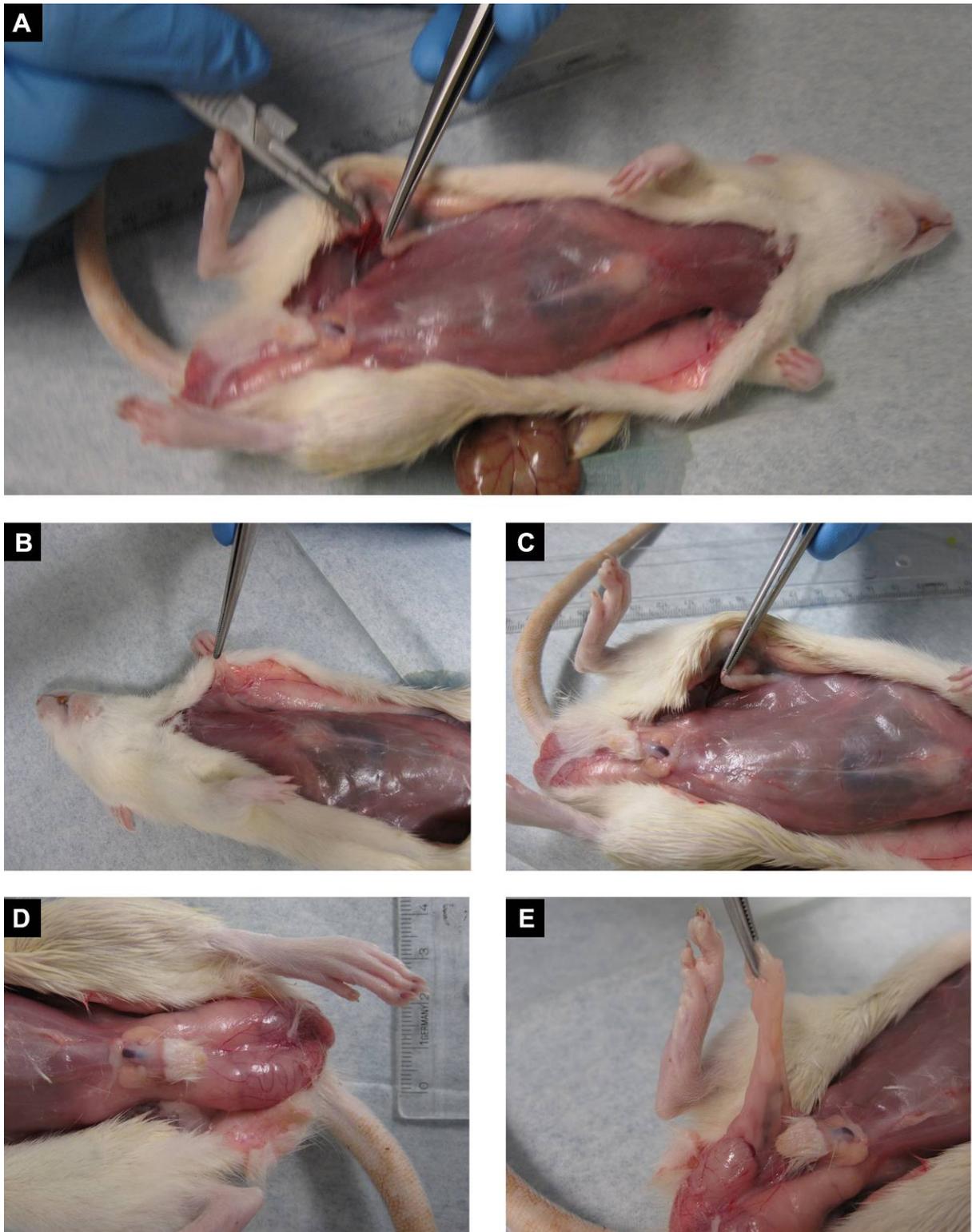
1. Gelingt es mesenchymale Stammzellen aus dem subkutanen Fettgewebe von Ratten zu isolieren?
2. Wie wirkt sich der Sauerstoffgehalt *in vitro* auf verschiedene Zellcharakteristika von adipogen gewonnenen Stammzellen der Ratte aus?
3. Lässt sich durch die Zellkultur dieser Zellen in Hypoxie das Zellüberleben in Anoxie steigern?

## **2 Materialien und Methoden**

### **2.1 Versuchstiere und Zellgewinnung**

Zur Isolierung mononuklearer Zellen dienten acht, sechs Monate alte männliche Auszucht-Ratten vom Typ Wistar, der Firma Charles River Laboratories.

Die Tiere wurden mittels CO<sub>2</sub> Inhalation getötet. Sofort im Anschluss erfolgte die Entnahme der Zellen aus dem Fettgewebe. Vorbereitend wurden die Tiere mit Ethanol (*Merck, Deutschland*) desinfiziert. Danach wurde die Haut des Abdomens längs inzidiert (**Abbildung 3, A**). Im Anschluss erfolgte die Präparation der Axel- (**Abbildung 3, B**) und Leistenregionen (**Abbildung 3, C**). Mit Hilfe von Skalpell und Pinzette wurde soviel Fett wie möglich aus den beiden Regionen entnommen. Zusätzlich erfolgte die Darstellung der Samenstränge (**Abbildung 3, D und E**) und die Extraktion des umgebenden Fettgewebes. Das gewonnene Fettgewebe stammte demnach aus Anteilen aller drei Regionen, wobei der größte Fettanteil aus dem samenstrangumgebenden Gewebe gewonnen wurde.



**Abbildung 3: Isolation mesenchymaler Stammzellen aus einer Ratte.**

Zunächst erfolgte die Lagerung der Wistar Ratte auf dem Rücken. Anschließend wurde eine Längsinzision der Haut über dem Abdomen durchgeführt [A]. Anschließend erfolgte die Präparation der axillären [B] und inguinalen [C] Regionen zur Gewinnung des subkutanen Fettes. Abschließend wurden die Samenstränge dargestellt [D] und das umgebende Fettgewebe entnommen [E].

Nach der Extraktion wurde das Fett gewogen und möglichst fein geschnitten. Das zerteilte Fettgewebe wurde anschließend in einem Polypropylen (PP)-Röhrchen (*Sarstedt, Deutschland*) mit Kollagenase (*Worthington Biochemical Co., USA*) verdaut. Dazu wurde das Fett mittels 0,1 %-iger Kollagenase II in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) (*PAA Laboratories GmbH, Österreich*) lysiert. Diese Suspension wurde 40 Minuten im Wasserbad bei 37 °C erwärmt und im Anschluss daran die übrig gebliebenen Bindegewebsbestandteile abfiltriert. Danach wurde der Fettsuspension dieselbe Menge an Kulturmedium hinzugefügt, um den enzymatischen Verdau zu beenden.

Die Suspension wurde 5 Minuten lang bei 1000 g zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das zurückgebliebene Zellpellet wurde in eine 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche (*Nunc, Deutschland*) überführt und wie in Kapitel 2.2 beschrieben kultiviert. Während der ersten fünf Tage wurden dem Kulturmedium zusätzlich 100 µl Patricin (*Biochrom AG, Deutschland*) zum Schutz vor Pilzinfektionen zugefügt.

## 2.2 Zellkultur

Folgendes Kapitel beschreibt den allgemeinen Umgang mit den aus Ratten gewonnenen mesenchymalen Stammzellen. Der Ablauf wurde bei allen nachkommenden Experimenten eingehalten.

Die aus den acht Ratten stammenden mononuklearen Zellen wurden in Kultur gebracht. Dabei wurde die gewonnene Fettmenge halbiert und von diesem Zeitpunkt an bei unterschiedlichen Bedingungen kultiviert. Die Kontrollgruppe wurde dazu unter atmosphärischen Partialdrücken (21 % O<sub>2</sub>) (normoxisch), die Versuchsgruppe unter sauerstoffarmen (2 % O<sub>2</sub>) (hypoxischen) Bedingungen kultiviert. Die Kontrollgruppe wurde dafür in einem Brutschrank (*Hera cell 240, Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland*) unter Standardbedingungen bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 21 % O<sub>2</sub> kultiviert, wohingegen die Zellen der Versuchsgruppe in einem speziellen Gas Inkubator (*MCO-5M, Sanyo, Deutschland*) aufbewahrt wurden. Während alle anderen Bedingungen identisch blieben, wurde in diesem Inkubator, mittels Stickstoff-Einstrom (*Linde, Deutschland*) ein konstanter Sauerstoffpartialdruck von 2 % realisiert. Zur Arbeit mit den Zellen, z.B. bei Passagewechseln oder bei

verschiedenen Experimenten, ließ es sich nicht vermeiden die Zellen kurzzeitig atmosphärischen (normoxischen) Sauerstoffbedingungen auszusetzen.

Es wurde für beide Zellgruppen das gleiche Kulturmedium (*DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) High Glucose (4,5 g/l) mit L-Glutamine und Natrium Pyruvat, PAA Laboratories GmbH, Österreich*) eingesetzt. Dem Medium wurden 10 % eines fetalen Rinderserums (FBS) (*Sigma, Deutschland*) und 1 % eines Antibiotikagemisches, bestehend aus Penicillin und Streptomycin, (*PAA Laboratories GmbH, Österreich*) zugeführt. Alle drei bis vier Tage wurde das Medium gewechselt.

Arbeiten an den Zellen wurden ausschließlich unter sterilen Bedingungen unter einer Zellkulturarbeitsbank (*Heraeus, Deutschland*) verrichtet, welche über einen kontinuierlichen laminaren Luftstrom verfügt. Zum Absaugen von Flüssigkeiten aus den Kulturflaschen wurden sterile Kunststoffpipetten (*Brand, Deutschland*) und ein Vakuumsauger (*Neuberger, Deutschland*) verwendet.

### **Passagewechsel**

Eine Zellübersiedlung der Kulturflaschen wurde, durch rechtzeitiges Passagieren, bei einer Konfluenz von 50 – 70 %, vermieden. Dafür wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mittels 0,01 %-iger Trypsin-Lösung (*PAA Laboratories GmbH, Österreich*) vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Um einer Permeabilisierung der Zellen, durch das Trypsin vorzubeugen, wurde die doppelte Menge an Medium zugeführt und die gesamte Suspension in PP-Röhrchen überführt.

Die Auszählung der Zellen erfolgte automatisiert maschinell durch Verwendung eines Zellzählers (*Cedex XS, Roche Innovatis, Deutschland*) mit passender Zählkammer (*Cedex XS smart slide, Roche Innovatis, Deutschland*). Nach der Zählung wurde in Kontroll- und Versuchsgruppe eine, vom jeweiligen Versuchsaufbau abhängige Anzahl an Zellen wieder ausgesät.

### **Kryokonservierung**

Zur langfristigen Konservierung der dem Fettgewebe der Ratte entstammenden MSCs (adMSC(rat)) wurden die Zellen trypsiniert und in PP-Röhrchen zentrifugiert. Das Medium wurde abgesaugt und dem übriggebliebenen Zellpellet am Boden des

Röhrchens Kryomedium zugeführt. Zur Herstellung des Kryomediums wurden 70 % DMEM mit 20 % FBS und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) (*Merck, Deutschland*) gemischt. Nachdem sich das Zellpellet im Kryomedium gelöst hatte, wurde jeweils 1 ml davon in ein Kryogefäß (*Nalgene, USA*) überführt. Es wurden maximal 3.000.000 Zellen in einem Kryogefäß deponiert. Die Kryogefäße wurden direkt im Anschluss mittels Trockeneis eingefroren und bei -80 °C im Gefrierschrank gelagert.

Das Auftauen der Zellen begann mit dem Erwärmen der Kryogefäße im Wasserbad bei 37 °C. Sobald der Inhalt geschmolzen war, wurde die Zellsuspension in eine 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche, gefüllt mit 10 ml Kulturmedium, überführt. Die Zellen wurden anschließend zur Adhäsion einen Tag im Brutschrank kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Medium zwecks Eliminierung des DMSO gewechselt.

### 2.3 Zellcharakterisierung

Die Rolle wesentlicher Charaktereigenschaften von Stammzellen wird im Diskussionsteil näher beschrieben. Hinsichtlich der in dieser Studie untersuchten adMSC(rat) wurde sich wie in Kapitel 4.2 beschrieben, in Analogie zum Menschen, auf drei von Dominici et. al festgelegte Hauptkriterien geeinigt [76].

- Plastikadhärens
- Multipotentes Differenzierungspotential
- Expression spezifischer Oberflächenantigene

Die Plastikadhärens stellte gleichzeitig eine Grundvoraussetzung für die Kultivierung der Zellen in aus Plastik bestehenden Kulturgefäßen dar. Sie galt durch die positiv verlaufende Zellkultur als erfüllt und wurde im Folgenden nicht weiter untersucht.

#### 2.3.1 Differenzierung

##### **Adipogene Differenzierung**

Die adipogene Differenzierung erfolgte mittels Zellen der fünften Passage. Diese wurden bis zum Erreichen einer ausreichenden Zellzahl in separaten Ansätzen hypoxisch und normoxisch kultiviert und anschließend auf 6-Well Kulturschalen

(Nunc, Deutschland) ausgesiedelt. Jedes Well wurde dabei mit 50.000 Zellen besiedelt und 7 Tage lang, bis zum Erreichen einer 100 %-igen Konfluenz kultiviert.

Zur adipogenen Differenzierung waren zwei verschiedene Medien, ein Induktions- und ein Erhaltungsmedium, erforderlich. Das Erhaltungsmedium bestand aus 88,6 % DMEM, 10 % FBS, 0,4 % Penicillin/Streptomycin und 1 % Insulin (*Sigma-Aldrich, USA*). Zur Herstellung des Induktionsmediums wurden 86 % DMEM, 10 % FBS und 0,4 % Penicillin/Streptomycin mit 2 % Dexamethason, 0,4 % Indomethacin sowie 0,2 % 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) (alle *Sigma-Aldrich, USA*) zu einer Lösung vermischt.

Der Start der Differenzierung erfolgte indem zunächst drei Wells pro Spender mit 2 ml des Induktionsmediums gefüllt wurden. Nach 5 Tagen wurde das Induktionsmedium abgesaugt und die Zellen nun für 2 Tage mit 2 ml des Erhaltungsmediums versorgt. Dieser 5 zu 2 Zyklus wurde in der folgenden Woche auf dieselbe Art und Weise wiederholt, sodass die Kultivierung insgesamt zwei Wochen dauerte. Gleichzeitig wurden drei Wells pro Spender zur Kontrolle mit normalem Kulturmedium behandelt, welches ebenfalls nach 5 und 2 Tagen gewechselt wurde. Die Zellen blieben während der gesamten Versuchsdauer, mit Ausnahme der Mediumwechsel, unter ihren speziellen Sauerstoffbedingungen.

Nach zwei Wochen Kultivierung, wurde der Versuch beendet und die Fettvakuolen farblich dargestellt. Dafür wurde Oil-Red-O (*Sigma-Aldrich, USA*), ein spezieller Farbstoff zum Anfärben von Lipiden verwendet. Nach Herstellerangaben wurde zunächst eine 0,3 %-ige Stocklösung des Oil-Red-O hergestellt, bevor durch 3:2 Verdünnung mit destilliertem Wasser eine Arbeitslösung entstand. Diese wurde dann für 10 Minuten stehen gelassen und abfiltriert. Nach Herstellung der Arbeitslösung wurden die Zellen in den 6-Well Kulturschalen zunächst dreimal mit PBS +  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  gewaschen und in 4 %-igem Paraformaldehyd (*MicroCos GmbH, Deutschland*) fixiert. Nach 15 Minuten wurde das Paraformaldehyd mit destilliertem Wasser von den 6-Wells abgewaschen und die Farbstofflösung anschließend in die Wells pipettiert. Nach 20 Minuten wurde diese ebenfalls mittels destillierten Wassers entfernt.

Dargestellt wurde die Färbung mit einer Farbkamera (*Axiocam ICc3, Carl-Zeiss, Deutschland*) unter dem Mikroskop (*Axiocvert, 40 CFL, Carl-Zeiss, Deutschland*) in 100-facher und 200-facher Vergrößerung.

Zur Quantifizierung der Ergebnisse wurde der Versuch wiederholt und anstelle der Färbung mit AdipoRed Assay Reagent<sup>®</sup> (*Lonza, Schweiz*) behandelt. Das Reagenz basiert auf Nilrot (7-diethylamino-3,4-benzophenoxzine), einem Farbstoff, der in Verbindung mit hydrophoben Lipiden ein Fluoreszenzsignal abgibt. Diese Eigenschaft ermöglicht eine quantitative Aussage über die Menge an Fett in den 6-Well Schalen. Zu diesem Zweck wurden in jedes Well 140 µl Reagenz und 5 ml PBS (mit Kalzium und Magnesium) gefüllt. Nach 10 Minuten wurden die 6-Well im Fluorometer (*Safire<sup>2</sup>, Tecan, Schweiz*) platziert und die Fluoreszenzintensität bei einer Exzitation von 485 nm und einer Emission von 572 nm bestimmt.

### **Osteogene Differenzierung**

Die osteogene Differenzierung wurde in einer 6-Well-Kulturschale durchgeführt. Es wurden hypoxische und normoxische Zellen der fünften Passage verwendet. Hierbei wurden 30.000 Zellen ausgesät und die Differenzierung nach 7 Tagen, beim Erreichen einer 70 %-igen Konfluenz gestartet. Das Medium, bestehend aus 87,9 % DMEM, 10 % FBS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 0,1 % Calcitriol (*Sigma-Aldrich, USA*), 0,6 %  $\beta$ -Glycerophosphat (*Sigma-Aldrich, USA*) und 0,4 % Ascorbinsäure (*Sigma-Aldrich, USA*), wurde alle drei bis vier Tage gewechselt und die Differenzierung nach fünf Wochen gestoppt. Gleichzeitig wurden zur Kontrolle von jedem Spender in der jeweiligen Versuchsgruppe Zellen mit normalem Kulturmedium behandelt.

Die Färbung der osteogenen Differenzierung erfolgte mittels Alizarin Red S Farbstofflösung (*Sigma-Aldrich, USA*). Osteogen differenzierte Zellen produzieren Kalzium, welches mit Alizarin Red S Chelat-Komplexe ausbildet. Nach Herauswaschen des Farbstoffs bleibt der Farbstoff also nur an kalziumreichen Stellen haften.

Zur Herstellung der Färbelösung wurden zunächst 0,34 g Alizarin Red S 40 mM in 20 ml destilliertem Wasser gelöst. Anschließend wurde der pH-Wert mittels Ammonium-Hydroxid auf 4,1 eingestellt und die Lösung durch Zugabe von

destilliertem Wasser auf 25 ml aufgefüllt. Vor der Anwendung wurde die Lösung abfiltriert.

Der Zellrasen in den 6-Well Kulturschalen wurde zu Beginn zweimal mit PBS +  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  gewaschen, bevor er 15 Minuten mit 4 %igem Formaldehyd fixiert wurde. Nach dreimaligem Spülen mit destilliertem Wasser erfolgte daraufhin die Zugabe von 1 ml Farbstofflösung pro Well. Eine Einwirkzeit von 20 Minuten wurde abgewartet und anschließend der freie Farbstoff mittels destilliertem Wasser abgelöst.

Zur Darstellung wurden unter dem Mikroskop Farbaufnahmen in 100- und 200-facher Vergrößerung gemacht.

Die Quantifizierung erfolgte nach einem Protokoll von Millipore (*Osteogenesis Quantitation Kit; Millipore, Deutschland*). Dabei wurden die Zellrasen zunächst für 30 Minuten mit 1,2 ml 10 %-iger Essigsäure gelöst, bevor sie mittels Zellkratzer vom Plastikuntergrund entfernt wurden. Zusammen mit der Essigsäure wurden die Zellrasen in 2 ml Eppendorf Gefäße (*Eppendorf, Deutschland*) überführt. Nach schütteln wurde die homogene Suspension nun für 10 Minuten auf 85 °C erhitzt (*Thermomixer Komfort, Eppendorf, Deutschland*). Gleich im Anschluss wurden sie 5 Minuten auf Eis gelegt und danach für 15 Minuten bei 13.000 g zentrifugiert. Aus dem Überstand wurden 400 µl in 150 µl Ammoniumhydroxid gelöst. Aus der Lösung wurden schließlich 150 µl auf eine 96-Well Kulturschale aufgetragen und die optische Dichte bei 405 nm unter den Mikroplattenleser (*Multiscan FC, Thermo scientific, Deutschland*) bestimmt. Zur Bestimmung der Konzentration an Alizarin Red S in dem Überstand wurde eine Standardgerade erstellt. Dabei wurden die optischen Dichten von bekannten Alizarin Red Konzentrationen (31,3 µM bis 2.000 µM) gemessen und die daraus entstandene Geradengleichung bestimmt. Die gemessenen optischen Dichte-Werte der Differenzierung wurden in die Geradengleichung eingesetzt und auf diese Weise mit bekannten Konzentrationen verglichen.

### 2.3.2 Oberflächenprofil

Die Analyse der Oberflächenproteine erfolgte mittels Durchflusszytometrie (FACS - fluorescence activated cell sorting). Das Verfahren beruht auf der Emission von optischen Signalen, beim Passieren eines Lasers. Die Zellen werden dafür in Lösung

gebracht und anschließend einzeln in eine Kapillare gesaugt, in der sie mit einem Laser beschossen werden. Gemessen wird das optische Signal, welches nun von den Zellen abgegeben wird.

Um selektiv bestimmte Oberflächenantigene nachzuweisen, wurden diese mit fluoreszierenden Antikörpern gefärbt. Die Antikörper gehen jedoch neben der spezifischen Bindung mit dem Oberflächenantigen auch unspezifische Bindungen mit der Zelle ein. Aus diesem Grund wurden die Zellen zusätzlich mit einer entsprechenden Iso-Kontrolle gefärbt, welche nur unspezifische Bindungen einget (Tabelle 1). Durch die unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten war es möglich die zwei Bindungstypen von einander zu unterscheiden, sodass in der Auswertung der Anteil an spezifischen Bindungen dargestellt werden konnte.

Die Zellen wurden dazu zunächst abgelöst und auf 10 ml PP Röhrchen verteilt. Anschließend wurden die Zellen bei 500 g fünf Minuten zentrifugiert und der Überstand an Medium abgesaugt. Zwecks vier Oberflächenantigenen wurden die Zellen in 800 µl PBS resuspendiert und auf vier FACS-Röhrchen, je 200 µl, aufgeteilt. Darauffolgend wurden jedem Röhrchen 5 µl der entsprechenden Antikörper (*BioLegend, USA*), in Verbindung mit der entsprechenden Iso-Kontrolle (*BioLegend, USA*), zugefügt und das Gemisch für 20 Minuten im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden nun zweimal gewaschen, indem sie zunächst zentrifugiert und anschließend in PBS resuspendiert wurden. Die gefärbten Zellen wurden schließlich im Durchflusszytometer (*FACSCalibur, B&D Science, USA*) eingelesen und mittels FlowJo Software (*Tree Star Inc., USA*) ausgearbeitet.

**Tabelle 1: Oberflächenmarker**

Es wurden die verwendeten Oberflächenmarker und ihre zugehörigen Iso-Kontrollen präsentiert.

<b>Oberflächenmarker</b>	<b>Iso-Kontrolle</b>
FITC anti-rat CD11b/c (Cat#: 201805; BioLegend, USA)	FITC Mouse IgG2a, κ Isotype Ctrl (Cat#: 400207; BioLegend, USA)
FITC anti-rat CD90/mouse CD90.1 (Cat#: 202503; BioLegend, USA)	FITC Mouse IgG1, κ Isotype Ctrl (Cat#: 400107; BioLegend, USA)
PE anti-mouse / rat CD29 (Cat#: 102207; BioLegend, USA)	PE Armenian Hamster IgG Isotype Ctrl (Cat#: 400907; BioLegend, USA)
PE anti-rat CD45 (Cat#: 202207; BioLegend, USA)	PE Mouse IgG1, κ Isotype Ctrl (Cat#: 400111; BioLegend, USA)

## 2.4 Zellcharakteristika

Die im folgenden beschriebenen Experimente wurden durchgeführt um Unterschiede der Zellcharakteristika, welche durch den Sauerstoffgehalt *in vitro* bedingt sind, zu untersuchen. Die Versuche wurden in verschiedenen Passagen durchgeführt, um so zusätzlich die Zellcharakteristika im zeitlichen Verlauf untersuchen zu können.

### 2.4.1 Populationsverdopplung

Zum Erstellen einer Populationsverdopplungskurve wurden beide Versuchsgruppen 180 Tage kultiviert. Die jeweiligen Passagewechsel wurden ab einer Konfluenz von 50 – 70 % durchgeführt. Dabei erfolgte die Kultivierung in 25 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen, in welche nach jedem Passagewechsel 50.000 Zellen ausgesät wurden. Bei jedem Passagewechsel wurden die Zellen zusätzlich standardisiert mittels Zellzähler ausgezählt und das Populationswachstum bestimmt. Aus diesen Werten wurde die Populationsverdopplungsrate nach der Formel

$$PD = \frac{\lg\left(\frac{Z}{A}\right)}{\lg 2}$$

- PD = Populationsverdopplung  
 Z = Zellzahl bei Passagewechsel  
 A = ausgesäte Zellzahl

berechnet [77-79]. Die für die Auswertung entscheidende kumulative Populationsverdopplungsrate ergab sich schließlich aus der Addition aller Populationsverdopplungen. Außerdem wurde die Populationsverdopplungszeit, also die Anzahl der Zellteilungen während einer bestimmten Zeitspanne, bestimmt.

### 2.4.2 Colony Forming Unit

Als weiterer Nachweis für die Wachstumspotenz, wurde die Colony Forming Unit (CFU) durchgeführt.

Es wurden pro Spender und Gruppe drei Versuche angesetzt. Dafür wurden je 800 Zellen auf einer Petrischale (*Becton Dickinson, USA*) in 7 ml Kulturmedium ausgesät. Nach zehn Tagen wurden die Kultivierung gestoppt und die entstandenen Kolonien gefärbt. Dazu wurde der Zellrasen zunächst mehrfach mit PBS gespült und anschließend 3 ml, 0,005 %-iger Farbstofflösung (*Crystal Violet, SIGMA-Aldrich, USA*) zugefügt. 10 Minuten später wurde der Farbstoff mittels PBS unter durchgehendem Schütteln wieder aus der Petrischale herausgewaschen, so dass er nur in den gefärbten Zellkolonien zurück blieb. Die Kolonien wurden nun manuell ausgezählt. In die Zählung miteinbezogen wurden dabei alle Kolonien zwischen 1 mm und 8 mm Durchmesser [80].

### 2.4.3 Morphologie

Die morphologische Darstellung der adMSC(rat) erfolgte nach einem von diesem Labor etablierten Protokoll [42].

Dabei wurden zunächst von jedem Spender zweimal 40.000 Zellen in einer 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche ausgesät und zwei Tage unter den unterschiedlichen Sauerstoffbedingungen kultiviert. Der Färbezeitpunkt wurde so gewählt, dass eine Konfluenz von 50 % nicht überschritten wurde, den Zellen aber trotzdem genügend Zeit blieb sich vollständig zu adhären. Sobald dieser Zeitpunkt eingetroffen war, wurde der Zellrasen zunächst mit PBS gespült und anschließend mit Carboxyfluorescein-Diacetat (CFDA) (*Sigma-Aldrich, USA*) gefärbt. CFDA diffundiert durch die Zellmembran hindurch und wird dort von zelleigenen Esterasen zu membranimpermeablen Carboxyfluorescein gespalten. Es erhält seine Farbstoffeigenschaft folglich erst im Inneren der Zelle, wodurch ein starker Kontrast bei den Fluoreszenzaufnahmen entsteht.

Nach 15 Minuten wurde der Farbstoff abgesaugt und der Zellrasen dreimal mit PBS (mit Kalzium und Magnesium) gewaschen um Überreste zu entfernen. Während der gesamten Färbung war der Farbstoff keinem Lichteinfluss ausgesetzt. Nun wurden unter dem Mikroskop (*Axiocvert S100, Carl-Zeiss, Deutschland*) sowohl Phasenkontrast als auch Fluoreszenzbilder aufgenommen (*Axiocam MRm, Carl Zeiss, Deutschland*). Benutzt wurde dabei eine Software von AxioVision (*Carl Zeiss, Deutschland*), welche es ermöglichte, mehrere Aufnahmen aneinander zu fügen, sodass die Gesamtgröße eines Bildes  $10.000 \times 10.000 \mu\text{m}^2$  betrug. Von jedem Tier und jeder Versuchsgruppe wurden fünf solcher Aufnahmen gemacht. Dies entsprach pro Passage und Versuchsgruppe ca. 5.000 aufgenommenen Zellen.

Zur Auswertung wurde das Programm ImageJ (*Open source project, NIH, USA*) verwendet [81]. Diese Software ermöglichte es, die Fläche sowie den längsten und kürzesten Durchmesser aller Zellen zu bestimmen. Die Zellgrenzen wurden durch Einstellen des „Thresholds“ für jedes Bild speziell festgelegt. In der Nachbearbeitung wurden alle sich überlappenden Zellen sowie die sich am Bildrand befindenden Zellen manuell entfernt, sodass nur einzelne, vollständige Zellen in die Auswertung mit eingingen. Des Weiteren wurde die Fläche von 200 möglichst kleinen Zellen manuell bestimmt und danach Objekte mit einer noch kleineren Fläche ( $< 1300 \mu\text{m}^2$ ) extrahiert. Manuelle Kontrollen der Computerdaten zeigten, dass es sich dabei um optische Verunreinigungen handelte.

### 2.4.4 Zytoskelettfärbung

Die Färbung des Zytoskeletts wurde durchgeführt, um Aussagen über die unterschiedliche Anordnung der Actinfilamente in norm- und hypoxischen Bedingungen zu treffen.

Die Zytoskelettfärbung der zwei Zellgruppen wurde auf unbeschichteten Glasobjektträgern (*Menzel-Gläser, Deutschland*) durchgeführt. Zur Überführung der Zellen auf die Objektträger wurden die Zellen zunächst trypsinisiert und dann 2500 Zellen auf das Glas ausgesiedelt. Die Objektträger wurden in Kulturschalen (*Nunc, Deutschland*) eingelegt und nach 90 Minuten Adhärenzzeit, vollständig mit Kulturmedium bedeckt. Nun wurden die Zellen 48 Stunden kultiviert, bis sie ihren

typischen morphologischen Charakter eingenommen hatten. Die Objektträger wurden anschließend aus dem Medium genommen und zunächst in PBS gewaschen. Als nächstes erfolgte eine 15-minütige Fixierung der Zellen mit 4 % Paraformaldehyd und erneutes Waschen mit PBS. Folgend wurden die Zellen 5 Minuten lang mit 2 % Triton-X-100 (*Sigma-Aldrich, USA*) permeabilisiert und nach erneutem Waschen, mit einem Fettstift, (*DAKO-Pen, DAKO Deutschland GmbH, Deutschland*) ein Feld abgegrenzt. Anschließend wurden 200 µl, 15-fach verdünntes, Phalloidin-Alexa®546 (*Invitrogen, Deutschland*) auf das Feld aufgetragen und 30 Minuten einwirken lassen. Phalloidin ist ein cyclisches Alkaloid des weißen Knollenblätterpilzes (*Amanita phalloides*) und bindet hochspezifisch an die f-Actin Stränge. Im Anschluss daran wurden 200 µl, 10.000-fach verdünntes, 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (*Invitrogen, Deutschland*) für 5 Minuten aufgetragen und danach die Objektträger gewaschen. DAPI seinerseits ist ein Kernfarbstoff und lagert sich spezifisch an dsDNA an. Durch die Kernfärbung wurde es möglich, Zellen voneinander abzugrenzen. Um nicht durch Lichteinfluss frühzeitig auszubleichen, fanden sämtliche Färbeschritte in einem verdunkelten Raum statt.

Abschließend wurden Deckgläser zum Schutz der Zellen auf die Objektträger geklebt (*Klebstoff, Mowiol, Kremer Pigmente GmbH & Co. KG, Deutschland*) und die Objektträger für eine Nacht bei 4 °C in den Kühlschrank gestellt. Die Zellen wurden unter dem Mikroskop (*Axioscope, Carl Zeiss, Deutschland*) mit passenden Bandpassfiltersätzen (DAPI: 358 nm / 463 nm; Alexa®546: 563 nm / 573 nm) aufgenommen.

### 2.4.5 Zellmetabolismus

Durch dieses Experiment wurden Aktivitätsunterschiede der beiden Kultivierungsmethoden bezüglich des Zellmetabolismus dargestellt.

Zu diesem Zweck wurde ein Water soluble tetrazolium (WST-1) Assay (*Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Deutschland*) zum Nachweis einer intakten Atmungskette durchgeführt. Viable, lebendige Zellen mit einem funktionierenden mitochondrialem Apparat setzen dabei das hellrote WST-1 Reagenz zu Formazan um. Die Reaktion bewirkt einen Farbumschlag von hell zu dunkel rot, welcher mittels Spektralphotometer gemessen und ausgewertet werden kann. Da vermeidlich

inaktivere Zellen das Reagenz geringer umsetzen, können durch den Test Unterschiede im Zellmetabolismus aufgezeigt werden.

Zunächst wurden die norm- und hypoxisch kultivierten Zellen auf getrennten 24-Well Platten aufgetragen. Jeder der drei Spender war dabei durch drei Wells mit je 2500 Zellen repräsentiert. Um eine ausreichende Zelladhäsion herzustellen, wurden die zwei Platten für 24 Stunden zurück in die Inkubatoren gestellt, bevor der eigentliche Versuch gestartet wurde.

Am nächsten Tag wurde das Kulturmedium aus den Wells abgesaugt und in jedes Well 400 µl des 10-fach verdünnten WST-1 Reagenzes pipettiert. Während der folgenden vierstündigen Inkubation, erfolgte die Umsetzung von Tetrazoliumsalz zu Formazan und damit auch der Farbumschlag. Gleich im Anschluss wurde das unterschiedlich verfärbte Reagenz in eine 96-Well Platte überführt und photometrisch gemessen. Der verwendete ELISA Reader (*Multiskan FC, Thermo Scientific, Deutschland*) maß die Absorption im Wellenlängenbereich von 450 nm.

Zum besseren internen Vergleich wurden zu beiden Ansätzen Kontrollen angelegt. Diese bestanden aus einfachem Reagenz ohne Zellen. Die Absorption der Kontrolle wurde bei der Auswertung von der zugehörigen Gruppe abgezogen und die Versuchsgruppen zueinander in Relation gesetzt.

### 2.4.6 Seneszenz

Ein bekannter Marker für Zellseneszenz ist die lysosomale Beta-Galaktosidase. Wie bereits von Dimri et al. beschrieben, gibt die Aktivität an Beta-Galaktosidase Aufschluss über das Alter humaner Zellen [82]. Unlängst wurde demonstriert, dass selbiger Zusammenhang auch bei Tieren besteht [83-85].

Um einen Einblick auf das Zellalter zu erlangen, wurde hier der Beta-Glo™ Assay (*Promega, USA*) durchgeführt. Dabei wird in einer gekoppelten Enzymreaktion zunächst das Substrat, 6-O-β-galactopyranosyl luciferin, mittels Beta-Galaktosidase zu freiem Luciferin katalysiert, bevor in der folgenden, durch Luciferase katalysierten, Reaktion ein Lumineszenzsignal entsteht. Dieses verhält sich proportional zu der Menge an Beta-Galaktosidase und spiegelt daher die Seneszenz wieder.

Durchgeführt wurde der Assay nach Herstellerangaben auf einer vom Boden blickdichten 96-Well Kulturschale (*Nunc, Deutschland*). Jede der drei Ratten wurde durch jeweils vier Wells je 2500 Zellen normoxisch und hypoxisch vertreten. Nach 24 Stunden Adhärenz Zeit wurden die Wells mit 200 µl einer 1:1 Mischung aus Reagenz und Kulturmedium bedeckt und folgend für eine Stunde im dunkeln bei Raumtemperatur belassen. Anschließend wurde die Lumineszenz mittels Monochromator (*Safire<sup>2</sup>, Tecan, Schweiz*) für eine Wellenlänge von 560 nm bestimmt.

## 2.5 Überleben in Anoxie

In diesem Experiment wurden die unter Norm- und Hypoxie kultivierten Zellen auf ihre Überlebensfähigkeit unter Anoxie (0 % O<sub>2</sub>) getestet. *In vitro* wurde auf diese Weise die Situation nach Reimplantation in den Knochendefekt, vor Einwachsen der ersten Gefäße simuliert. Das zu diesem Zweck neu etablierte Protokoll wird im Folgenden beschrieben.

### 2.5.1 Versuchsaufbau

Es wurden adMSC(rat) aus Passage 3 aufgetaut und unter den beiden unterschiedlichen Sauerstoffbedingungen expandiert. Nach Erreichen einer suffizienten Zellzahl wurden die Zellen auf runden 10 cm Zellkulturschalen ausgesät. Für jede Versuchsgruppe wurden 20 Schalen mit je 100.000 Zellen angesetzt. Davon wurden am folgenden Tag drei Schalen aus jeder Versuchsgruppe in einem Anoxiegefäß (**Abbildung 4**) platziert. Insgesamt wurden vier Gefäße beladen. Die acht übrig gebliebenen Schalen wurden zur Kontrolle in den norm- und hypoxischen Brutschränken belassen.

Bei den Anoxiegefäßen handelt es sich um Gefäße, welche einen luftdichten Verschluss zulassen. Zum Erzeugen eines Sauerstofffreien Milieus, wurden AnaeroGen Beutel (*Oxoid, United Kingdom*) in die Gefäße eingelegt. Diese absorbieren den vorhandenen atmosphärischen Sauerstoff und entwickeln gleichzeitig Kohlendioxid. Es wurde demnach ein Milieu mit 0 % O<sub>2</sub> erzeugt. Der

Sauerstofflevel wurde mittels, in den Gefäßen installierten Messsonden, kontrolliert (**Abbildung 20**). Die Messungen erfolgten computergesteuert alle fünf Minuten.

Die vier Anoxiegefäße wurden nach dem starten des Versuchs in den Brutschrank bei 37 °C gestellt. Nach vier, fünf, sechs und sieben Tagen wurde jeweils ein Gefäß geöffnet und die Versuchsgruppen auf das Zellüberleben überprüft.



**Abbildung 4: Anoxiegefäß**

Abgebildet wurde ein Anoxiegefäß mit der dazugehörigen Halterung für die Petrischalen.

### 2.5.2 Apoptosefärbung

Um den Zustand der Zellen nach Exposition in Anoxie darzustellen, wurde ein Apoptosis Detection Kit (*AbD Serotec, United Kingdom*) bestehend aus Annexin V und Propidium Iodid (PI) verwendet.

Annexin V ist ein Protein, welches in der Lage ist an Phosphatidylserin (PS) zu binden. Da PS bei intakten Zellen auf der Innenseite der Membran verankert ist, und nur bei apoptotischen Zellen auf der Außenseite exprimiert wird, konnten durch Annexin V die apoptotischen Zellen detektiert werden [86]. Tote Zellen wurden durch das an DNA bindende PI dargestellt, während lebendige Zellen gar nicht gefärbt wurden. Auf diese Weise gelang eine Aufteilung in lebendige, tote, früh- und spät apoptotische Zellen.

Bei der Färbung wurde zunächst das Medium aus den Petrischalen abgesaugt. Um dabei die im Medium schwimmenden apoptotischen und toten Zellen nicht zu verlieren wurde das Medium aufbewahrt. Anschließend wurden die noch adhären, lebendigen Zellen trypsiniert und mit dem entnommenen Medium vermischt. Das Zellgemisch wurde nun zentrifugiert (500 g, 5 Minuten) und anschließend in 200 µl PBS gewaschen. Die Zentrifugation wurde wiederholt und die Zellen danach in 200 µl Binding Buffer gelöst. Darauf folgend wurden die Zellen mit Annexin V gefärbt (5 µl) und für 20 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Anschließend wurden die Zellen erneut zentrifugiert, in Binding Buffer gelöst und diesmal mit 10 µl Propidium Iodid gefärbt.

### 2.5.3 FACS Auswertung

Die Zellen wurden abschließend in FACS-Röhrchen überführt und im Durchflusszytometer eingelesen. Zur Programmeinstellung wurden ungefärbte, sowie alleinig mit PI oder Annexin gefärbte Zellen verwendet.

## 2.6 Statistische Analyse

Bei den gesammelten Daten handelte es sich durchgehend um unabhängige metrische Daten. Es wurde zu Beginn der statistischen Auswertung die Parametrie, bzw. die Verteilung, der Daten überprüft. Zu diesem Zweck wurde der D'Agostino Pearson Test angewendet. Dieser bestimmt zunächst die Abweichung der Symmetrie und Wölbung von der Gaußschen Normalverteilungsglocke und berechnet anschließend aus der Summe einen gemeinsamen p-Wert.

Zur Überprüfung der Signifikanz aller nicht normalverteilten, nicht parametrischen Daten ( $p \leq 0,05$ ) wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Ergab sich für die Daten eine Gaußsche Normalverteilung ( $p \geq 0,05$ ), wurden, abhängig von ihrer Verteilung in der Grundgesamtheit, verschiedene Tests durchgeführt. Bei signifikantem Unterschied der beiden zu vergleichenden Varianzen ( $p \leq 0,05$ ) wurde der Welch-Test angewendet, im anderen Fall ( $p \geq 0,05$ ) der t-Test bevorzugt. Die Berechnung der Varianzen erfolgte mittels F-Test.

Die statistische Analyse wurde mittels Graph Pad Prism (*Graph Pad Software, Inc.*<sup>®</sup>, USA) durchgeführt.

Im folgenden Ergebnisteil wurden immer die Mittelwerte aus allen drei Tieren dargestellt. Die Fehlerbalken entsprechen durchgehend der Standardabweichung.

### **3 Ergebnisse**

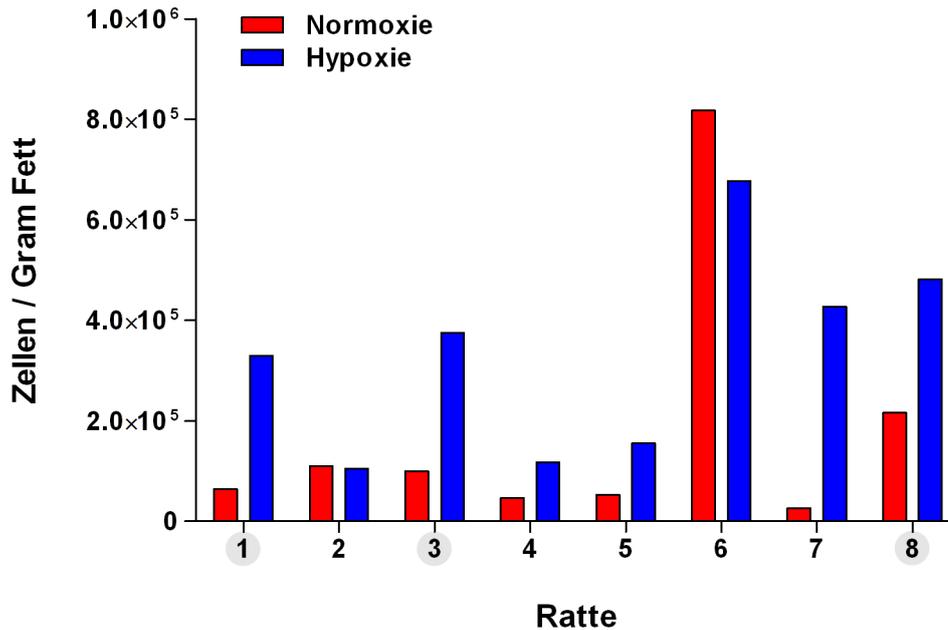
#### **3.1 Extraktion von Zellen aus acht Ratten**

Es wurde insgesamt aus acht Ratten Fett isoliert. Die Menge an entnommenem Gewebe lag dabei zwischen 1,5 g und 5,1 g Fett. Nach enzymatischer Zersetzung gelang es aus allen acht Fettsuspensionen Zellen zu isolieren und unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen zu kultivieren. Da bei den isolierten Zellen große Differenzen bezüglich der Zellzahl bestanden, wurde, zum besseren Vergleich zwischen den Tieren das Verhältnis von Zellen zu entnommenem Fettgewebe gebildet (**Abbildung 5**).

Die adhärennten Zellen wurden nach fünf Tagen zum ersten Mal passagiert und gezählt. Zu diesem Zeitpunkt wurde deutlich, dass bei sechs von acht Ratten sich die unter Hypoxie kultivierten Zellen (HC) schneller vermehrt hatten, als die Zellen in Normoxie (NC). Alleine bei den Zellen aus Tier Nummer 2 und 6 zeigte sich ein schnelleres Wachstum unter Normoxie. Des Weiteren fiel auf, dass die Zellen von Tier 6 in beiden Versuchsgruppen vergleichsweise schnell, wohingegen die von Tier 2, 4 und 5 langsamer wuchsen. Tier 7 zeigte eine überdurchschnittlich hohe Differenz der Zellzahl zwischen norm- und hypoxisch kultivierten Zellen (**Abbildung 5**).

Alleine bei Tier 1, 3 und 8 zeigten sich sowohl vergleichbare Zellzahlen als auch entsprechende Verhältnisse zwischen norm- und hypoxischen Zellen (**Abbildung 5**, grau schattiert). Aus diesen Gründen wurden alle nachfolgenden Experimente mit Zellen aus entsprechenden drei Ratten durchgeführt.

## Ergebnisse



**Abbildung 5: Zellextraktion von adMSC(rat).**

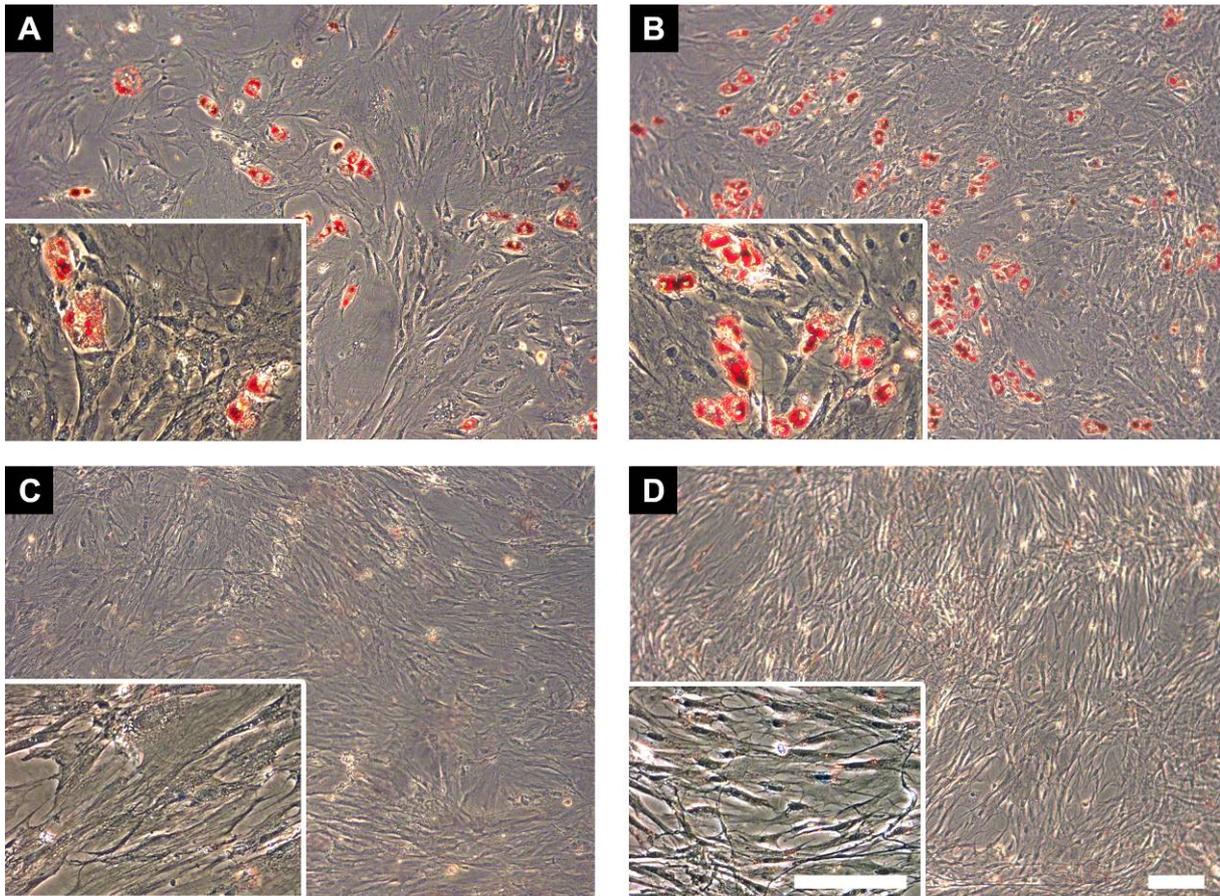
Es wurde die Zellzahl pro Gram entnommenen Fetts von acht Ratten bestimmt. Dabei wurden die aus dem Fett gewonnenen Zellen gleichmäßig unter den beiden Versuchsgruppen verteilt und für fünf Tage kultiviert. Bei sechs von acht Ratten vermehrten sich die Zellen unter Hypoxie schneller, als in Normoxie. Nur bei Tier Nummer 2 und 6 verhielt sich das Zellwachstum konträr. Wegen der vergleichbaren Ergebnisse von Tier 1, 3 und 8 wurden diese für alle weiteren Experimente verwendet.

## 3.2 Charakterisierung der Zellen als ad(MSC)rat

### 3.2.1 Sauerstoffkonzentration beeinflusst Differenzierungspotential

#### 3.2.1.1 **Hypoxie begünstigt adipogene Differenzierung**

Nach Ablauf zweier Zyklen der Induktion erfolgte nach 2 Wochen die Oil-Red-O Färbung. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 6** dargestellt. Hier zeigten sich mehr gefärbte Fettvakuolen in den hypoxisch kultivierten Zellen (**Abbildung 6, B**) verglichen mit den normoxisch kultivierten Zellen (**Abbildung 6, A**). Letztere bildeten isoliert Fettvakuolen aus, während sich unter Hypoxie größere Anhäufungen von Fettablagerungen fanden. Zur Kontrolle dienten gleichzeitig mit normalem Kulturmedium behandelte Zellen. Darunter kam es weder unter normoxischen (**Abbildung 6, C**), noch unter hypoxischen Bedingungen (**Abbildung 6, D**) zu einer adipogenen Differenzierung.



**Abbildung 6: Mikroskopische Darstellung der adipogenen Differenzierung.**

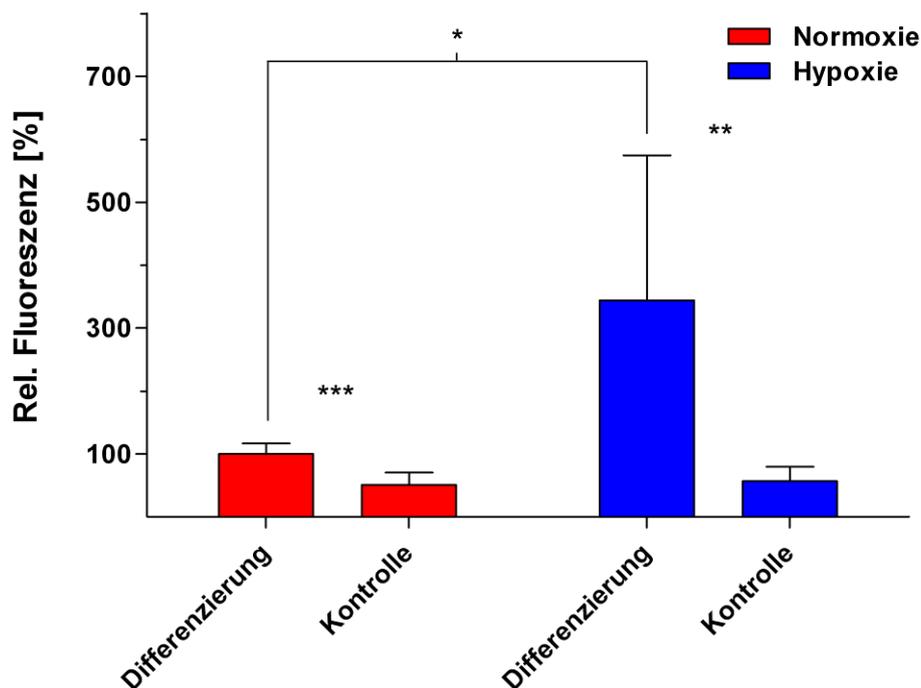
Exemplarische Darstellung der adipogenen Differenzierung der adMSC(rat) von Ratte Nummer 3. Unter normalen Sauerstoffbedingungen [A] entstanden weniger Fettvakuolen (hier rot gefärbt), als unter hypoxischen Bedingungen [B]. In den entsprechenden Kontrollen [C, D] waren keine Fettvakuolen zu erkennen. (Maßstab = 200 µm)

Die Quantifizierung der adipogenen Differenzierung erfolgte mittels AdipoRed Assay Reagent<sup>®</sup>. Zu diesem Zweck wurde der Versuch wiederholt und anstelle der Färbung, die Fluoreszenz, des sich an die Lipide anlagernden Reagenzes bestimmt. Die Differenzierung der drei verschiedenen adMSC(rat) fand zu unterschiedlichen Zeitpunkten statt. Bei der Darstellung der Ergebnisse wurde aus diesem Grund auf absolute Werte verzichtet und stattdessen das Verhältnis von norm- zu hypoxisch kultivierten Zellen angegeben. Für die unter normoxischen Bedingungen abgelaufene Differenzierung (**Abbildung 7**, rot) wurde dabei eine 100 %-ige ( $\pm 16,7\%$ ) Fluoreszenz angenommen. Die hypoxisch kultivierte Differenzierung (**Abbildung 7**, blau) wurde dann in ein Verhältnis zur normoxischen Differenzierung gesetzt. Relativ gesehen betrug die Fluoreszenz für die unter Hypoxie kultivierten Zellen 344 % ( $\pm 230,7\%$ ). Für die mit normalem Medium behandelten Kontrollen ergaben sich

## Ergebnisse

relative Werte von 50,7 % ( $\pm 19,7$  %) unter normoxischen und 56,8 % ( $\pm 22,5$  %) unter hypoxischen Bedingungen.

Statistisch zeigte sich eine signifikant höhere Fluoreszenz unter hypoxischen Bedingungen gegenüber normoxischen ( $p = 0,05$ ), sowie signifikant höhere Fluoreszenzen der Differenzierungen gegenüber ihren analogen Kontrollen (Normoxie:  $p = 0,001$ , Hypoxie:  $p = 0,01$ ).

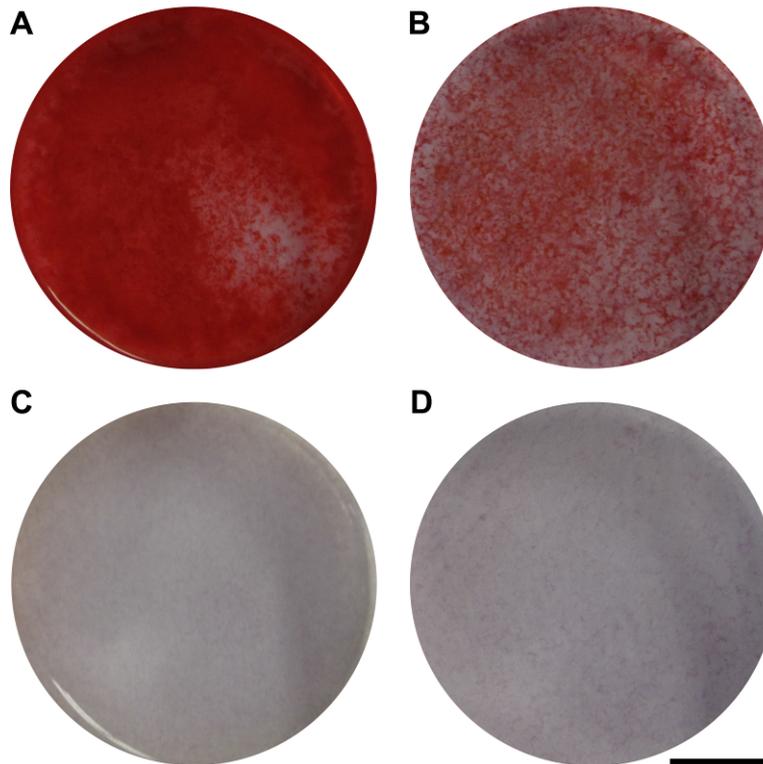


**Abbildung 7: Quantifizierung der adipogenen Differenzierung.**

Dargestellt wurden die Ergebnisse relativ zueinander. Die Differenzierung der normoxisch kultivierten Zellen [rot] wurde dabei als 100 % definiert. Nach zwei Wochen zeigte sich eine signifikant höhere adipogene Differenzierung unter hypoxischen Bedingungen [blau], als unter normoxischen. Es wurden Mittelwert und Standardabweichung angegeben. Alle Experimente wurden mit Zellen von drei Ratten in dreifacher Ausführung durchgeführt. (\*  $p = 0,05$ , \*\*  $p = 0,01$ , \*\*\*  $p = 0,001$ )

### 3.2.1.2 Verminderte osteogene Differenzierung unter Hypoxie

Die Alizarin Red Färbung wurde nach 5 Wochen der Induktion durchgeführt. Dabei ließ sich bereits makroskopisch eine, höhere Kalziumablagerung der normoxisch kultivierten Zellen (**Abbildung 8**, A) verglichen mit den HC (**Abbildung 8**, B) beobachten. Die mit normalem Kulturmedium behandelten Kontrollen (**Abbildung 8**, C und D) nahmen keinen Farbstoff auf.

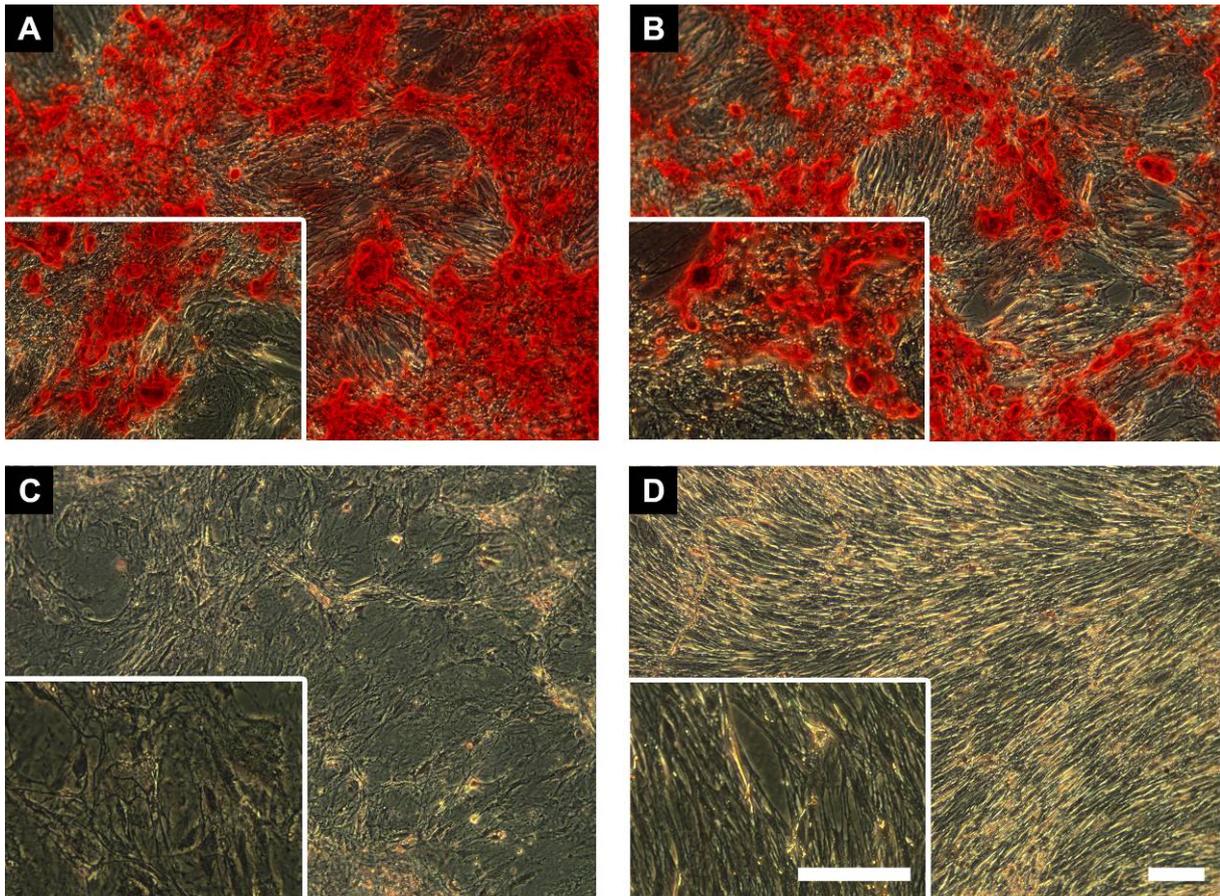


**Abbildung 8: Makroskopische Darstellung der osteogenen Differenzierung.**

Exemplarische Darstellung der osteogenen Differenzierung der adMSC(rat) von Ratte Nummer 3. Bei makroskopischer Betrachtung der 6-Well Kulturschalen wurde deutlich, dass die normoxisch kultivierten Zellen [A] mehr Kalziumablagerungen (hier rot gefärbt) produzierten, als die hypoxischen Zellen [B]. In den jeweiligen Kontrollen [C und D] fanden sich keine Ablagerungen. (Maßstab = 1 cm)

Mikroskopisch wurden die bereits gewonnenen Erkenntnisse bestätigt. Die normoxisch kultivierten Zellen (**Abbildung 9, A**) lagerten mehr Kalzium ein, als die hypoxisch kultivierten (**Abbildung 9, B**).

Zusätzlich waren mikroskopisch Unterschiede in der Zellkonfluenz zu beobachten. So erweckt es den optischen Eindruck, als teilten sich besonders bei den Kontrollen (**Abbildung 9, C und D**), aber auch bei den Differenzierungen (**Abbildung 9, A und B**) die Zellen unter hypoxischen Bedingungen innerhalb der 5 Wochen häufiger.



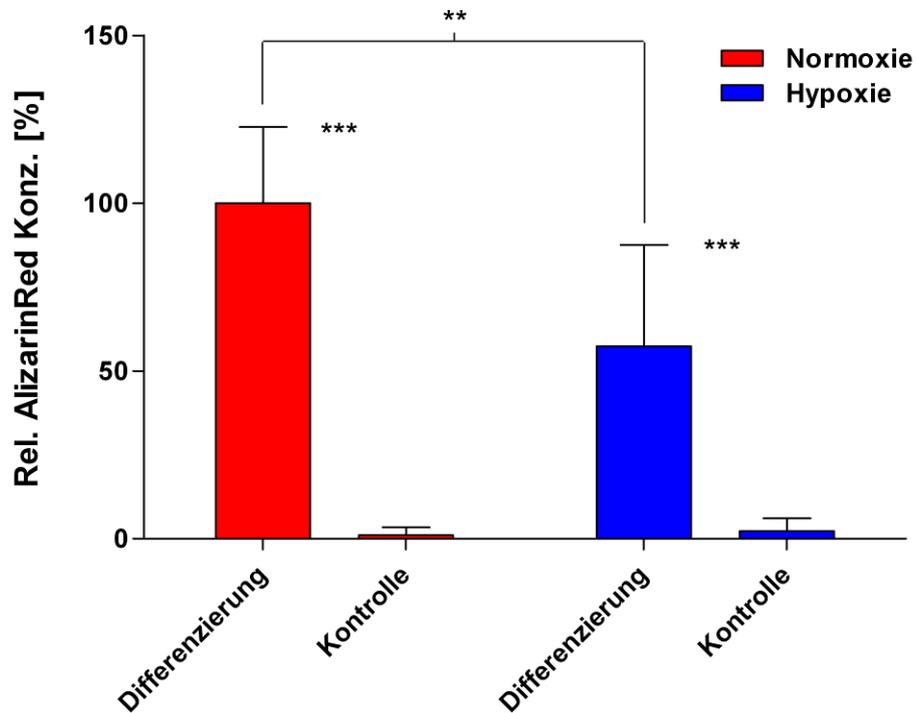
**Abbildung 9: Mikroskopische Darstellung der osteogenen Differenzierung.**

Exemplarische Darstellung der osteogenen Differenzierung der adMSC(rat) von Ratte Nummer 3. Unter normoxischen Bedingungen [A] gewachsene Zellen produzierten mehr Kalziumablagerungen (hier rot gefärbt), als Zellen unter hypoxischen Bedingungen [B]. In den jeweiligen Kontrollen [C und D] fanden sich keine Kalziumablagerungen. (Maßstab = 200  $\mu\text{m}$ ).

Die Quantifizierung der osteogenen Differenzierung erfolgte mittels Osteogenesis Quantitation Kit. Die unter normoxischen Bedingungen abgelaufene Differenzierung (**Abbildung 10**, rot) wurde wieder als 100 % ( $\pm 22,7$  %) angenommen. Demgegenüber erreichte die hypoxische Differenzierung (**Abbildung 10**, blau) 57,3 % ( $\pm 30,2$  %) und entsprach folglich dem makro- und mikroskopisch erlangtem optischen Eindruck. Die Kontrollen kamen unter normoxischen Bedingungen (**Abbildung 10**, blau) auf 1 % ( $\pm 2,3$  %) und unter hypoxischen (**Abbildung 10**, rot) auf 2,3 % ( $\pm 3,8$  %).

Die normoxischen Bedingungen führten demnach statistisch zu einer signifikant besseren osteogenen Differenzierung ( $p = 0,01$ ). In beiden Versuchsgruppen zeigten

sich hoch signifikante Unterschiede ( $p = 0,001$ ) zwischen Differenzierungs- und Kontrollgruppe.



**Abbildung 10: Quantifizierung der osteogenen Differenzierung.**

Die Konzentration an Alizarin Red in den Kulturschalen wurde mittels Mikroplattenleser bestimmt und verglichen. Die Ergebnisse wurden relativ zueinander präsentiert, wobei die unter normoxischen Bedingungen kultivierten Zellen auf 100 % gesetzt wurden. Die Konzentration war in der normoxischen Differenzierung [rot] signifikant höher als in der hypoxischen [blau]. Die jeweiligen Kontrollen zeigten eine signifikant geringere Konzentration. Es wurden Mittelwert und Standardabweichung angegeben. Alle Experimente wurden mittels Zellen aus drei Ratten und in dreifacher Ausführung durchgeführt. (\*\*  $p = 0,01$ , \*\*\*  $p = 0,001$ )

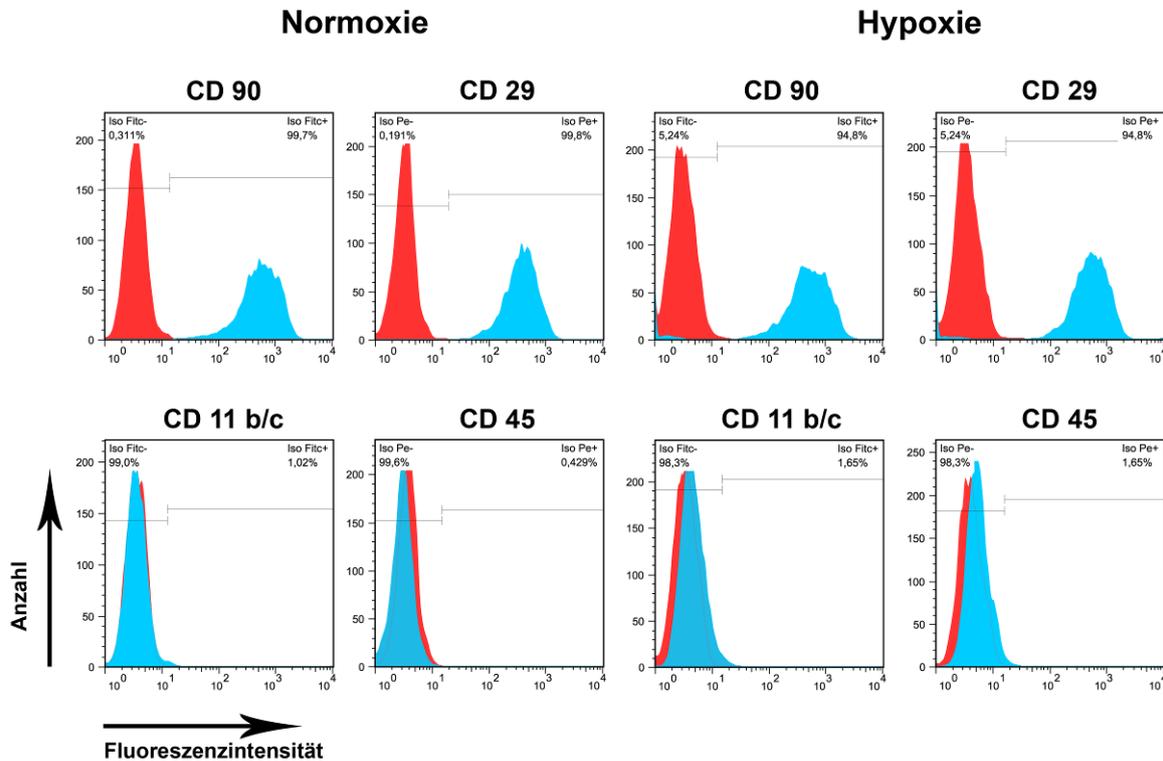
### 3.2.2 Oberflächenprofil weißt Stammzellcharakter auf

Das Oberflächenprofil der adMSC(rat) wurde mittels Durchflusszytometrie auf vier Oberflächenmarker untersucht. Repräsentativ galten Thy-1 cell surface antigen (THY1) (CD 90 (CD = Cluster of Differentiation)) und Integrin, beta 1 (ITGB1) (CD 29) als Positiv-Marker und Protein tyrosine phosphatase, receptor Type C (PTPRC) (CD 45) und Mac1 (CD 11b/c) als Negativ-Marker. Die Expressierung der Marker wurde mit Zellen der Passage 5 durchgeführt.

Für die Auswertung wurde auf Basis der unspezifisch bindenden Iso-Kontrolle ein Intervall festgelegt, welches 98 % des abgegebenen Fluoreszenzsignals mit

## Ergebnisse

einschließt. Von den Oberflächenmarkern abgegebene Signale, welche außerhalb dieses Intervalls lagen, konnten somit als spezifische Bindungen mit dem Oberflächenmolekül betrachtet werden. Die graphische Darstellung der Ergebnisse wird in **Abbildung 11** für Tier 1 exemplarisch dargestellt.



**Abbildung 11: Auswertung Oberflächenmarker**

Exemplarisch wurden die Fluoreszenzintensitäten von Tier 1 dargestellt. Es zeigte sich eine Expression der Marker CD 90 und CD 29. Die Negativ-Marker CD 11 b/c und CD 45 wurden nicht von den Zellen exprimiert.

Es kam zu keinen signifikanten Differenzen zwischen den beiden Kulturbedingungen. In beiden Versuchsgruppen zeigten ca. 98 % der Positiv-Marker ein höheres Fluoreszenzsignal als in der Iso-Kontrolle. Bei den Negativ-Markern gingen weniger als durchschnittlich 2 % eine spezifische Bindung mit dem Oberflächenantigen ein. Eine Abweichung zeigte sich allein bei Tier 1 in Hypoxie. Dabei banden nur 94,8 % der Antikörper spezifisch an den Oberflächenmarker. Die prozentualen Ergebnisse aller drei Tiere zeigt **Tabelle 2**.

**Tabelle 2: Oberflächenprofil**

Präsentiert wurde der Anteil [%] an Antikörper, welcher spezifisch an den entsprechenden Oberflächenmarker band.

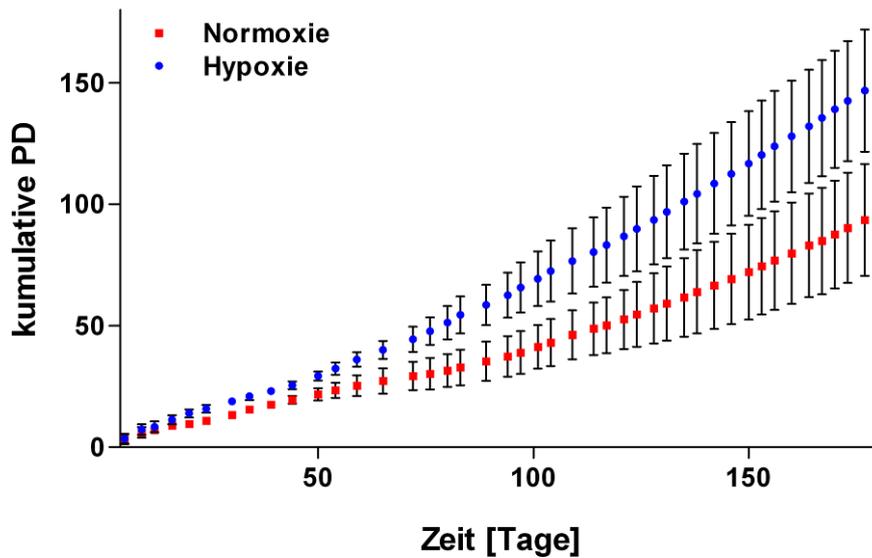
	Normoxie				Hypoxie			
	Positiv-Marker		Negative-Marker		Positiv-Marker		Negative-Marker	
	CD 90	CD 29	CD 45	CD 11b/c	CD 90	CD 29	CD 45	CD 11b/c
<b>Passage 5</b>								
<i>Tier 1</i>	99,7	99,8	0,4	1,0	94,8	94,8	1,7	1,7
<i>Tier 3</i>	96,0	99,7	1,8	1,8	99,7	99,8	0,2	1,6
<i>Tier 8</i>	96,2	99,7	0,6	0,6	99,7	99,3	0,8	1,2
<i>Mittelwert</i>	97,3	99,7	0,9	1,1	98,1	98,0	0,9	1,5
<i>SD</i>	2,08	0,06	0,92	1,43	2,83	2,79	0,73	0,84

### 3.3 Zelleigenschaften werden durch Hypoxie entscheidend beeinflusst

#### 3.3.1 Beschleunigtes Zellpopulationswachstum unter Hypoxie

Die adMSC(rat) wurden über 180 Tage unter den verschiedenen Sauerstoffbedingungen kultiviert. Während der, alle fünf bis sechs Tage stattfindenden, Passagewechsel wurden die Zellzahlen bestimmt. Auf diese Weise ergab sich für beide Versuchsgruppen eine Wachstumskurve (**Abbildung 12**).

Zur Veranschaulichung wurde die ansteigende Populationsverdopplung (PD) gegen die Zeit aufgetragen. Deutlich wurde ein schnelleres Wachstum der hypoxisch konditionierten Zellen gegenüber den normoxisch konditionierten. Das Wachstumsverhalten zeigte sich in beiden Versuchsgruppen konstant. Zur Beendigung des Versuchs nach 180 Tagen befanden sich sowohl die HC als auch die NC noch im Wachstum. Es zeigte sich zu diesem Zeitpunkt eine kumulative Populationsverdopplung von 150 ( $\pm 25,73$ ) in Hypoxie und 96 ( $\pm 23,49$ ) in Normoxie. Dies entspricht einer ca. 1,5-fachen Populationsverdopplungszeit der hypoxisch- gegenüber den normoxisch kultivierten Zellen.



**Abbildung 12: Kumulative Populationsverdopplung (PD).**

Die adMSC(rat) wurden 180 Tage kultiviert. Die hypoxischen Zellen [blauer Kreis] wuchsen dabei schneller als die normoxischen [rotes Quadrat]. Es wurde die Standardabweichung angegeben. Alle Experimente wurden mittels Zellen aus drei Ratten durchgeführt.

### 3.3.2 Hypoxie steigert die Kolonieformungseffektivität

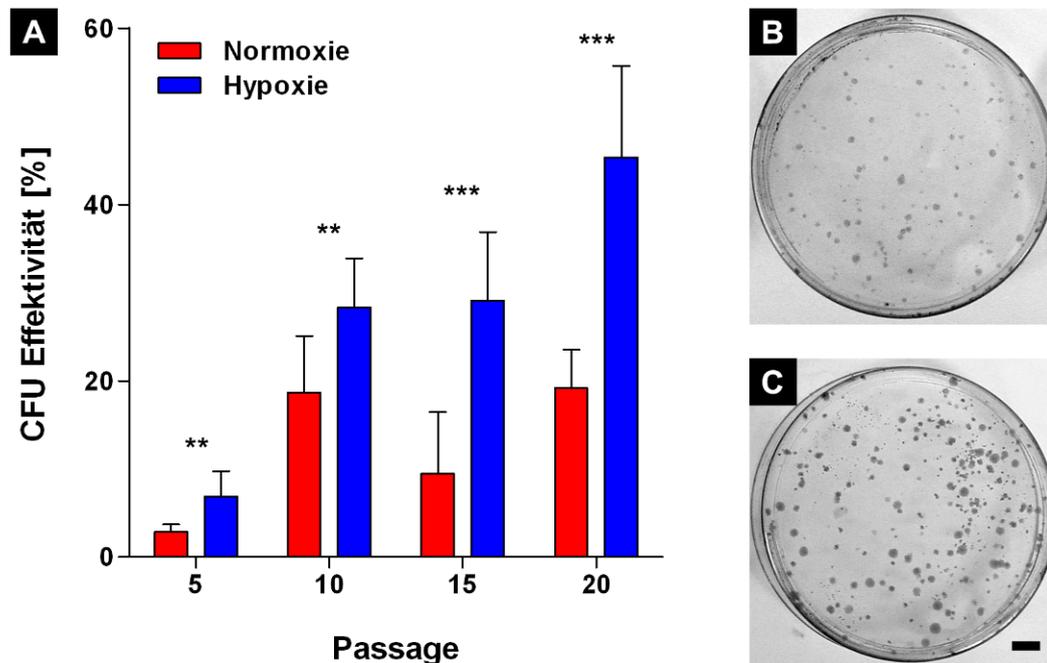
Die Colony Forming Unit erlaubte eine Aussage über die Fähigkeit Zellkolonien zu formen. Durch die sehr geringen Zellzahlen, welche auf die Petrischalen ausgesät wurden, fand ein Wachstum der Zellen in Kolonien statt. Diese wurden nach 10 Tagen mittels Crystal Violet gefärbt und ausgezählt. Dargestellt wurde die Effektivität, welche der prozentuellen Anzahl an geformten Kolonien zu ausgesäten Zellen entspricht (**Abbildung 13**). Der Versuch wurde in Passage 5, 10, 15 und 20 wiederholt.

In Passage 5 ergab sich für die NC (**Abbildung 13**, rot) eine Effektivität von 2,8 % ( $\pm 0,9$  %), gegenüber einer Effektivität von 6,9 % ( $\pm 2,9$  %) bei den HC (**Abbildung 13**, blau). Dies stellte einen statistisch signifikanten Unterschied ( $p = 0,01$ ) dar. Derselbe Signifikanzwert ergab sich bei der Gegenüberstellung der beiden Versuchsgruppen in Passage 10. Die unter Normoxie kultivierten Zellen kamen dabei auf 18,7 % ( $\pm 6,4$  %), die hypoxisch kultivierten auf 28,3 % ( $\pm 5,5$  %). Für die Wiederholungen in Passage 15 und 20 erhöhte sich das Signifikanzniveau ( $p = 0,001$ ). Es ergaben sich Effektivitäten für NC von 9,4 % ( $\pm 7$  %) in Passage 15

## Ergebnisse

und 19,1 % ( $\pm 4,4$  %) in Passage 20. Die HC erreichten Werte von 29,1 % ( $\pm 7,8$  %) in Passage 15 und 45,3 % ( $\pm 10,4$  %) in Passage 20. Zusammenfassend bildeten sich demnach für alle gemessenen Passagen signifikant mehr Kolonien in Hypoxie als in Normoxie.

Des Weiteren fiel eine generelle Zunahme der Koloniezahl mit ansteigender Passage auf. In beiden Versuchsgruppen war dabei die CFU Effektivität in Passagen 10, 15 und 20 signifikant ( $p = 0,01$ ) höher als in Passage 5. In Hypoxie konnte zusätzlich eine signifikant höhere Effektivität in Passage 20 gegenüber allen niedrigeren Passagen berechnet werden ( $p = 0,01$ ).

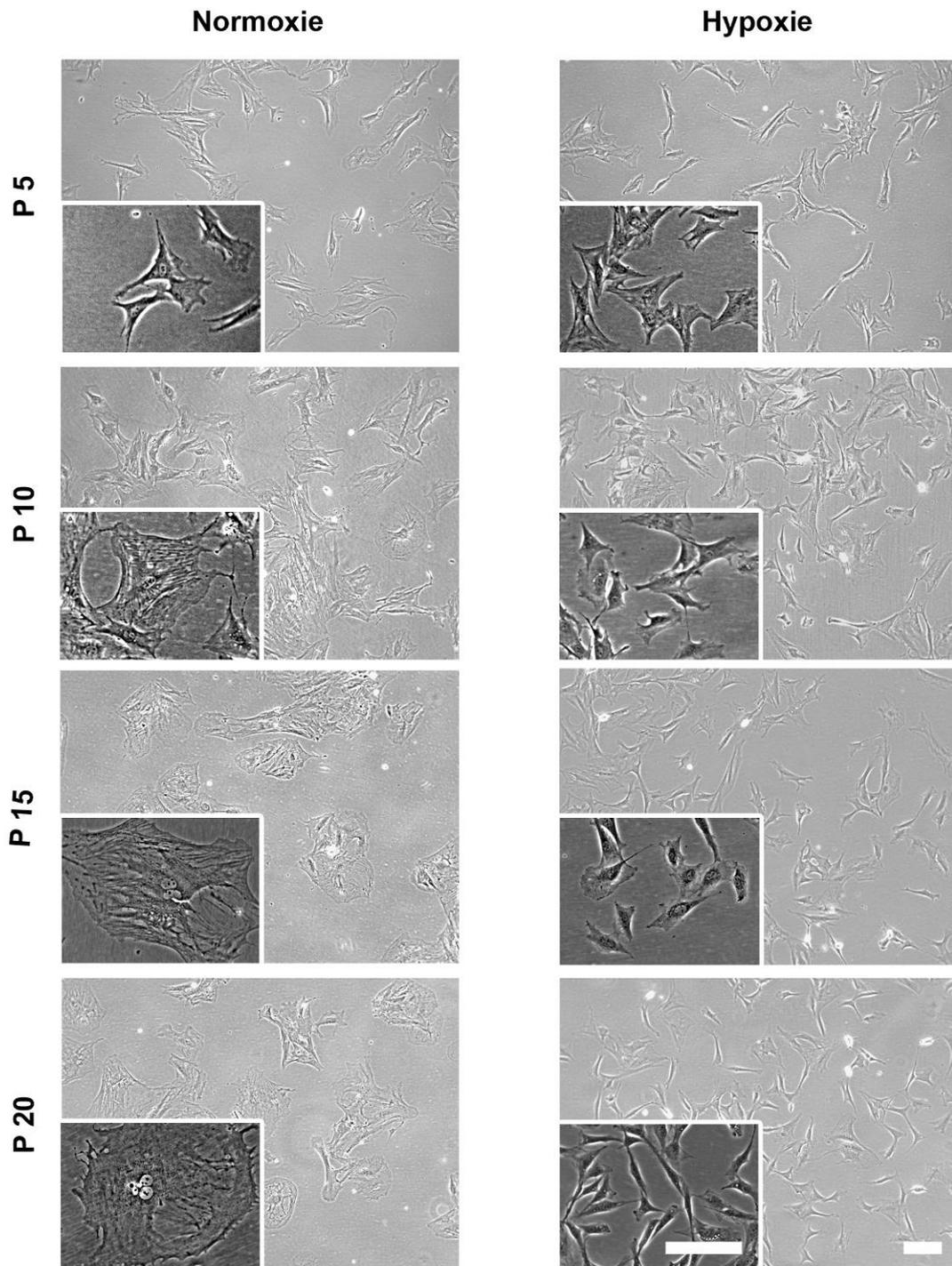


**Abbildung 13: Colony Forming Unit.**

Hypoxisch kultivierte adMSC(rat) [blau] zeigten in allen untersuchten Passagen signifikant höhere Effektivitäten bei der Bildung von Kolonien. Des Weiteren nahm bei hypoxischen Zellen die Effektivität mit höher werdender Passage kontinuierlich zu, wobei sie für normoxische Zellen [rot] zwischen der 10. und 20. Passage schwankte [A]. Exemplarisch dargestellt wurden die mit Crystal Violet gefärbten Kolonien von Tier 3 in Passage 20 unter normoxischen [B] und hypoxischen [C] Bedingungen. Es wurden Mittelwert und Standardabweichung angegeben. Alle Experimente wurden mit Zellen aus drei Ratten in dreifacher Ausführung durchgeführt. (\*\*  $p = 0,01$ , \*\*\*  $p = 0,001$ ). (Maßstab = 1 cm).

### 3.3.3 Zellmorphologie lässt sich durch Sauerstoffgehalt beeinflussen

Beim Umgang mit den Zellen und deren Betrachtung unter dem Mikroskop wurde eine unterschiedliche Entwicklung zwischen beiden Versuchsgruppen bezüglich der Morphologie festgestellt. Es zeigte sich mit steigender Passage, eine Größenzunahme der NC gegenüber den HC. **Abbildung 14** zeigt Phasenkontrastbilder in 100- und 200-facher Vergrößerung, welche ursprünglich für die Dokumentation der Wachstumskurve festgehalten wurden. Es fiel auf, dass die unter Normoxie kultivierten Zellen nicht allein flächenmäßig zunahmten, sondern sich auch in Bezug auf ihre Form veränderten. So traten beispielsweise der Zellkern und das Zytoskelett prominenter zum Vorschein während diese Strukturen bei den HC nur selten voneinander zu trennen waren.



**Abbildung 14: Phasenkontrastaufnahmen.**

Exemplarische Darstellung der morphologischen Veränderungen der adMSC(rat) von Ratte Nummer 1. Während sich die Zellen in Passage (P) 5 morphologisch noch ähnlich sahen, unterschieden sie sich mit zunehmender Passage deutlicher. Die normoxischen Zellen wurden dabei größer; die hypoxischen Zellen, nahmen im Gegensatz dazu sogar gering an Größe ab. (Maßstab = 200 µm).

## Ergebnisse

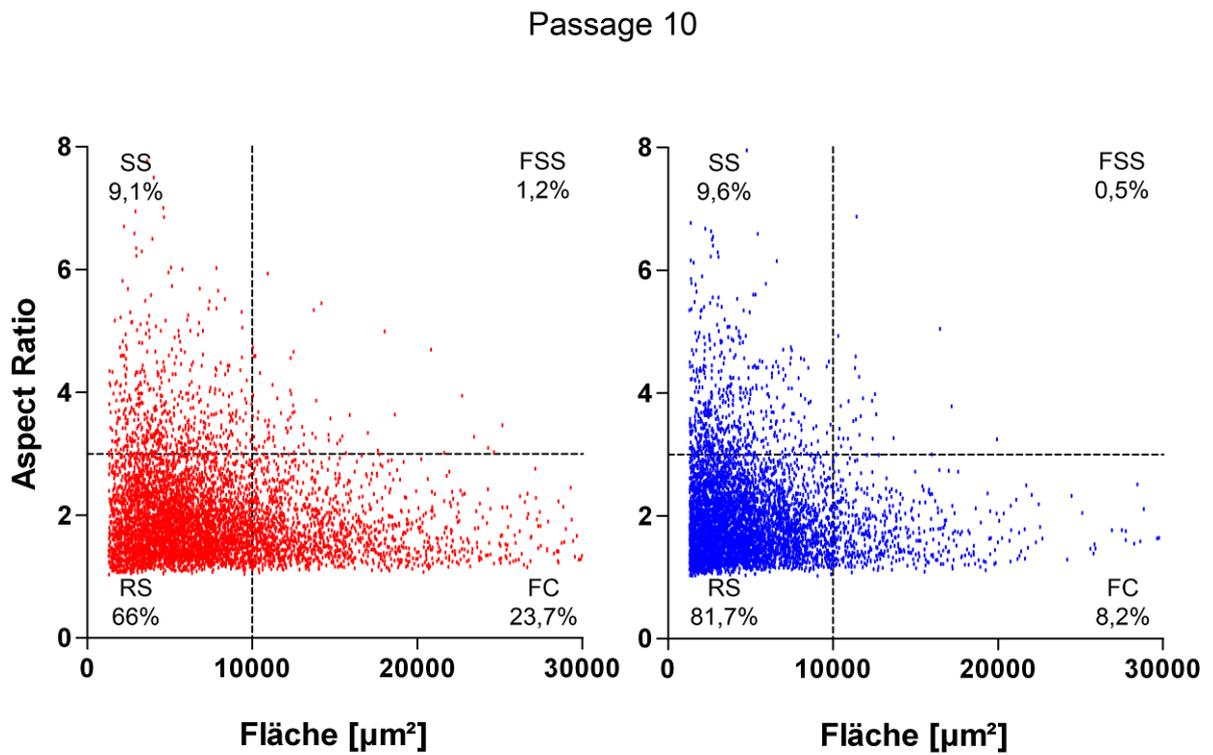
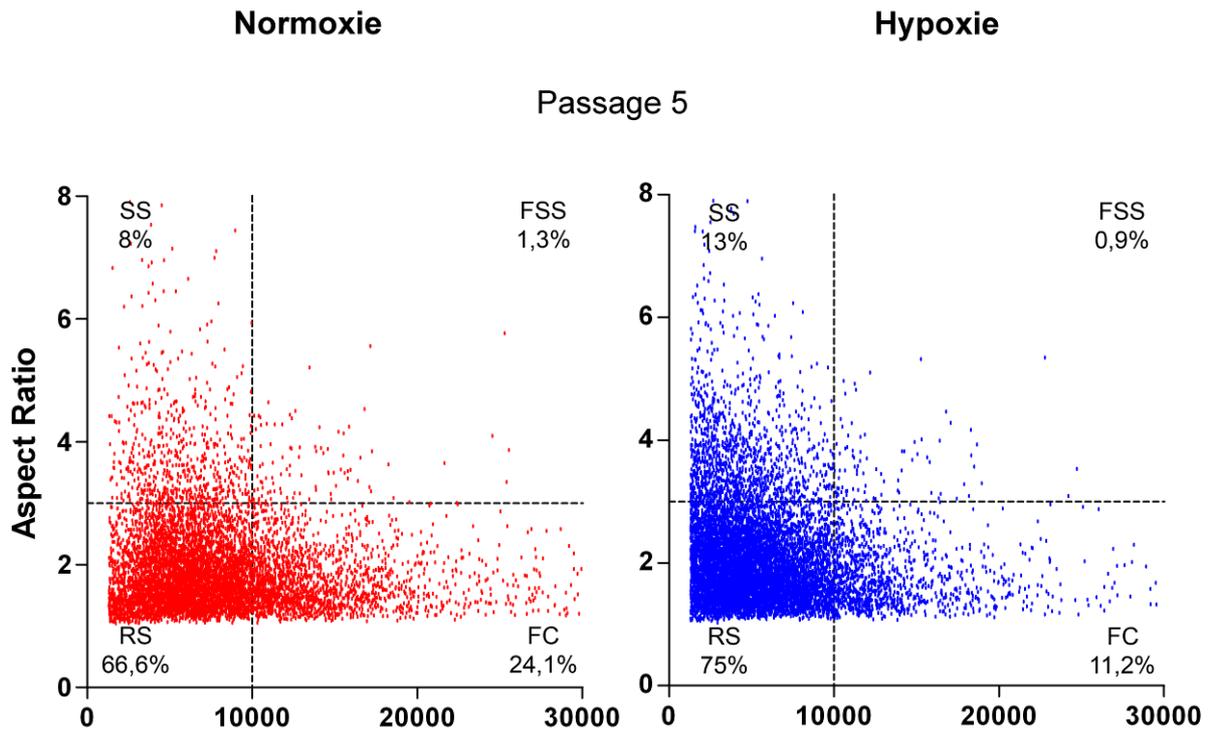
Zur Quantifizierung dieser Beobachtungen wurden mittels ImageJ die Zellen einzeln untersucht. Von jeder Passage und Versuchsgruppe wurden zu diesem Zweck mindestens 5.000 Zellen ausgewertet. Dabei wurde von jeder Zelle der Aspect ratio, welcher dem längsten geteilt durch den senkrecht dazu stehenden, kürzesten Zelldurchmesser entspricht, sowie die Zellfläche bestimmt. Die untersuchten Zellen stammten zu gleichen Anteilen aus allen drei Tieren.

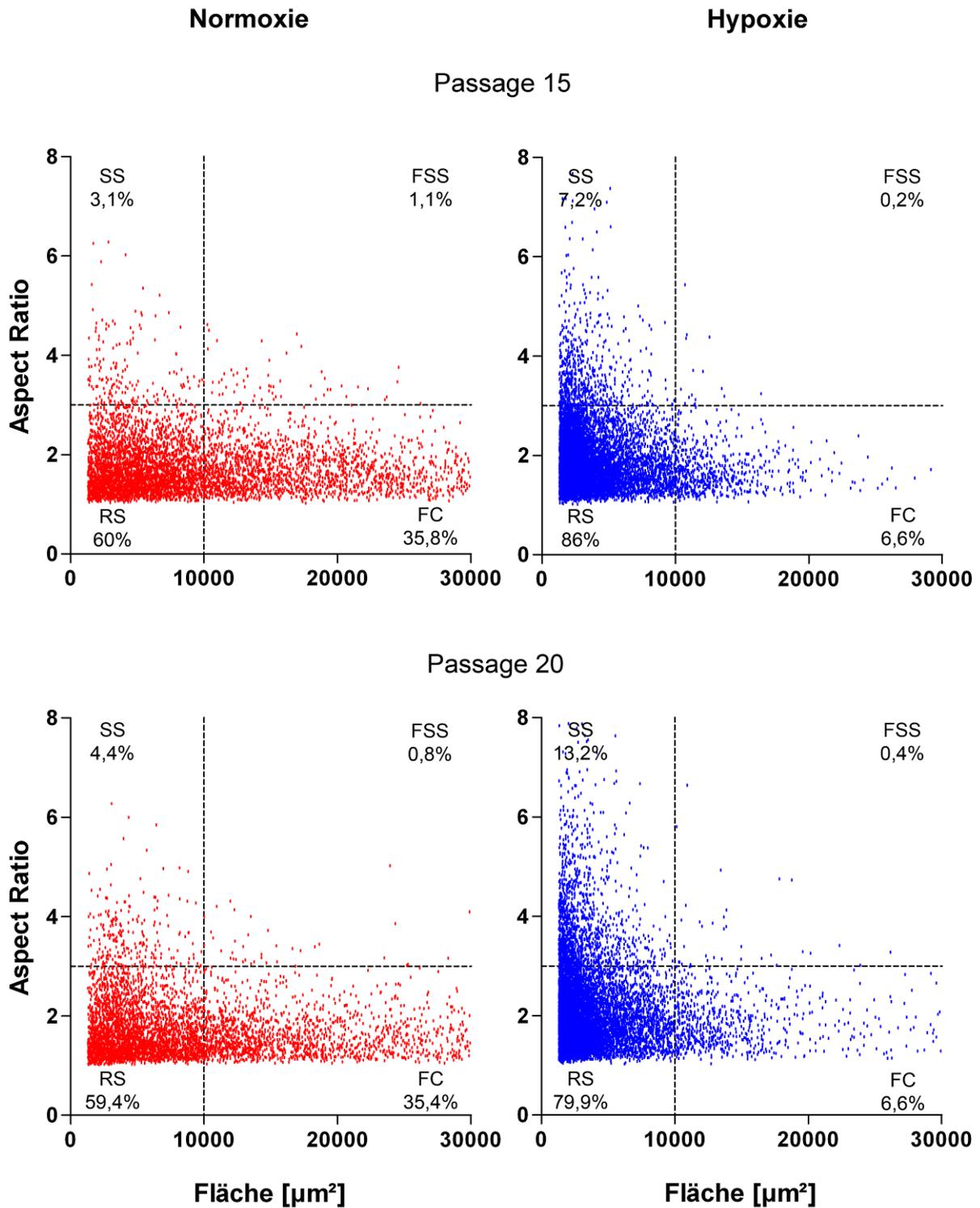
Anhand des Aspect Ratio und der Zellfläche, wurden die Zellen vier Subpopulationen zugeordnet. Bezüglich der Zuordnung zu den Subpopulationen wurde sich an den normoxischen Zellen aus Passage 5 orientiert. Demnach wurden Zellen bis zu einer Fläche von  $10.000 \mu\text{m}^2$  und einem Aspect Ratio von 3 der RS-Zellen (rapidly selfrenewing) Subpopulation zugeordnet. Zellen mit einem Aspect Ratio  $> 3$  entsprachen den SS-Zellen (spindle shaped) und Zellen mit einer Fläche  $> 10.000 \mu\text{m}^2$  der FC (flatended cells) Subpopulation. Zellen welche beide Grenzen überschritten wurden der FSS Zellen (flatended spindel shaped) Subpopulation zugeordnet (**Abbildung 15**) [42].

Durch diese Einteilung fiel auf, dass in Passage 5 der Anteil an RS Zellen unter hypoxischen Bedingungen höher war, als unter normoxischen. Das Zellbild der HC verschob sich dabei in Richtung der SS Zellen, wohingegen sich das Zellbild der NC in Richtung FC streckte. Diese Tendenz wurde in den höheren Passagen deutlicher. So ergab sich in Passage 20 unter Hypoxie ein Anteil von 79,9 % RS Zellen, 13,2 % SS Zellen und 6,6 % FC. Unter Normoxie entsprachen 59,4 % den RS Zellen, 4,4 % den SS Zellen und 35,4 % den FC Zellen.

Es blieb also festzuhalten, dass sich adMSC(rat) mit zunehmender Kultivierungsdauer unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen bezüglich ihrer Morphologie unterschiedlich verhielten. Während sich die Zellen unter Hypoxie zu kleinen und spindelförmigen Subpopulationen selektierten, nahmen sie unter Normoxie den FC Charakter an.

Ergebnisse



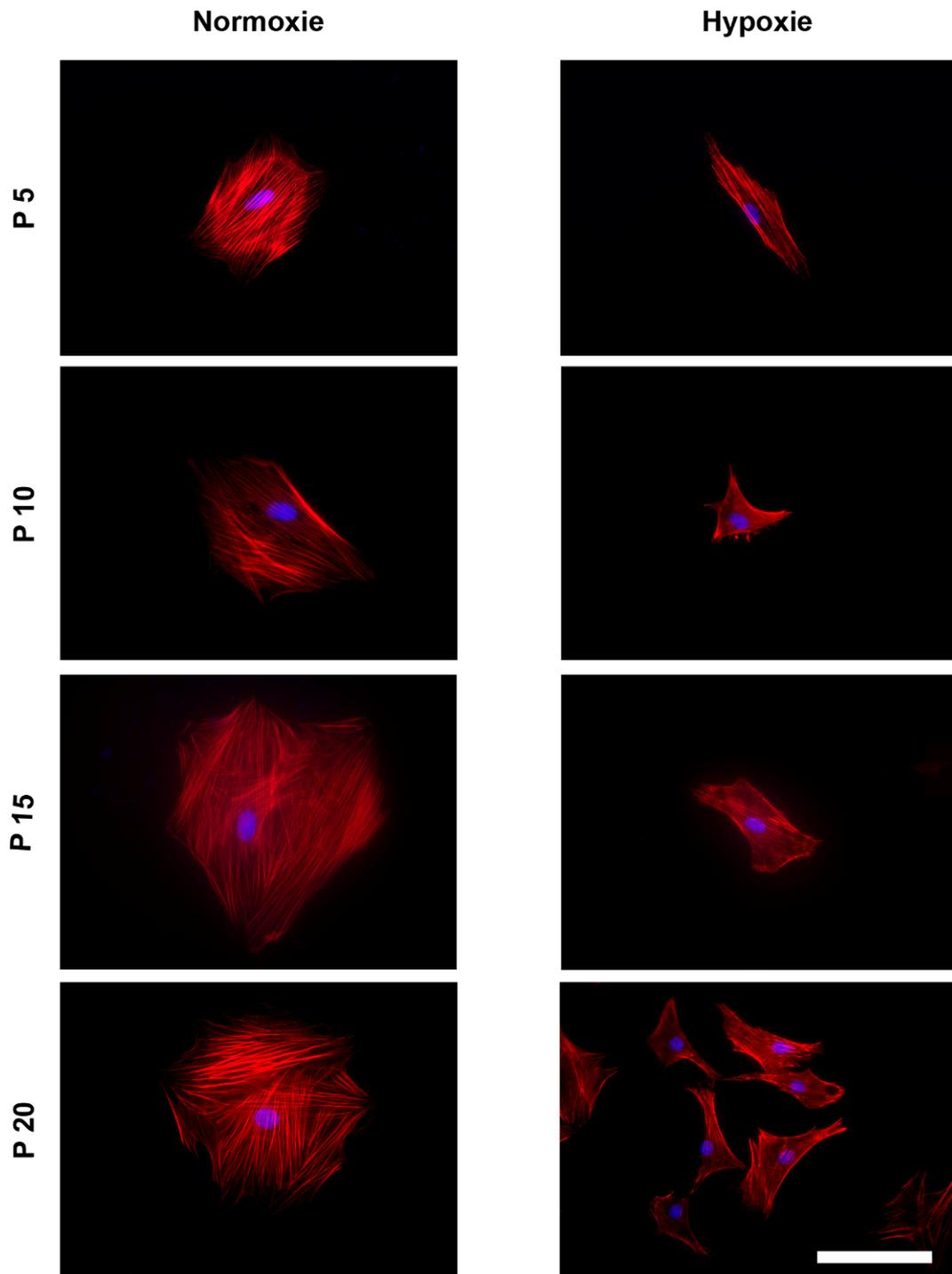


**Abbildung 15: Subpopulationen.**

Die Zellen wurden im Dot Blot Diagramm nach ihrer Fläche [µm<sup>2</sup>] und der Aspect Ratio (maximaler Durchmesser / minimaler Durchmesser) eingeordnet. Dabei wurden je Kulturbedingung und Passage mindestens 5.000 Zellen, stammend aus drei Tieren erfasst. Es fiel auf, dass sich die NC [rot] mit steigender Passage in Richtung der FC verschoben, während sich die HC [blau] zu SS entwickelten.

### 3.3.4 Größenzunahme der Zellen in Normoxie

Die Färbung des Zytoskeletts mittels Phalloidin-Alexa®546 (**Abbildung 16**) und die Kernfärbung (DAPI) demonstrierten, wie die Phasenkontrastbilder in **Abbildung 14**, eine Größenzunahme der normoxisch- gegenüber den hypoxisch kultivierten Zellen in höheren Passagen. Dabei war zu erkennen, dass in den größeren NC das Zytoskelett deutlicher abgebildet wurde als in den kleineren HC. Bezüglich des Zellkerns wurden keine Unterschiede festgestellt.



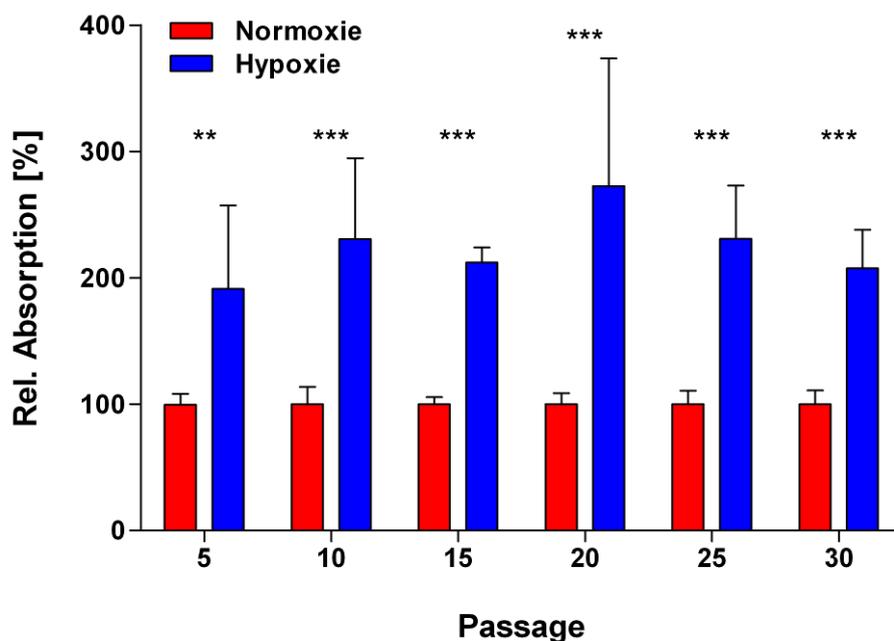
**Abbildung 16: Zytoskelettfärbung.**

Die Actin Filamente (rot) wurden mit Phalloidin-Alexa@546, der Zellkern (blau) mit DAPI gefärbt. Tier 1 wurde exemplarisch dargestellt. Wie bereits bei den Phasenkontrastaufnahmen festgestellt wurde nahmen die normoxischen adMSC(rat) in höheren Passagen (P) an Größe zu. Hinzukommend bildeten sie ein detailliertes Zytoskelett aus, wie hier anhand des Actins zu erkennen war. Bei den kleiner bleibenden hypoxischen Zellen war das Zytoskelett nicht vergleichbar detailliert darzustellen. (Maßstab = 100 µm).

### 3.3.5 Hypoxie steigert den Zellmetabolismus signifikant

Der WST-1 Assay ist ein Maß für die metabolische Aktivität der Zellen. Zur Quantifizierung der zeitlichen Ab- oder Zunahme der Aktivität wurden die Absorptionen des umgesetzten Reagenzes in den Passagen 5, 10, 15, 20, 25 und 30 bestimmt (**Abbildung 17**).

In allen gemessenen Passagen wurden signifikant höhere Absorptionswerte in der hypoxischen Versuchsgruppe bestimmt ( $p = 0,001$ ). Das Verhältnis der beiden Sauerstoffkonditionen zueinander blieb dabei in allen Passagen vergleichbar. HC setzten demnach das Reagenz in jungen, sowie in alten Passagen besser um und befanden sich folglich durchgehend in einem aktiveren metabolischen Zustand.



**Abbildung 17: Zellmetabolismus.**

Anhand eines WST-1 (water soluble tetrazolium) Assays wurde die metabolische Aktivität der adMSC(rat) bestimmt. Dabei wurde die Absorption des umgesetzten Reagenz mittels ELISA Reader bei 450 nm gemessen. Die Darstellung erfolgte relativ zueinander. Die metabolische Aktivität der normoxischen Zellen wurde diesbezüglich als 100 % angenommen. Es zeigte sich, dass die hypoxischen Zellen [blau] in allen Passagen eine signifikant höhere Aktivität hatten als die normoxischen Zellen [rot]. Es wurden Mittelwert und Standardabweichung angegeben. Alle Experimente wurden mit Zellen aus drei Ratten in dreifacher Ausführung durchgeführt. (\*\*  $p = 0,01$ , \*\*\*  $p = 0,001$ )

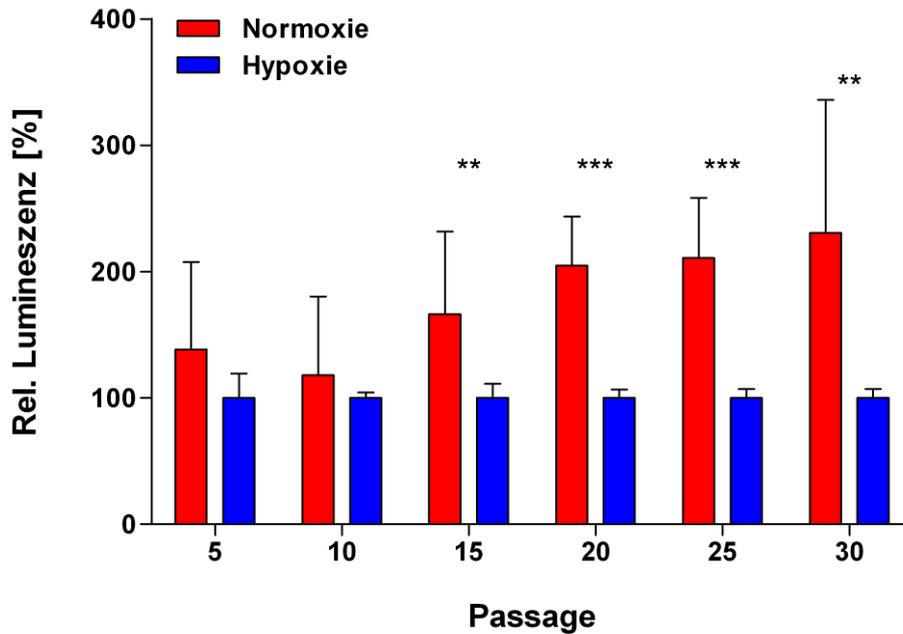
### 3.3.6 Signifikant langsamere Zellalterung unter Hypoxie

Die Bestimmung der Seneszenz erfolgte durch Messung der Beta-Galaktosidase Aktivität. Eine hohe Aktivität an Enzym korreliert mit einer fortgeschrittenen Zellalterung. Quantifiziert wurde die Aktivität über ein Lumineszenzsignal, welches am Ende einer an Beta-Galaktosidase gebundenen Enzymreaktion stand.

Das Experiment wurde ebenfalls in mehreren Passagen durchgeführt, um einen Vergleich der beiden Versuchsgruppen, bezüglich der Geschwindigkeit des Alterungsprozesses treffen zu können. Zum Zwecke der besseren Vergleichbarkeit wurden die Ergebnisse relativ zueinander präsentiert (**Abbildung 18**). Für die hypoxische Versuchsgruppe wurde dabei eine 100 %-ige Lumineszenz angenommen. Es zeigte sich eine zunehmend stärkere Lumineszenz bei den unter normoxischen Bedingungen gewachsenen adMSC(rat). Während sich in frühen Passagen die Lumineszenz beider Versuchsgruppen noch glich, nahm der Unterschied in höheren Passagen zu. Die Aktivität an Beta-Galaktosidase stieg demnach mit zunehmender Passage in NC schneller an als bei HC.

Statistisch betrachtet zeigte sich in den Passagen 5 und 10 noch kein signifikanter Unterschied zwischen Norm- und Hypoxie, demgegenüber konnte für alle höheren Passagen ein signifikanter Unterschied ( $p\text{-Wert} \leq 0,01$ ) berechnet werden.

## Ergebnisse



**Abbildung 18: Seneszenz.**

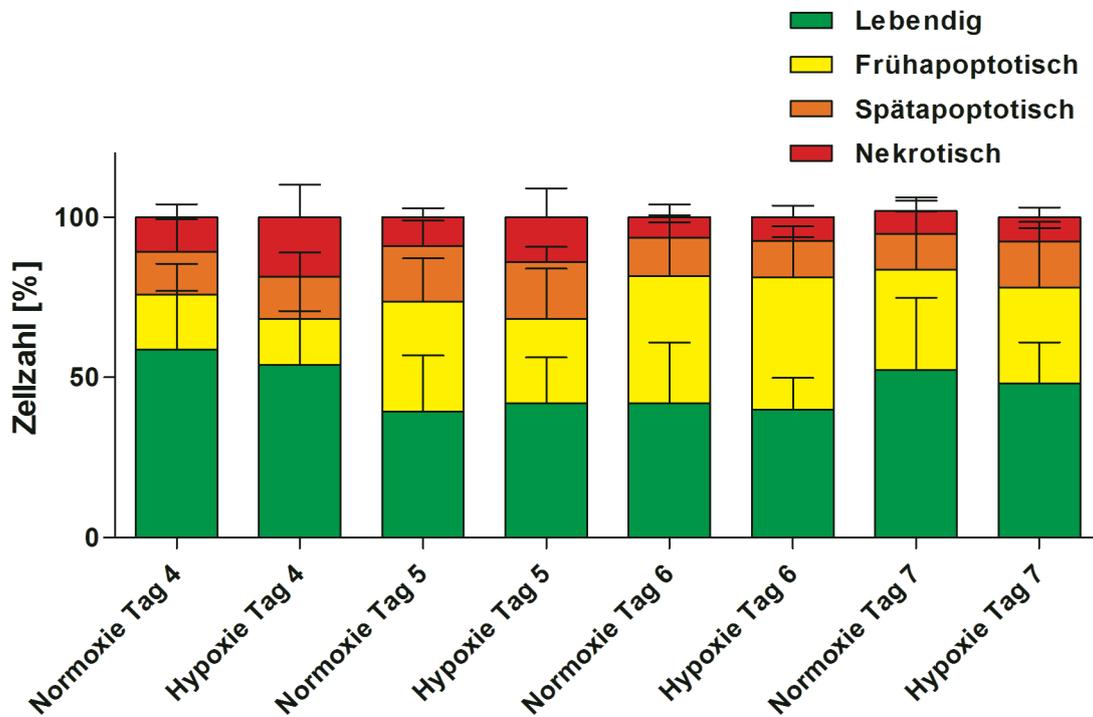
Zur Bestimmung des Zellalters wurde ein Beta-Glo™ Assay durchgeführt. Die Lumineszenz wurde, mittels Monochromator, bei 560 nm gemessen. Dabei fiel auf, dass die Lumineszenz der normoxischen adMSC(rat) [rot] relativ betrachtet, zu den, als 100 % dargestellten, hypoxischen Zellen [blau], zunahm. Es wurden Mittelwert und Standardabweichung angegeben. Alle Experimente wurden mit Zellen aus drei Ratten in vierfacher Ausführung durchgeführt. (\*\* p = 0,01, \*\*\* p = 0,001)

### 3.4 Kein Überlebensvorteil in Anoxie durch Präkonditionierung

In diesem Experiment wurde das Überleben der adMSC(rat) im sauerstofffreien Milieu untersucht. Dazu wurden Zellen beider Versuchsgruppen in Anoxie Gefäßen (**Abbildung 4**) kultiviert und gleichzeitig versucht alle sonstigen Einflussgrößen nicht zu verändern. Vorversuche zeigten, dass der Einfluss der Anoxie auf das Zellüberleben der adMSC(rat) erst nach 4 Tagen deutlich messbar wurde. Aus diesem Grund wurden die Messungen an den Tagen 4-7 durchgeführt. Bestimmt wurden die prozentuellen Anteile an lebendigen, früh- und spätapoptotischen, sowie an nekrotischen Zellen.

Es fiel auf, dass zwischen Tag 4 und 6 in beiden Versuchsgruppen der Anteil an lebendigen Zellen abnahm, während vor allem die frühapoptotischen adMSC(rat) zunahmen (**Abbildung 19**). Der Anteil an spätapoptotischen und nekrotischen Zellen blieb dabei weitestgehend konstant.

Statistisch konnte zwischen den vorher normoxisch und hypoxisch kultivierten Zellen an keinem der vier Tage ein signifikant unterschiedlicher Anteil, bezüglich des Zellzustandes gemessen werden.



**Abbildung 19: Überleben in Anoxie**

Graphisch dargestellt wird die Überlebensfähigkeit von adMSC(rat) unter anoxischen Bedingungen. Die Zellen der beiden Versuchsgruppen befanden sich zu diesem Zweck 4-7 Tage in Anoxiegefäßen und wurden anschließend mittels Durchflusszytometrie, vier Zuständen zugeteilt (lebendig [grün], früh- [gelb], spätapoptotisch [orange] und nekrotisch [rot]). Es wurden Mittelwert und Standardabweichung angegeben. Alle Experimente wurden mit Zellen aus drei Ratten in vierfacher Ausführung durchgeführt.

## **4 Diskussion**

### **4.1 Zellgewinnung**

#### **4.1.1 Versuchstiere**

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Versuchstieren handelte es sich ausschließlich um männliche Ratten vom Typ Wistar. Diese, in einem speziellen Labor gezüchteten Tiere dienten bereits in vielen wissenschaftlichen Studien als Versuchstiere. Es bestehen somit große wissenschaftliche Erfahrungen in deren Umgang und sie stellen gerade in Hinsicht auf, weiterführende Studien mit autologen Kleintiermodellen eine gute Grundlage dar [87-90].

Es handelte sich bei allen acht Ratten um Tiere unterschiedlicher genetischer Abstammungslinien. Es war bezüglich der Ergebnisse also unwahrscheinlich, dass ein äquivalentes Zellverhalten, z.B. bezüglich des Wachstums oder der Morphologie, auf einen ähnlichen Genpool zurückzuführen sei.

Alle Tiere verhielten sich zu Beginn der Studie klinisch gesund. Vor Extraktion des Fettgewebes wurden sie unterschiedlichen Voroperationen unterzogen. Von diesen Eingriffen betraf jedoch keiner die Fettentnahmeregionen der Achselhöhle, Leiste oder der Region um den Samenstrang. Es war daher nicht von einer Einflussnahme auf die Zellentnahme oder die Zellqualität auszugehen.

#### **4.1.2 Fettgewebe**

Die entnommenen und untersuchten Zellen entstammten aus dem Fettgewebe. Dieses ist bei Tier und Mensch einfach und komplikationsarm zugänglich und bietet somit sowohl für autologe Tiermodelle als auch für die Anwendung in der Humanmedizin eine hervorragende Ressource [38]. Aus diesen Gründen rufen Stammzellen aus dem Fettgewebe zunehmendes Interesse im Bereich des Tissue Engineerings hervor [91, 92].

Es wurden drei Zugangswege zur Fettextraktion gewählt. Dabei wurde das Fett aus Achsel- und Leistenregion, sowie aus dem, den Samenstrang umgebenden, Fettgewebe extrahiert. Die gesamt Fettmenge variierte, je nach individueller Konstitution der Ratte zwischen 1,5 g und 5,1 g Fett. Trotz der ungleichen

Fettmengen zeigte sich nach Überführen des Fettgewebes auf die Zellkultur ein positives Zellwachstum nach vier Tagen.

Die angewandte Entnahmetechnik wurde zwar bereits in der Literatur beschrieben, jedoch noch nie auf ein autologes Modell angewendet [93]. Da bei der Extraktion keine lebenswichtigen Organe in Mitleidenschaft gezogen werden, ist davon auszugehen, dass die Ratten den Eingriff ohne schlimmere Komplikationen überleben können. Ebenso sind Auswirkungen auf den Hormonhaushalt der Ratte, bei sorgfältigem chirurgischen Vorgehen, ohne Verletzung des Samenstranges, sehr unwahrscheinlich. Der Eingriff eignet sich demnach hinsichtlich eines autologen Rattenmodells, da keine lebenswichtigen Organe oder Funktionen beeinträchtigt werden.

Direkt nach Extraktion erfolgte die Verteilung der Zellen auf die jeweiligen Kulturbedingungen (Normoxie und Hypoxie). Die Zeit in Normoxie wurde auf diese Weise für die später hypoxisch kultivierten Zellen minimiert und somit einer Adaptation an die unphysiologische, normoxische Umgebung entgegengewirkt. Das beschriebene Vorgehen stellt gegenüber anderen Studien einen erheblichen Vorteil dar. Beispielsweise erworben Zhou N et al. die Zellen erst in höheren Passagen, welche zu diesem Zeitpunkt bereits mehrere Tage den standardisierten normoxischen Bedingungen ausgesetzt waren [94].

Wie bereits beschrieben wurde, ist davon auszugehen, dass der Sauerstoffgehalt der Zellen in ihrer biologischen Umgebung zwischen 1-3 % liegt [59-61]. Der Vorteil dieser Studie lag demnach darin, dass die Zellen der hypoxischen Versuchsgruppe, in Bezug auf die Sauerstoffkonzentration, von Anfang bis Ende ihrer biologischen Nische entsprechend kultiviert wurden.

Nach Kultivierung der Zellen für 5 Tage zeigte sich in sieben von acht Kulturen ein positives Zellwachstum, sowohl unter Normoxie, als auch unter hypoxischen Bedingungen. Alleine bei Ratte Nr. 2 zeigte sich zu diesem Zeitpunkt ein Zellrückgang in der normoxischen Versuchsgruppe. Diesem könnte eine mögliche Verunreinigung zugrunde liegen. Die aus Ratte Nr. 2 stammenden Zellen wurden in der Folge nicht weiter kultiviert.

Aus den berechneten Zellzahlen der anderen sieben Tiere wurde nach Passage 2 eine Vorauswahl auf drei Versuchstiere getroffen. Wie in **Abbildung 5** grau meliert dargestellt handelte es sich dabei um die Tiere 1, 3 und 8. Die Auswahl für die genannten drei Tiere erfolgte aufgrund ihres ähnlichen Mengenverhältnisses zwischen norm- und hypoxischen Zellen. Die Zellen der drei Tiere waren alle zu diesem Zeitpunkt bereits in Hypoxie schneller gewachsen als in Normoxie. Es ist an dieser Stelle zu diskutieren, ob durch die Vorauswahl eine Selektion von hypoxisch schneller wachsenden Zellen stattgefunden haben könnte. Betrachtet man jedoch das Wachstumsverhalten der anderen Tiere (**Abbildung 5**), so fällt auf, dass es bei 6 von 8 Tieren zu einem schnelleren Wachstum unter hypoxischen Bedingungen kam. Bei Tier Nr. 7 ergab sich sogar ein noch größeres Verhältnis von HC zu NC, als bei den selektierten Tieren. Nichts desto trotz ist bei der Analyse der weiteren Ergebnisse der Aspekt der Selektion zu berücksichtigen.

### 4.2 Zellcharakterisierung

Aufgrund mangelhafter Vergleichbarkeit der mesenchymalen Stammzellen, entstammend aus Fett oder Knochen, sowie unterschiedlichen Isolationsformen, veröffentlichten Dominici et al. 2006 ein allgemein gültiges Konsenspaper, worin drei minimale Kriterien für mesenchymale Stammzellen festgelegt wurden [76].

Erstens müssen die Zellen die Fähigkeit besitzen auf Plastikoberflächen zu adhären. Zweitens müssen MSCs auf der Zelloberfläche bestimmte Proteine exprimieren (positive Oberflächenmarker) und dürfen andere Proteine nicht aufweisen (negative Oberflächenmarker). Positive Marker darunter sind Endoglin (Eng) (CD 105), 5'-nucleotidase,ecto (NT5E) (CD 73) und THY1 (CD 90). Zu den negativen Markern zählen PTPRC (CD 45), CD 34 molecule (CD 34), CD 14 molecule (CD 14) und Mac1 (CD 11b). Zuletzt müssen MSCs die Eigenschaft besitzen, sich *in vitro* unter Stimulation osteogen, adipogen und chondrogen zu differenzieren [76].

Für Ratten mesenchymale Stammzellen (MSC(rat)) besteht bis heute allerdings kein gemeinsamer Konsens. Stattdessen fanden sich in der Literatur unterschiedliche

Kriterien [95, 96]. So wurden für Fisher Ratten morphologische Charakteristika verwendet [97], während bei Lewis Ratten alleine die Durchflusszytometrie als Kriterium ausreichte [98]. Der überwiegende Teil der Autoren folgte allerdings den drei von Dominici für humane MSCs genannten Kriterien: Plastikadhärens, Expression bestimmter Oberflächenmarker sowie der Differenzierung in Knochen-, Fett- und Knorpelgewebe [99-102].

Bezüglich der Oberflächenmarker kam es jedoch zu unterschiedlichen Ergebnissen. Aus diesem Grund verglich Ran Barzilay et al. die Oberflächenbeschaffenheit, mesenchymaler Stammzellen, stammend von vier Rattengattungen [99]. Seine Ergebnisse zeigten, dass THY1 (CD 90) und ITGB1 (CD 29) von allen Gattungen exprimiert wurden, während PTPRC (CD 45) und Mac1 (CD 11b) von keiner Rattengattung exprimiert wurde.

Aufgrund dieser Recherche wurde sich in dieser Arbeit dafür entschieden ebenfalls auf die Kriterien von Dominici et al. zurückzugreifen und die Zellen dabei auf die von Barzilay et al. untersuchten Oberflächenmarker zu testen.

### 4.2.1 Differenzierung

Die Fähigkeit sich in verschiedene Gewebe zu differenzieren, ist eine Grundvoraussetzung für eine Stammzelle. Wie oben beschrieben, wurden für diese Studie die Fähigkeit in Fett- und in Knochengewebe zu differenzieren als Charakterisierungseigenschaften vorausgesetzt. Da sowohl die adipogene, als auch die osteogene Differenzierung in beiden Versuchsgruppen gelang, war dieses stammzellcharakterisierende Kriterium als erfüllt anzusehen. Unterschiede ergaben sich allerdings hinsichtlich der Ausprägung der Differenzierung zwischen den beiden Versuchsgruppen.

#### **4.2.1.1 Adipogene Differenzierung**

Für die adipogene Differenzierung wurde erstmalig in diesem Labor eine Quantifizierung etabliert. Dieses AdipoRed Assay Reagent<sup>®</sup> eröffnete auch für andere im Labor durchgeführte Studien erstmals die Möglichkeit einer statistischen Analyse der zuvor nur optisch dargestellten adipogenen Differenzierung. Da es sich dabei jedoch um einen fettbindenden fluoreszierenden Farbstoff handelt, konnte das Ergebnis zwar quantitativ aber nur ungenügend optisch eruiert werden. Für eine

kontrastreiche farbliche Fotodokumentation unter dem Mikroskop war zu diesem Zweck eine Wiederholung des Versuchs und Färbung mittels Oil-Red-O Farbstoff notwendig.

Die Auswertung der adipogenen Differenzierung ergab einen signifikant höheren Anteil an Fettgewebe in der hypoxischen Versuchsgruppe (**Abbildung 7**). Dies lässt sich wohl am besten durch die physiologische Nische von Fettzellen erklären. *In vivo* durchgeführte Untersuchungen ergaben dabei eine Sauerstoffkonzentration von 3 % im Fettgewebe der Maus [49, 61]. Es ist also davon auszugehen, dass die hypoxische Umgebung einen Vorteil hinsichtlich der Fettgewebsdifferenzierung darstellt, was die Versuchsergebnisse plausibel erscheinen lässt.

In der Literatur werden allerdings sowohl unterschiedliche Ansichten, als auch Ergebnisse präsentiert. Dabei beschreiben einige Autoren eine reduzierte adipogene Differenzierung unter Hypoxie [103-105]. Dies wird durch einen Stammzellarrest; das Erhalten des Stammzellcharakters; unter niedrigen Sauerstoffkonzentrationen gegenüber einer Differenzierung zu Fettgewebe begründet [106]. Andere Autoren publizierten Ergebnisse, welche wiederum mit denen dieser Studie einhergingen [16, 107-110].

Eine mögliche Erklärung für diese abweichenden Ergebnisse könnte der unterschiedliche Sauerstoffgehalt innerhalb des Fettgewebes sein. Bei den zuvor beschriebenen 3 %  $O_2$ -Gehalt handelt es sich um einen Durchschnittswert des Fettgewebes. Da die genaue Position der adMSCs innerhalb des Fettgewebes relativ zu anderen Fettzellen jedoch noch unbekannt ist, ist es durchaus denkbar, dass je nach Lage der adMSC, z.B. in unmittelbarer Nähe zu einem Blutgefäß (höherer  $O_2$ -Gehalt) oder weiter entfernt (niedrigerer  $O_2$ -Gehalt), die Stammzelle an einen minimal höheren oder niedrigeren Sauerstoffgehalt adaptiert ist, als die ausdifferenzierte Fettzelle [49]. Die physiologische Sauerstoffkonzentration der adMSCs und der Adipozyten liegt also sehr nah beieinander, so dass geringe  $O_2$ -Konzentrationsabweichungen von 1 – 3 %  $O_2$  bei der Kultivierung in den unterschiedlichen Labors über einen adipogenen Differenzierungsvorteil oder Nachteil entscheiden könnten.

In der Analyse der quantitativen Ergebnisse fiel zusätzlich ein relativer Anstieg der Fluoreszenz in beiden Kontrollgruppen auf (**Abbildung 7**). Dies ist vermutlich auf die unter dem Mikroskop sichtbar werdende Hintergrundfluoreszenz zurückzuführen. Ein ähnliches Phänomen wurde auch bei späteren Versuchen mittels AdipoRed Assay Reagent® beobachtet.

### 4.2.1.2 Osteogene Differenzierung

Die osteogene Differenzierung gestaltete sich deutlich schwieriger, als die adipogene. Insgesamt bedurfte sie längerer Kultivierungszeit. So zeigten sich die ersten Calciumablagerungen erst nach vier Wochen. Außerdem kam es in der hypoxischen Versuchsgruppe mehrfach zum Abheben des Zellrasens von der Kulturschale. Der Versuch musste aus diesem Grund drei Mal wiederholt werden. Unter mikroskopischer Betrachtung fiel eine höhere Zellkonfluenz der hypoxischen Differenzierungs- und Kontrollgruppe auf (**Abbildung 9**). Es ist daher hypothetisch möglich, dass sich die hypoxisch kultivierten Zellen während der fünf wöchigen Differenzierung schneller vermehrt haben, als die normoxisch kultivierten. Das schnellere Wachstum könnte zur Überbesiedlung der 6-Well Kulturschalen und so zum Abheben des Zellrasens geführt haben. Um diese Theorie jedoch sicher zu belegen, hätten die Zellrasen der hypoxisch und normoxisch kultivierten Zellen mittels Trypsin gelöst und anschließend die Zellen gezählt werden müssen.

Das Ergebnis wurde qualitativ und quantitativ erhoben. Dabei wurde übereinstimmend eine bessere Differenzierung unter Normoxie beobachtet (**Abbildung 8**, **Abbildung 9**, **Abbildung 10**). Das Ergebnis wird noch aussagekräftiger, greift man die genannte Hypothese erneut auf und geht davon aus, dass zum Zeitpunkt der Kalziumproduktion die Anzahl an normoxisch kultivierten adMSC(rat) bereits geringer war, als die an hypoxisch kultivierten. Weniger NC produzierten demnach also in gleicher Zeit mehr Kalzium, als die in der Anzahl überlegenen HC.

In diesem Labor wurden zuvor bereits hypoxisch präkonditionierte humane MSCs unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen differenziert. Die Ergebnisse korrelierten dabei mit den Resultaten der aus dem Fettgewebe entnommenen Rattenzellen aus dieser Studie [111]. Die osteogene Differenzierung gelang deutlich besser unter normoxischen Bedingungen. Ein Grund dafür könnte erneut die

physiologische Nische sein. Teng Ma et al. beschrieben 2009 die optimale Sauerstoffkonzentration für Osteoblasten *in vitro* als 20 % O<sub>2</sub> [49]. Der Sauerstoffkonzentrationsgradient zwischen ausdifferenzierten Zellen und Stammzellen liegt demnach deutlich weiter auseinander als bei den Fettgewebszellen und begünstigt offensichtlich die osteogene Differenzierung bei höheren Sauerstoffkonzentrationen. Die Ergebnisse befinden sich im Einklang mit der überwiegenden Zahl verfügbarer Studien. So beschrieben mehrere Autoren sowohl für aus dem Knochenmark, als auch für aus dem Fettgewebe stammende, humane MSCs eine Inhibition der osteogenen Differenzierung unter Hypoxie [112-116]. Besonders eindrucksvoll sind die Ergebnisse von Raheja et al.. Sie verglichen 2010 das osteogene Differenzierungspotential mesenchymaler Stammzellen unter 1 %, 2 %, 5 % und 21 % O<sub>2</sub>. Danach ergab sich die stärkste Differenzierung unter 21 % Sauerstoffgehalt, während Sauerstoffkonzentrationen unter 5 % ein reduziertes osteogenes Differenzierungspotential zeigten [114]. Einige Autoren leiteten daraus ebenfalls die Schlussfolgerung ab, dass Hypoxie einen entscheidenden Einfluss auf den Erhalt der multipotenten Charakteristika von Stammzellen ausübt [117-120].

### 4.2.2 Oberflächenprofil

Abhängig von der Herkunft und der fortgeschrittenen Differenzierung weisen Körperzellen spezifische Oberflächenantigene auf. Aus diesem Grund werden sie häufig, wie in diesem Fall, zur Charakterisierung von Zellen herangezogen. Man unterscheidet zwecks Charakterisierung positive von negativen Markern. Positive Marker entsprechen Oberflächenantigenen, welche von einer bestimmten Zelle exprimiert werden, wobei negative Marker auf der Zelle nicht vorkommen.

Zur Darstellung der Oberflächenproteine wurden diese mittels Antikörpern markiert und deren spezifische Bindung zueinander gemessen (**Abbildung 11**). Dominici et al. setzte für die Charakterisierung von humanen MSCs  $\geq 95$  % spezifische Bindungen für die positiven und  $\leq 2$  % spezifischer Bindungen für die negativen Marker voraus [76]. Diese Kriterien wurden nahezu von allen Zellen erfüllt. Alleine die hypoxisch kultivierten Zellen aus Tier 1 erreichten die genauen Kriterien nicht. In diesem Fall gingen die Antikörper mit den beiden positiv Markern THY1 und ITGB1 nur zu 94,8 % spezifische Bindungen ein (**Tabelle 2**).

Aufgrund der geringen Abweichung wurde in diesem Fall von einer Messungenauigkeit oder einem Fehler im Setzen des Intervalls ausgegangen. Auch ist zu bedenken, dass sich Dominici's Konsenspaper auf humane MSCs bezieht. Ein Konsens bezüglich Rattenzellen wurde bislang nicht gefunden.

Zu guter Letzt war auch nicht davon auszugehen, dass sich das Oberflächenprofil zwischen Normoxie und Hypoxie verändert hat. Der Versuch wurde zu einem frühen Kultivierungszeitpunkt, in Passage 5 durchgeführt. Da in der normoxischen Versuchsgruppe bei den selben Zellen eine spezifische Bindung von > 99 % gemessen wurde, war diese geringe Abweichung in der hypoxischen Versuchsgruppe tolerabel.

Die Expression spezifischer Oberflächenmoleküle, als Charakteristikum für adMSC(rat) war demnach, wie die Plastikadhärens und die Differenzierung in Fett- und Knochengewebe als erfolgreich anzusehen. Signifikante Unterschiede unter den beiden Versuchsgruppen, bezogen auf das Oberflächenprofil, konnten nicht beobachtet werden.

### 4.3 Zelleigenschaften

#### 4.3.1 Populationsverdopplung

Ein entscheidendes Kriterium bei der Kultivierung von Zellen ist deren Proliferationsrate. Das Prinzip des Tissue Engineering baut darauf auf, entnommene Zellen zu ausreichend großen Zellzahlen zu expandieren und sie anschließend zu reimplantieren. Je mehr Zellen also *in vitro* im selben Zeitraum gewonnen werden desto mehr können auch wieder implantiert werden. Hohe Zellzahlen erhöhen wiederum, sehr wahrscheinlich die gesamt Überlebenschance der Zellart *in vivo*. Zu diesem Zweck ist es von entscheidender Wichtigkeit, die Zellen unter möglichst idealen Bedingungen zu kultivieren, um das Zellwachstum zu unterstützen.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigten eine höhere Populationsverdopplungsrate der hypoxisch kultivierten adMSC(rat) gegenüber ihrer normoxisch kultivierten Vergleichsgruppe (**Abbildung 12**). Nach 180 Tagen Versuchszeitraum befanden sich beide Versuchsgruppen noch im Wachstum und es zeigte sich eine

durchschnittliche kumulative PD von 150 in Hypoxie gegenüber 96 in Normoxie. Die HC zeigten bei allen drei Versuchstieren zu jedem Messzeitpunkt eine höhere Populationsverdopplung. Ein signifikant schnelleres Wachstum konnte trotz allem, auf Grund deutlich unterschiedlicher Wachstumsgeschwindigkeiten zwischen den einzelnen Versuchstieren nicht berechnet werden.

Für aus der Ratte entstammende MSCs ist allgemein eine schnellere Proliferation gegenüber humanen MSCs bekannt [121]. Das Übertragen der Ergebnisse auf das Wachstumspotential humaner MSCs ist daher nicht ohne weiteres möglich.

Vergleichbare Ergebnisse bezüglich eines Proliferationsvorteils unter Hypoxie für humane MSCs finden sich jedoch zahlreich in der Literatur [120, 122]. So zeigten Nekanti et al. 2010 eine höhere Populationsverdopplung unter hypoxischen Bedingungen bei aus der Nabelschnur gewonnenen MSCs [123]. Grayson et al. beschrieben sogar eine 30-fache Wachstumsbeschleunigung der MSCs in Hypoxie gegenüber Normoxie [124].

Eine mögliche Erklärung für die gesteigerte Proliferation unter Hypoxie liegt in der Hochregulierung der Notch Ziel Gene *Hes* und *Hey* [125]. Dabei kommt es zunächst zu einer Kommunikation des hypoxischen extrazellulären Milieus und der extrazellulären Domäne der Notch. Dies löst eine intrazelluläre Signalkaskade aus, welche zu einer Aktivierung der Notch Ziel Gene *Hes* und *Hey* im Nucleus führt [126-128].

### 4.3.2 Colony Forming Unit

Beim Aussäen von niedrigen Zellzahlen auf Petrischalen haben MSCs die Eigenschaft Kolonien zu bilden [80, 129]. Diese Eigenschaft macht man sich beim CFU Experiment zu nutze. Die Anzahl an gebildeten Kolonien gibt dabei Aufschluss über die Proliferationsrate und die Viabilität der zu vergleichenden Zellgruppen. Voraussetzung für die Bildung von Kolonien ist nämlich die Fähigkeit zur Zellteilung. Im Gegensatz zu Zellzahlmessungen im Zell Zähler, werden in der CFU demnach nur teilungsfähige, viable Zellen erfasst.

Die in dieser Studie in verschiedenen Passagen durchgeführte CFU ergab zu allen Zeitpunkten signifikant mehr Kolonien in der hypoxischen Versuchsgruppe (**Abbildung 13 A**). Das Experiment lieferte also einen weiteren Anhalt für die gesteigerte Proliferation der adMSC(rat) unter Hypoxie. Die Ergebnisse korrelierten dabei mit denen anderer Autoren für humane MSCs, die ebenfalls eine gesteigerte Koloniebildung unter Hypoxie feststellten [124, 130].

Zusätzlich fiel eine Zunahme der Kolonien der adMSC(rat) in höheren Passagen auf. Der Anstieg zeigte sich in beiden Versuchsgruppen, wurde aber vor allem beim Versuch in Passage 20 für die hypoxischen adMSC(rat) deutlich (**Abbildung 13 A**). Dieses Phänomen ist wohl am besten dadurch zu erklären, dass durch die vermehrten Passagewechsel eine Selektion unter den Zellen hin zu teilungsfähigeren Zellen stattgefunden hat. Dieses Argument wird besonders glaubhaft, betrachtet man hinzukommend die zunehmend homogenere Zellmorphologie (**Abbildung 15**). Diese Selektion war in der schneller proliferierenden und morphologisch heterogeneren, hypoxischen Versuchsgruppe folglich ausgeprägter und macht den Koloniestieg in höheren Passagen somit plausibel.

Eine weitere interessante Beobachtung betraf die Form der einzelnen Kolonien. Dabei fiel auf, dass die HC größere Kolonien formten als die NC (**Abbildung 13 B, C**). In der Literatur wurden unterschiedliche Zelltypen für verschieden große Kolonien beschrieben [131, 132]. So fanden sich in größeren Kolonien vermehrt SS (spindel shaped) Zellen, während in kleineren Kolonien FC (flatended cells) das Zellbild beherrschten [102]. Da die einzelnen Kolonien jedoch nicht abgemessen wurden, kann aus diesen Beobachtungen nur ein vager Rückschluss auf das morphologische Zellbild geschlossen werden. Auch ist es möglich, dass die gesteigerte Koloniedichte unter Hypoxie zu Kolonieüberlappungen geführt haben könnte. Vergleicht man jedoch die gewonnenen Erkenntnisse mit den Ergebnissen über die Zellmorphologie, so bestätigt sich ein höherer Anteil an SS und RS Zellen unter den hypoxisch kultivierten adMSC(rat). Dieser Aspekt wird jedoch in folgendem Kapitel genauer behandelt.

### 4.3.3 Morphologie

Bereits in frühen Passagen wurde auffällig, dass sich die beiden Versuchsgruppen bezüglich Größe und Form der Zellen unterschiedlich entwickelten (**Abbildung 14**). Während der Durchführung der Colony Forming Unit wurden zudem noch größere Kolonien in der hypoxischen Versuchsgruppe beobachtet. Aus diesen Gründen wurde eine genauere Analyse der Zellmorphologie der Versuchsgruppen durchgeführt.

Seit 1999 beschäftigen sich Wissenschaftler mit der Heterogenität von mesenchymalen Stammzellen [133]. Dabei wurden in diversen Studien mindestens vier morphologisch unterschiedliche Subpopulationen abgegrenzt: rapidly selfrenewing cells (RS-Zellen), spindle shaped cells (SS-Zellen), flattened cells (FC) und flatended spindle shaped cells (FSS-Zellen) [131, 134]. Diese werden Anhand des Aspect Ratio und der Zellfläche unterschieden.

Besonders interessant ist, dass sich die verschiedenen Subpopulationen auch in Hinsicht auf ihre speziellen Charaktereigenschaften unterscheiden. So wurde beispielsweise eine erhöhte Proliferationsrate für RS-Zellen und eine verbesserte chondrogene Differenzierung bei SS-Zellen beschrieben [132, 135]. Auch wurde eine abweichende Expression von Oberflächenmolekülen unter den verschiedenen Subpopulationen festgestellt. Während bei RS-Zellen die positiven Stammzellmarker NT5E (CD 73), THY1 (CD 90) und Eng (CD 105) vermehrt nachgewiesen werden konnten, exprimierten FC diese nur selten [42]. Des Weiteren wurden Unterschiede in der Regenerationskapazität verschiedener Subpopulationen deutlich. So wurde eine erniedrigte Regenerationsfähigkeit bei SS-Zellen und besonders FC beschrieben [46]. RS Zellen hingegen gelten als die am schnellsten regenerierenden Zellsubpopulationen [136].

Zusammenfassend machen die Ergebnisse deutlich, dass RS-Zellen am ehesten dem Stammzellcharakter, schnelle Proliferationsrate, stammzelltypisches Oberflächenprofil und hohe Regenerationskapazität, entsprechen. Folglich gilt es zu hinterfragen, ob es sich bei den restlichen Zellgruppen tatsächlich um Subpopulationen mesenchymaler Stammzellen handelt, bzw. ob sie dem Erscheinungsbild nach, ausdifferenzierten Zellen näher kommen. In einigen

Publikationen werden beispielsweise FC einem ausdifferenzierterem Zellstadium der osteogenen Linie zugeschrieben [136, 137].

Betrachtet man nun die Ergebnisse dieser Studie unter Berücksichtigung der genannten Eigenschaften der Subpopulationen ergeben sich einige interessante Aspekte. So zeigten die vorliegenden Resultate einen Anstieg der RS-Zellen unter Hypoxie und gleichzeitig niedrigere Anzahlen an RS-Zellen unter Normoxie. Bezüglich der FC verhält es sich genau gegensätzlich. Hier nimmt der Anteil an FC bei steigender Passage unter Normoxie zu und unter Hypoxie ab (**Abbildung 15**).

In Anbetracht des Proliferationsvorteils und der gesteigerten Regeneration der RS-Zellen, erklärt sich auf diese Weise das beschleunigte Wachstum (**Abbildung 12**) und die gesteigerte Koloniebildung (**Abbildung 13**) der hypoxisch kultivierten adMSC(rat), gegenüber der normoxischen Versuchsgruppe. Auch erklärt sich recht plausibel die niedrigere Seneszenz (**Abbildung 18**) und gesteigerte metabolische Aktivität (**Abbildung 17**) der hypoxischen Zellen.

Auf der anderen Seite, bietet die Heterogenität der normoxischen adMSC(rat) eine mögliche Erklärung für die verbesserte osteogene Differenzierung unter Normoxie (**Abbildung 10**). Dabei ist es erdenklich, dass der höhere Anteil an FC Zellen, welche sich bereits in einem osteogenen Vorläuferstadium befinden, zu einer vereinfachten osteogenen Differenzierung geführt hat. Diese These ließe sich jedoch nur durch Einzelzellisolierungen von FC und RS-Zellen, mit anschließender osteogener Differenzierung beider Subpopulationen sicher belegen.

Besonders interessant in Bezug auf das unterschiedliche Differenzierungspotential sind die Ergebnisse von McBeath 2004. Er konnte demonstrieren, dass runde, breite Zellen zu osteogener Differenzierung neigten, während kleine, längliche Zellen eine Tendenz zur adipogenen Differenzierung aufwiesen [138]. Diese Ergebnisse sind gut vereinbar mit den Ergebnissen dieser Studie. So kam es unter Normoxie zu einer vermehrten Bildung von breiten (FC) Zellen (**Abbildung 15**) und gleichzeitig zu einer Verbesserung der osteogenen Differenzierung (**Abbildung 10**). Unter Hypoxie im Gegenzug nahm der Anteil an kleinen, länglichen Zellen (SS-Zellen) zu (**Abbildung 15**) und verbesserte damit das adipogene Differenzierungspotential (**Abbildung 7**).

Abschließend bleibt aus genannten Beobachtungen und formulierten Überlegungen festzuhalten, dass RS-Zellen der Subpopulation mit der größten Multipotentialität entsprechen. Die Versuchsergebnisse unterstützen demzufolge die These einer besseren Erhaltung des Stammzellcharakters von adMSC(rat) unter Hypoxie [42].

### 4.3.4 Zytoskelettfärbung

Innerhalb eines Gewebeverbundes, stehen Stammzellen im direkten Austausch und Kontakt mit den sie umgebenden Zellen und der extrazellulären Matrix [139, 140]. Diese Kommunikation ist für die weitere Differenzierung und Aufgaben der Stammzelle von essentieller Wichtigkeit [141].

Hergestellt wird die zelluläre Kommunikation u.a. über transmembranär verlaufende Integrine, die in der Lage sind extrazelluläre Proteine zu binden. Im Inneren der Zelle kommunizieren diese Integrine mit Actin-Filamenten [142, 143]. Das Actin bildet innerhalb der Zelle ein Netzwerk aus Filamenten aus und ist damit, als Hauptbestandteil des Zytoskeletts, zum Großteil für die morphologische Struktur der Zelle verantwortlich [144]. Das Netzwerk befindet sich in einem regen Umbau, und ist somit in der Lage sich unterschiedlichen extrazellulären Umgebungen anzupassen. Dem Umbau des Zytoskeletts wird in der Wissenschaft aber auch eine zentrale Rolle bezüglich der Funktion und der Differenzierung der Zelle zugerechnet [145, 146]. So benötigen beispielsweise Osteoblasten, aufgrund ihrer starken mechanischen Beanspruchung ein elastisches, unbiegsames Zytoskelett. Die Elastizität wird auf molekularer Ebene durch direkte Bindung der Zellwand zum Zytoskelett durch Bindungsproteine wie Ezrin, Radixin oder Myosin-I realisiert [147]. HMSCs, welche im Gegenzug in der Lage sein müssen schnell auf neue Situationen mit Zellauswanderung, -differenzierung oder -proliferation reagieren zu können, weisen demgegenüber eine leichter verformbare Zellmembran auf [145].

In der Zytoskelettfärbung (**Abbildung 16**) zeigten sich in der normoxischen Versuchsgruppe in allen Passagen deutlich ausgeprägte, gut differenzierbare, dicke Actin Bündel. Demgegenüber waren die Bündel der hypoxischen Zellen in sämtlichen Passagen dünner und schwieriger abgrenzbar.

Konträrerweise deuten dünne Actin Bündel, wie in unserem Versuch unter Hypoxie zu beobachten war (**Abbildung 16**), auf eine hohe Elastizität und somit auf eine ausdifferenziertere Zelle hin [145, 148]. Dies würde unserer bisherigen Annahme einer besseren Erhaltung der Stammzellcharakteristik unter Hypoxie widersprechen. Der Gedankengang kann jedoch relativiert werden, geht man davon aus, dass die Actin Bündel in den vergleichsweise kleineren hypoxischen adMSC(rat) nicht ausreichend zur Entfaltung gekommen sein könnten. Außerdem muss in Betracht gezogen werden, dass für den Versuch nur vereinzelte, eventuell nicht repräsentative, Zellen herangezogen wurden.

Es bleibt jedoch festzuhalten, dass die deutlich in Erscheinung tretenden dicken Actin Bündel in der normoxischen Versuchsgruppe ein Hinweis auf eine leicht verformbare Zellmechanik darstellen, wie sie typischerweise in Stammzellen vorliegt. Der Versuch entkräftet demnach die These, breite Zellen seien bereits vollständig ausdifferenziert.

### 4.3.5 Zellmetabolismus

Durch diesen Versuch wurde die metabolische gesamt Aktivität der beiden Versuchsgruppen in unterschiedlichen Passagen ermittelt.

Die Ergebnisse zeigten eine in allen Passagen signifikant höhere metabolische Aktivität der hypoxisch kultivierten adMSC(rat) gegenüber den normoxisch kultivierten. Das erhöhte Aktivitätsniveau blieb dabei über alle Passagen gemessenen konstant (**Abbildung 17**).

Die Resultate korrelieren dabei sehr gut, mit den Wachstumskurven der NC und HC (**Abbildung 12**). Dort zeigte sich ein, mit der metabolischen Aktivität korrelierendes, annähernd konstant verlaufendes, schnelleres Populationswachstum der adMSC(rat) unter Hypoxie.

Weniger gut gelingt die Korrelation mit anderen Zellcharakteristika. So hätte beispielsweise die Zunahme der teilungsaktiveren und vermutlich metabolisch aktiveren RS-Zellen in der hypoxischen Versuchsgruppe, ebenso einen Anstieg der

metabolischen Aktivität in höheren Passagen vermuten lassen. Die Änderung des morphologischen Zellbildes (**Abbildung 15**) scheint jedoch keinen entscheidenden Einfluss auf die metabolische Gesamtaktivität zu nehmen. Genauso wenig erklärt sich in diesem Zusammenhang eine Zunahme der Koloniebildung mit steigender Passage (**Abbildung 13**). Auch diesbezüglich wäre eine ansteigende metabolische Aktivität in höheren Passagen plausibel gewesen.

### 4.3.6 Seneszenz

Seit den ersten Ergebnissen bezüglich des Zellalters von Hayflick im Jahre 1961 war das Altern von Zellen ein fester Bestandteil der Zellforschung [149]. Auf der Basis dieser Forschungsarbeiten stellte Harley 1992 die heute noch aktuelle Telomer-Hypothese des Alterns auf [150]. Telomere sind an den Enden der Chromosomen lokalisierte repetitive DNA Sequenzen, welche bei der Zellteilung verkürzt werden. Abhängig von der Telomerlänge kann sich eine Zelle also häufiger oder seltener teilen [151]. Stammzellen wiederum besitzen ein Enzym (Telomerase) welches in der Lage ist, die Telomere zu verlängern und somit dem Alterungsprozess vorzubeugen [152].

Doch nicht Zellteilung alleine führt zum Abbau der Telomere. So ist nachgewiesen worden, dass auch reaktive Sauerstoffspezies (ROS, freie Radikale) zur Schädigung der DNA und somit zur fortschreitenden Seneszenz beitragen können [153, 154]. Interessanterweise zeigen neuere Studien eine reduzierte Anhäufung von ROS unter hypoxischen Kulturbedingungen bei MSCs [155, 156]. Diese wird durch eine Umgehung der mitochondrialen Atmungskette und Umstellung auf anaeroben Stoffwechsel unter Hypoxie zurückgeführt [157, 158]. Auch konnte bereits ein regulatorischer Einfluss von ROS auf HIF-1 bewiesen werden [159]. Da geringere Mengen an ROS nachweislich zu reduziertem Telomer Abbau führen, ist zu schlussfolgern, dass Hypoxie einen verlangsamen Einfluss auf die Zellseneszenz übt [160, 161].

Diese Gesichtspunkte korrelieren sehr gut mit den in dieser Studie gewonnenen Beobachtungen. So zeigte sich mit zunehmender Passage eine, relativ zur hypoxischen Versuchsgruppe betrachtet, ansteigende Seneszenz der normoxischen adMSC(rat) (**Abbildung 18**). Die signifikanten Ergebnisse sprechen demnach für ein

schnelleres Zellaltern der adMSC(rat) unter Normoxie und ein reduziertes Altern unter Hypoxie.

Unter Berücksichtigung der genannten Kenntnisse über ROS kann davon ausgegangen werden, dass die geringere Menge an ROS unter Hypoxie auch einen entscheidenden Einfluss auf die Erhaltung der Stammzellcharakteristika ausübt. Da der reduzierende Einfluss von Hypoxie auf ROS bereits erbracht wurde, müsste zum Belegen dieser These der Gehalt an ROS in Stammzellen zu ausdifferenzierten Zellen verglichen werden.

Eine weitere Erklärung für die langsamere Zellalterung unter Hypoxie liefert ein in höheren Passagen immer größer werdender Anteil an RS Zellen. Die RS-Zellen behalten ihren Stammzellcharakter bei und entsprechen somit jüngeren Zellen, als die unter Normoxie in höheren Passagen zunehmenden FC (**Abbildung 15**).

Unter all diesen Gesichtspunkten erscheint die zunehmende Seneszenz der normoxisch kultivierten adMSCs(rat) plausibel und die hypoxische Kulturform bezogen auf reduzierte Zellalterung als ausschlaggebend.

### 4.4 Überleben in Anoxie

Eine der Hauptproblematiken des Knochen Tissue Engineerings stellt der eintretende Zelltod nach Implantation in den Knochendefekt dar. Es wird angenommen, dass ein entscheidender Grund dafür, die fehlende Gefäßversorgung zu Beginn und die damit einhergehende Unterversorgung der mesenchymalen Stammzellen mit Sauerstoff und Nährstoffen darstellt [16, 17, 23, 66]. Einige Studien untersuchten das Schicksal der transplantierten Zellen und zeigten, dass innerhalb der ersten zwei Wochen ca. 80 % der Zellen abstarben [64, 65, 162]. Ein möglicher Ansatz zur Förderung des Überlebens der transplantierten Zellen stellte die vorzeitige Gefäßversorgung, die so genannte Prävascularisierung dar. Es konnte gezeigt werden, dass es bei Implantation einer Leitschiene um ein Gefäßbündel zum Einwachsen von Blutgefäßen in die Leitschiene und damit zu einer Steigerung des Zellüberlebens kommt. Allerdings stellt das nachträgliche Aufbringen der Zellen in eine mit

Bindegewebe und Blutgefäßen gefüllte Leitschiene ein erhebliches Problem dar [67]. Des Weiteren macht dieses Verfahren mehrere komplexe Operationen notwendig.

Einen möglichen Ansatz zur Förderung des Überlebens der Zellen nach Implantation bietet die hypoxische Präkonditionierung. In vorangegangener Diskussion wurden bereits diverse Vorzüge der hypoxischen Kultivierung gegenüber der herkömmlichen Kultivierung unter Normoxie beschrieben. Auch konnte in einigen Studien ein erhöhtes Zellüberleben durch hypoxische Präkonditionierung für kardiale und neurale Zellen nach Infarkten demonstriert werden [163, 164].

Unser *in vitro* Modell zur Untersuchung dieser Bedingungen stellt die Kultur unter Anoxie dar (**Abbildung 4**). Zu diesem Zweck wurden die Zellen nun für 4-7 Tage in Anoxie Gefäßen kultiviert und anschließend unter FACS Analyse auf ihre Viabilität untersucht. Die Sauerstoffsensoren innerhalb der Anoxiegefäße, wiesen dabei ein kontinuierliches Sauerstofflevel von 0 % nach (**Abbildung 20**). Die Annahme eines Überlebensvorteils der zuvor hypoxisch präkonditionierten Zellen, konnte jedoch auch nach mehrmaligem Wiederholen des Experiments nicht belegt werden.

An den Tagen 4-6 zeigte sich zwar kein Unterschied zwischen zuvor hypoxischen und normoxischen Zellen, dafür aber eine plausible Abnahme der lebendigen Zellen und Anstieg der frühapoptotischen Zellen (**Abbildung 19**). Ein erneuter Anstieg an lebendigen adMSC(rat) am 7. Tag der Kultivierung unter Anoxie, widersprach hingegen unseren Erwartungen. Ein Grund dafür könnte eine zu hohe Zellaussaat auf die Petrischalen für Tag 7 sein. Weitere Probleme könnten auf das sehr aufwendige Färbungsprotokoll zurückzuführen sein. Es ist dabei durchaus denkbar, dass geringere Mengen an toten oder spät apoptotischen Zellen beim Absaugen des Mediums verloren gegangen sind.

Alternativ könnte dem Versuch auch ein systematischer Fehler zu Grunde liegen. Ein mögliches Problem im Versuchsaufbau wurde dabei im Temperaturverhalten der AnaeroGen Beutel entdeckt. Diese Beutel erzeugen nach Eröffnung mittels einer chemischen Reaktion ein anoxisches Milieu im Anoxie Gefäß. Beobachtet wurde dabei ein Anstieg der Temperatur innerhalb des Gefäßes zu Beginn der chemischen Reaktion. Dabei stieg die Temperatur auf über 40 °C an (**Abbildung 21**).

Möglicherweise kam es durch den Temperaturanstieg zu einer Zellschädigung, welche die Ergebnisse beeinflusst haben könnte. Auch ein prozentualer Wiederanstieg an lebendigen Zellen an Tag 7 erscheint dadurch plausibel. So tritt der zellschädigende Temperaturanstieg nur einmal zu Beginn der anoxischen Kultivierung auf und verliert somit im weiteren Versuchsablauf zunehmend an Einfluss auf die prozentuelle Aufteilung der Zellviabilitätszustände.

Anhand der vorliegenden Daten konnten wir also keine signifikanten Unterschiede in Hinsicht auf das Zellüberleben von adMSC(rat) zwischen hypoxischer und normoxischer Zellkultur nachweisen. Es wird Inhalt nachfolgender Studien sein, das Zellüberleben unter Anoxie anhand anderer Modelle tiefgründiger zu untersuchen.

## 5 Ausblick

Die vorliegende Studie untersuchte den Einfluss des Sauerstoffgehaltes in der Zellkultur auf unterschiedliche Zellcharakteristika von mesenchymalen Stammzellen gewonnen aus dem Fettgewebe von Ratten. Es zeigte sich, dass der Sauerstoffgehalt in der Zellkultur Einfluss auf verschiedenste Zellcharakteristika nimmt. So konnten wir nachweisen, dass ein Sauerstofflevel von 2 %, sowohl die Zellteilung und die Koloniformung steigert, als auch Einfluss auf die morphologische Entwicklung und die Differenzierungseigenschaften der Zellen übt.

Die gesteigerte Zellproliferation in Hypoxie erlaubt es in kurzer Zeit *in vitro* größere Mengen an Zellen für die Reimplantation zu gewinnen. Zudem ergab sich eine Hypoxie bedingte, gesteigerte metabolische Aktivität, und verlangsamte Zellalterung. Morphologische Betrachtungen zeigten eine Zunahme von spindelförmigen Zellen (SS-Zellen), wohingegen unter Normoxie die Anzahl an flachen ausgebreiteten Zellen (FC) zunahm. Die Ergebnisse wurden mit denen, gewonnen aus humanen MSCs verglichen, wobei sich erwartungsgemäß große Übereinstimmungen zeigten.

Zusammenfassend betrachtet geben die Ergebnisse Grund zur Annahme eines stammzellerhaltenden Effektes von Hypoxie auf adMSC(rat). Ein zukünftiges Arbeiten mit hypoxischer Zellkultur könnte demnach im Gesamtkonstrukt des Tissue Engineerings einen entscheidenden Vorteil bieten.

Die Frage ob das Zellüberleben in Anoxie sich durch Zellkultur in Hypoxie steigern lässt, konnte in dieser Studie nicht hinreichend geklärt werden. Es wird Inhalt nachfolgender Studien sein, verbesserte *in vitro* Versuchsmodelle zur fehlerfreien Versuchsdurchführung zu entwerfen. Dabei wäre es sinnvoll nicht alleine die Anzahl überlebender Zellen zu messen, sondern gegebenenfalls die Zelleigenschaften von präkonditionierten zu konventionell kultivierten Zellen, nach einer bestimmten Zeit in Anoxie, zu vergleichen. Auf diese Weise konnte beispielsweise für hypoxisch präkonditionierte periphere, mononukleäre Blutzellen eine höhere Zellviabilität, eine bessere Abhärtung gegen Oxidantien, sowie eine gesteigerte VEGF Produktion, nach ischämischer Behandlung, nachgewiesen werden [165]. Auch muss eine neue Methode der anoxischen Zellkultur, welche den negativen Einflussfaktor der Temperatur eliminiert, entwickelt werden. Dazu könnte auf Inkubatoren

zurückgegriffen werden, welche eine Anoxie ermöglichen und gleichzeitig die Temperatur konstant halten [166].

Die vorliegende Studie schafft die Voraussetzungen für folgende *in vivo* Studien. Durch Entnahme der MSCs aus dem Fettgewebe, welche grundsätzlich mit dem Weiterleben des Versuchstieres vereinbar ist, sowie der Charakterisierung der Zellen, wurden die Grundlagen zur Etablierung eines autologen Tiermodelles geschaffen. Durch die Etablierung eines autologen Tiermodells wird es in Zukunft gegebenenfalls nicht länger nötig sein, zur Messung des Zellüberlebens auf artifizielle, fehleranfällige *in vitro* Versuchsmodelle zurückzugreifen.

## 6 Zusammenfassung

**Einleitung:** Die Therapie großer Knochendefekte, bedingt beispielsweise durch osteoporotische Frakturen, Traumata oder Tumorresektionen, stellt ein erhebliches Problem dar. Erreichen Knochendefekte eine kritische Größe kommt es nicht zum vollständigen knöchernen Durchbau. Die autologe Knochentransplantation ist derzeit der „Goldstandard“ zur Therapie. Dieses Verfahren birgt allerdings einige wesentliche Nachteile, wie beispielsweise Hebedefektmorbidität und begrenzte Verfügbarkeit. Eine vielversprechende Alternative stellt das Tissue Engineering von Knochen dar. Dabei werden Stammzellen auf Leitschienen gesiedelt und in den Knochendefekt transplantiert. Bisher kommt es allerdings zum raschen Absterben der Zellen nach der Transplantation vermutlich bedingt durch die Anoxie ( $O_2 < 1\%$ ) an der Empfängerstelle.

**Zielsetzung:** Erstes Ziel dieser Studie war es die Grundlage für ein Kleintiermodell zur autologen Stammzelltransplantation, durch Gewinnung der Stammzellen aus dem Fettgewebe, zu schaffen. Des Weiteren sollte der Einfluss des Sauerstoffgehaltes in der Zellkultur auf verschiedene Zellcharakteristika, wie beispielsweise Wachstum, Metabolismus und Morphologie, auf diese Stammzellen der Ratte untersucht werden. Und abschließend sollte untersucht werden, ob durch die unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen das Zellüberleben in Anoxie beeinflusst werden kann.

**Methoden:** Mittels FACS-Analyse wurden die aus dem subkutanen Fettgewebe der Ratte extrahierten Zellen charakterisiert, sowie osteogen und adipogen differenziert. In unterschiedlichen Zellkulturbedingungen (2 %  $O_2$  bzw. 21 %  $O_2$ ) wurden der Zellmetabolismus (WST-Assay), die Zellproliferation (CFU-Assay, PDT), die Zellseneszenz (Beta-Glo-Assay), sowie die Zellmorphologie untersucht. Im Anschluss wurde das Zellüberleben in Anoxie der beiden Versuchsgruppen, mittels Annexin V Färbung und FACS Analyse, verglichen.

**Ergebnisse:** Es konnte der Stammzellcharakter der adipogen gewonnenen Zellen nachgewiesen werden. Dabei wurde eine gesteigerte adipogene Differenzierung unter 2 %  $O_2$  bzw. eine gesteigerte osteogene Differenzierung unter 21 %  $O_2$  nachgewiesen. Des Weiteren zeigten die Zellen unter 2 %  $O_2$  ein schnelleres

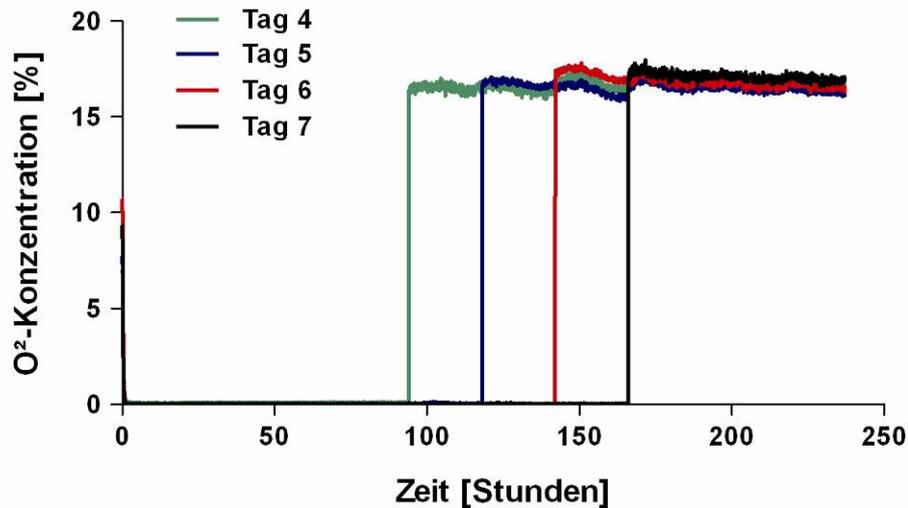
## Zusammenfassung

Wachstum, sowie signifikant geringere Seneszenz und höheren Zellmetabolismus. Auch zeigte sich unter Hypoxie eine Änderung der Morphologie hin zu RS- und SS-Zellen. Bezüglich des Verhaltens in Anoxie konnten keine Unterschiede im Hinblick auf das Zellüberleben zwischen den beiden Gruppen nachgewiesen werden.

**Diskussion:** Zusammenfassend betrachtet zeigen sich deutlich unterschiedliche Zellcharakteristika, entstehend durch die Kultivierung unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen. Unseren Ergebnissen mit Rattenzellen und vergleichbaren Studien mit humanen MSCs folgend, besteht Grund zur Annahme eines verbesserten Erhalts der Stammzellcharakteristika unter hypoxischer Kultivierung. Dazu zählen unter anderem die gesteigerte metabolische Aktivität, das Erhalten jüngeren Zellalters und das morphologische Erscheinungsbild. Es wird Ziel zukünftiger wissenschaftlicher Arbeiten sein, diese Hypothese zu belegen und molekulare Erklärungen dafür zu finden. Insgesamt ist festzuhalten, dass die hypoxische Präkonditionierung einen großen Gewinn für das Gesamtkonstrukt des Tissue Engineerings darstellt.

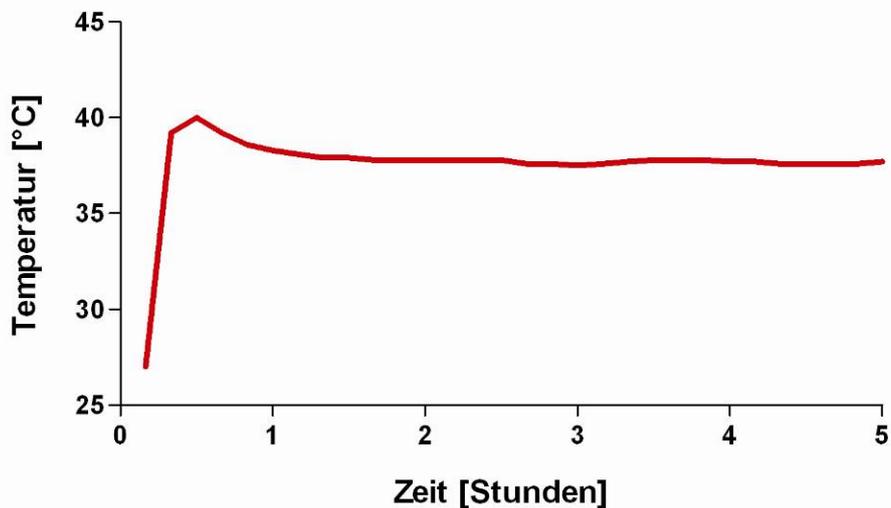
## 7 Anhang

### 7.1 Abbildungen



**Abbildung 20: Sauerstoffverhalten im Anoxiegefäß**

Zum Nachweis eines konstanten anoxischen Milieus wurde während des Versuchs zum Überleben in Anoxie, fortlaufend der Sauerstoffgehalt in den Anoxiegefäßen gemessen. Dieser blieb während des gesamten Versuchs in allen vier Gefäßen durchgehend bei 0 %.



**Abbildung 21: Temperaturverhalten im Anoxiegefäß**

Die Graphik zeigt die Temperatur im Anoxiegefäß in den ersten Stunden nach dem Starten des Versuchs. Es zeigt sich ein temporärer Anstieg der Temperatur über 40 °C nach Öffnen des AeroGen Beutels und der dabei ablaufenden chemischen Reaktion.

## 7.2 Tabellen

**Tabelle 3: Zellextraktion von adMSC(rat).**

Aus acht verschiedenen Ratten wurde Fett entnommen und gewogen. Anschließend wurden die in der Fettsuspension enthaltenen Zellen im Brutschrank normoxisch und hypoxisch kultiviert. Nach 5 Tagen wurden die Zellen gezählt und miteinander verglichen. Dokumentiert wurde die Anzahl an Zellen, welche pro isolierten Gram Fetts entstanden war.

Ratte	Zellen / Gram Fett	
	Normoxie	Hypoxie
1	65 x 10 <sup>3</sup>	329 x 10 <sup>3</sup>
2	110 x 10 <sup>3</sup>	105 x 10 <sup>3</sup>
3	100 x 10 <sup>3</sup>	375 x 10 <sup>3</sup>
4	47 x 10 <sup>3</sup>	118 x 10 <sup>3</sup>
5	53 x 10 <sup>3</sup>	155 x 10 <sup>3</sup>
6	817 x 10 <sup>3</sup>	677 x 10 <sup>3</sup>
7	27 x 10 <sup>3</sup>	427 x 10 <sup>3</sup>
8	217 x 10 <sup>3</sup>	482 x 10 <sup>3</sup>

**Tabelle 4: Subpopulationen.**

Angegeben wurden die Anteile [%] an den verschiedenen Subpopulationen unter Norm- und Hypoxie in den Passagen 5, 10, 15 und 20. Es wurde deutlich, dass unter Normoxie mit ansteigender Passage die RS-Zellen und SS-Zellen abnahmen, während die FC zunahmen. Unter Hypoxie war der gegenteilige Effekt zu beobachten.

Passage	Normoxie				Hypoxie			
	RS	FC	SS	FSS	RS	FC	SS	FSS
5	66,6	24,1	8,0	1,3	75,0	11,2	13	0,9
10	66,0	23,7	9,1	1,2	81,7	8,2	9,6	0,5
15	60,0	35,8	3,1	1,1	86,0	6,6	7,2	0,2
20	59,4	35,4	4,4	0,8	79,9	6,6	13,2	0,4

**Tabelle 5: Zellmetabolismus.**

Dargestellt wurden die Werte der Absorption nach der Umsetzung von WST-1 Reagenz zu Formazan. Für alle gemessenen Passagen ergaben sich höhere Werte in der hypoxischen Versuchsgruppe. Dies ließ auf eine höhere metabolische Aktivität der hypoxisch kultivierten adMSC(rat) schließen. Es wurden Mittelwert und Standardabweichung angegeben. Alle Experimente wurden mit drei Ratten in dreifacher Ausführung durchgeführt.

### Passage Absorption [450 nm]

	Normoxie	Hypoxie
<b>5</b>	0,24 ± 0,05	0,44 ± 0,09
<b>10</b>	0,27 ± 0,09	0,57 ± 0,13
<b>15</b>	0,17 ± 0,06	0,37 ± 0,14
<b>20</b>	0,18 ± 0,07	0,42 ± 0,09
<b>25</b>	0,24 ± 0,07	0,53 ± 0,13
<b>30</b>	0,20 ± 0,06	0,40 ± 0,10

**Tabelle 6: Seneszenz.**

Dargestellt sind die Werte der relativen Lumineszenz, welche bei der zweiten gekoppelten Enzymreaktion entstanden. Beschrieben wird somit die Aktivität an Beta-Galaktosidase in den adMSC(rat). Die Aktivität nahm in den normoxisch kultivierten adMSC(rat) in Bezug auf die HC zu. Es wurden Mittelwert und Standardabweichung angegeben. Alle Experimente wurden mit drei Ratten in vierfacher Ausführung durchgeführt.

### Passage Rel. Lumineszenz [%]

	Normoxie	Hypoxie
<b>5</b>	138,33 ± 69,26	100 ± 19,32
<b>10</b>	118,06 ± 62,18	100 ± 4,25
<b>15</b>	166,28 ± 65,36	100 ± 11,15
<b>20</b>	204,74 ± 38,85	100 ± 6,68
<b>25</b>	210,92 ± 47,50	100 ± 7,01
<b>30</b>	230,62 ± 105,11	100 ± 7,03

**Tabelle 7: Überleben in Anoxie**

Dargestellt wurden die prozentualen Anteile an lebendigen, früh-, spätapoptotischen und nekrotischen Zellen nach 4-7 Tagen. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen trat dabei nicht auf. Es wurden Mittelwert und Standardabweichung angegeben. Alle Experimente wurden mit drei Ratten in dreifacher Ausführung durchgeführt.

Tag	Zellzustand	Zellzahl [%]	
		Normoxie	Hypoxie
4	Lebendig	58,6 ± 18,4	53,9 ± 16,8
	Frühapoptotisch	17,2 ± 9,6	14,5 ± 13,0
	Spätapoptotisch	13,3 ± 10,1	13,1 ± 7,6
	Nekrotisch	10,8 ± 4,1	18,5 ± 10,2
5	Lebendig	39,2 ± 17,6	41,8 ± 14,4
	Frühapoptotisch	34,5 ± 13,4	26,5 ± 15,6
	Spätapoptotisch	17,2 ± 8,0	17,7 ± 4,8
	Nekrotisch	9,1 ± 2,9	14,0 ± 9,0
6	Lebendig	42,0 ± 18,9	39,9 ± 10,0
	Frühapoptotisch	39,7 ± 16,8	41,3 ± 12,7
	Spätapoptotisch	12,0 ± 7,0	11,5 ± 4,5
	Nekrotisch	6,3 ± 4,0	7,3 ± 3,6
7	Lebendig	52,3 ± 22,6	48,0 ± 12,9
	Frühapoptotisch	31,2 ± 21,8	30,0 ± 18,5
	Spätapoptotisch	11,3 ± 7,1	14,4 ± 6,1
	Nekrotisch	7,1 ± 4,4	7,5 ± 3,1

### 7.3 Abkürzungsverzeichnis

**Tabelle 8: Abkürzungsverzeichnis**

adMSC(rat)	Aus dem Fettgewebe isolierte mesenchymale Stammzellen der Ratte
CD	Cluster of Differentiation (Einteilung von Oberflächenproteinen)
CFDA	Carboxyfluorescein-Diacetat
CFU	Colony Forming Unit
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole – Kernfärbung
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> - Kulturmedium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	Doppelstrang Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzym-linked Immunosorbent Assay
Eng	Endoglin (CD 105)
ESC	Embryonale Stammzelle
FACS	Flourescence activated cell sorting - Durchflusszytometrie
FBS	Fetales Rinderserum
FC	Fat cells
FITC	Fluorescein isothiocyanate – Oberflächenmarker
FSS-Zellen	Flatended spindel shaped cells
HC	Hypoxisch kultivierte Zellen
HIF	Hypoxie-induzierender Faktor
hMSC	Humane mesenchymale Stammzelle
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
ITGB1	Integrin, beta 1 (CD 29)
Mac1	Mac1 (CD 11b)
MSC	Mesenchymale Stammzelle
MSC(rat)	Mesenchymale Stammzelle der Ratte
NC	Normoxisch kultivierte Zellen
NT5E	5'-nucleotidase,ecto (CD 73)
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PDT	Populationsverdopplungszeit
PE	Phycoerythrin – Oberflächenmarker

## Anhang

PI	Propidium Iodid
PP	Polypropylen
PS	Phosphatidylserin
PTPRC	Protein tyrosine phosphatase, receptor Type C (CD 45)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RS-Zellen	Rapidly selfrenewing cells
SS-Zellen	Spindle shaped cells
TE	Tissue Engineering
THY1	Thy-1 cell surface antigen (CD 90)
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VHL	von Hippel Lindau Protein
WST	Water soluble tetrazolium

## 7.4 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: GRUNDPRINZIP DES TISSUE ENGINEERING .....	5
ABBILDUNG 2: MESENCHYMALE STAMMZELLEN.....	7
ABBILDUNG 3: ISOLIERUNG MESENCHYMALER STAMMZELLEN AUS EINER RATTE.....	14
ABBILDUNG 4: ANOXIEGEFÄß.....	28
ABBILDUNG 5: ZELLEXTRAKTION VON ADMSC(RAT). .....	32
ABBILDUNG 6: MIKROSKOPISCHE DARSTELLUNG DER ADIPOGENEN DIFFERENZIERUNG. ....	33
ABBILDUNG 7: QUANTIFIZIERUNG DER ADIPOGENEN DIFFERENZIERUNG.....	34
ABBILDUNG 8: MAKROSKOPISCHE DARSTELLUNG DER OSTEOGENEN DIFFERENZIERUNG. ..	35
ABBILDUNG 9: MIKROSKOPISCHE DARSTELLUNG DER OSTEOGENEN DIFFERENZIERUNG. ...	36
ABBILDUNG 10: QUANTIFIZIERUNG DER OSTEOGENEN DIFFERENZIERUNG.....	37
ABBILDUNG 11: AUSWERTUNG OBERFLÄCHENMARKER.....	38
ABBILDUNG 12: KUMULATIVE POPULATIONSVERDOPPLUNG (PD). .....	40
ABBILDUNG 13: COLONY FORMING UNIT. ....	41
ABBILDUNG 14: PHASENKONTRASTAUFNAHMEN.....	43
ABBILDUNG 15: SUBPOPULATIONEN.....	46
ABBILDUNG 16: ZYTOSKELETTFÄRBUNG.....	48
ABBILDUNG 17: ZELLMETABOLISMUS.....	49
ABBILDUNG 18: SENESZENZ.....	51
ABBILDUNG 19: ÜBERLEBEN IN ANOXIE .....	52
ABBILDUNG 21: SAUERSTOFFVERHALTEN IM ANOXIEGEFÄß .....	75
ABBILDUNG 22: TEMPERATURVERHALTEN IM ANOXIEGEFÄß.....	75

## 7.5 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: OBERFLÄCHENMARKER .....	22
TABELLE 2: OBERFLÄCHENPROFIL .....	39
TABELLE 3: ZELLEXTRAKTION VON ADMSC(RAT). .....	76
TABELLE 4: SUBPOPULATIONEN.....	76
TABELLE 5: ZELLMETABOLISMUS.....	77
TABELLE 6: SENESZENZ.....	77
TABELLE 7: ÜBERLEBEN IN ANOXIE .....	78
TABELLE 8: ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	79
TABELLE 9: VERWENDETES LABOREQUIPMENT. ....	83
TABELLE 10: VERWENDETES VERBRAUCHSEQUIPMENT.....	84
TABELLE 11: VERWENDETE CHEMIKALIEN. ....	85

## 7.6 Materialien

**Tabelle 9: Verwendetes Laborequipment.**

Autoklav Varioklav 300	<i>H+P Labortechnik, Oberschleißheim, Deutschland</i>
Brutschrank (hypoxisch) MCO-5M	<i>Sanyo, München, Deutschland</i>
Brutschrank (normoxisch) Hera cell 240	<i>Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland</i>
Digital Kamera, IXUS 980 is	<i>Canon, Krefeld, Deutschland</i>
ELISA Reader Multiskan FC	<i>Thermo Scientific, Schwerte</i>
FACS Calibur	<i>Becton Dickinson, Franklin Lake, USA</i>
Fluorometer Safire <sup>2</sup>	<i>Tecan, Männedorf, Schweiz</i>
Glaspipetten	<i>Brand, Wertheim, Deutschland</i>
Kühlschrank (4° C) 561284	<i>Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland</i>
Kühlschrank (-80° C) 6485	<i>GFL, Burgwedel, Deutschland</i>
Magnetrührer	<i>Molecular Devices, Sunnyvale, USA</i>
Mikroskop Axiovert S100	<i>Carl-Zeiss, Jena, Deutschland</i>
Mikroskop Axiovert, 40 CFL	<i>Carl-Zeiss, Jena, Deutschland</i>
Mikroskop Kamera Axioacam ICc3	<i>Carl Zeiss, Jena, Deutschland</i>
Mikroskop Kamera Axioacam MRm	<i>Carl Zeiss, Jena, Deutschland</i>
Mikroskop Objektiv (10x, 20x, 60x A Plan)	<i>Carl-Zeiss, Jena, Deutschland</i>
pH-Messgerät pH 525	<i>WTW, Weilheim, Deutschland</i>
Pinzette	<i>Fehling, Wickede, Deutschland</i>
Pipetten (10, 20, 100, 200, 1000 µl)	<i>Gilson, Middleton, USA</i>
Pipettierhilfe Pipettus akku	<i>Hirschmann, Eberstadt, Deutschland</i>
Schere	<i>Fehling, Wickede, Deutschland</i>
Skalpell	<i>Feather, Osaka, Japan</i>
Sterilbank	<i>Heraeus, Hanau, Deutschland</i>
Thermomixer Komfort	<i>Eppendorf, Hamburg, Deutschland</i>
Tischzentrifuge 5415 D	<i>Eppendorf, Hamburg, Deutschland</i>
Vakuumsauger VDE 0530	<i>Neuberger, Freiburg, Deutschland</i>
Waage 770-12	<i>Kern, Balingen, Deutschland</i>
Wasserbad 1012	<i>GFL, Burgwedel, Deutschland</i>
Zell Zähler Cedex XS	<i>Roche Innovatis, Bielefeld, Deutschland</i>
Zentrifuge Universal 16 R	<i>Hettich, Tuttlingen, Deutschland</i>

Tabelle 10: Verwendetes Verbrauchsequipment.

Deckgläser (20 x 20 mm)	<i>Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland</i>
Einmal Handschuhe Peha-Soft satin	<i>Hartmann, Heidenheim, Deutschland</i>
Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5, 2 ml)	<i>Eppendorf, Hamburg, Deutschland</i>
FACS-Röhrchen	<i>Becton Dickinson, Franklin Lake, USA</i> <i>DAKO Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland</i>
Fettstift DAKO-Pen	<i>Whatman, Springfield Mill, England</i>
Filterpapier (125mm)	<i>Becton Dickinson, Franklin Lake, USA</i>
Injektionsnadel	<i>Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland</i>
PP Röhrchen (15, 50 ml)	<i>Nalgene, Rochester, USA</i>
Kryogefäße (1,8 ml)	<i>Nunc, Wiesbaden, Deutschland</i>
Kulturflaschen (25, 75, 225 cm <sup>2</sup> )	<i>Nunc, Wiesbaden, Deutschland</i>
Kulturschalen (6-, 12-, 24-, 96-Well)	<i>Nunc, Wiesbaden, Deutschland</i>
Kulturschalen für Objektträger	<i>Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland</i>
Objektträger	<i>Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA</i>
Petrischalen	<i>Eppendorf, Hamburg, Deutschland</i>
Pipettenaufsätze (10, 20, 100, 200, 1000 µl)	<i>Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland</i>
Pipettenaufsätze (2, 5, 10, 25, 50 ml)	<i>Becton Dickinson, Franklin Lake, USA</i>
Spritze (5, 10 ml)	<i>Linde, München, Deutschland</i>
Stickstoff 50 Liter Flasche	<i>Roth, Karlsruhe, Deutschland</i>
Wägeschälchen	<i>Roche Innovatis, Bielefeld, Deutschland</i>
Zählkammern Cedex XS smart slide	<i>Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland</i>
Zellkratzer	

Tabelle 11: Verwendete Chemikalien.

3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX)	<i>Sigma-Aldrich, St.Louis, USA</i>
AdipoRed Assay Reagent	<i>Lonza, Basel, Schweiz</i>
Alizarin Red S A5533-25G	<i>Sigma-Aldrich, St. Louis, USA</i>
Ammonium-Hydroxid	
Ascorbinsäure	<i>Sigma-Aldrich, St.Louis, USA</i>
Beta-Glo™ Assay	<i>Promega, Madison, USA</i>
Beta-Glycerophosphat	<i>Sigma-Aldrich, St.Louis, USA</i>
Calcitriol	<i>Sigma-Aldrich, St.Louis, USA</i>
Carboxyfluorescein-Diacetat (CFDA)	<i>Sigma-Aldrich, St.Louis, USA</i>
Collagenase	
Crystal Violet	<i>Sigma-Aldrich, St.Louis, USA</i>
DAPI	
Dexamethason	<i>Sigma-Aldrich, St.Louis, USA</i>
Dimethylsulfoxid (DMSO)	<i>Merck, Darmstadt, Deutschland</i>
Ethanol	<i>Merck, Darmstadt, Deutschland</i>
FBS	<i>Sigma-Aldrich, St.Louis, USA</i>
Image-iT FX signal enhancer	<i>Invitrogen, Darmstadt, Deutschland</i>
Indomethacin	<i>Sigma-Aldrich, St.Louis, USA</i>
Insulin	<i>Sigma-Aldrich, St.Louis, USA</i>
Isopropanol	
Kulturmedium DMEM	<i>PAA Laboratories GmbH Pasching, Österreich</i>
Lösungsmittel Aqua ad iniectabilia	<i>Braun, Kronberg, Deutschland</i>
Moviol-Kleber	
Oil-Red-O Farbstoff O-0625	<i>Sigma-Aldrich, St. Louis, USA</i>
Osteogenic Quantification Kit	<i>Millipore, Schwalbach, Deutschland</i>
Paraformaldehyd (4%ig)	<i>MicroCos GmbH, Garching, Deutschland</i>
Patricin	
PBS	<i>PAA Laboratories GmbH Pasching, Österreich</i>
Penicillin-Streptomycin Lösung	<i>PAA Laboratories GmbH Pasching, Österreich</i>
Phalloidin-Alexa®546	<i>Invitrogen, Darmstadt, Deutschland</i>
Triton-X-100 2%ig	
Trypsin-EDTA-Lösung (10x)	<i>PAA Laboratories GmbH Pasching, Österreich</i>
WST-1 Reagenz	<i>Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland</i>

## 7.7 Versuchsprotokolle

### 7.7.1 Zellgewinnung von adMSC(rat)

- 1) Herstellung von Collagenase:  
0,01 g Collagenase → 10 ml PBS
- 2) Operative Fettgewebsresektion aus Achsel, Leiste und dem Fettgewebe um den Samenstrang  
Vorher: Desinfektion mit Ethanol
- 3) Zerkleinerung des Resektats mittels kleiner Schere anschließend Wiegen
- 4) Überführen in ein 50 ml Falcon
- 5) Vermischung mit Collagenase (30 ml Collagenase für 3 g Fett)  
→ 40 Minuten bei 37 °C im Wasserbad
- 6) Zellsuspension in 10 ml Spritze aufziehen und mittels 100 µm Netz in neues Falcon abfiltrieren
- 7) Zellsuspension mit gleicher Menge Kulturmedium auffüllen
- 8) 5 Minuten bei 1000 g zentrifugieren
- 9) Überführen in T-75
- 10) Zugabe von 100 µl Patricin und Medium

### 7.7.2 Zellkultur

#### 7.7.2.1 **Passagewechsel**

- 1) Medium absaugen
- 2) Zellrasen mit PBS waschen
- 3) PBS absaugen
- 4) Trypsinieren mit 5-facher Konzentration
- 5) 5 Minuten inkubieren (37 °C)
- 6) Zur Kontrolle Zellen unter dem Mikroskop betrachten
- 7) Trypsin mit doppelter Menge Medium stoppen
- 8) Kultur Inhalt in Falcons überführen
- 9) Nach dem Zählen den berechneten Falconinhalt in neue Kulturflaschen überführen
- 10) Kulturflaschen mit Medium auffüllen

### **7.7.2.2 Zellzählung mit „Cedex Cell Counter“**

- 1) Ein Tropfen der Suspension mit den abgelösten Zellen in einen Eppendorf überführen
- 2) 10 µl mittels Pipette auf eine spezielle vom Hersteller vorgegebene Zählkammer (Cedex Smar Slide®) auftragen
- 3) Zählkammer in das Gerät schieben
- 4) Mittels Cedex Software Zellen zählen  
→Einstellungen: Standard size, 1 Image

### **7.7.2.3 Kryokonservierung**

- 1) Falcons mit Zell, Medium und Trypsin Inhalt für 5 Minuten bei 500 g zentrifugieren
- 2) Überstand absaugen
- 3) Zellpellet in Kryomedium lösen
- 4) 1 ml Suspension in ein Kryogefäß überführen
- 5) Kryogefäß sofort nach Füllung in Trockeneis lagern
- 6) Bei -80 °C einfrieren

## **7.7.3 Differenzierung**

### **7.7.3.1 Herstellung der Oil-Red-O Farbstofflösung (adipogene Differenzierung)**

- 1) 150 mg Oil-Red-O (#O-0625 Sigma: 25 g) in 50 ml Isopropanol lösen
- 2) Lösung 10 Minuten, mittels Magnetrührer umrühren  
(0,3%ige Lagerlösung ist einen Monat haltbar)
- 3) Lagerlösung im Verhältnis 3:2 mit destilliertem Wasser vermischen  
(0,2%ige Arbeitslösung ist 3 Stunden haltbar)
- 4) Arbeitslösung abfiltrieren (125 mm Filterpapier)

### **7.7.3.2 Herstellung der Alizarin Red S Farbstofflösung (osteogene Differenzierung)**

- 1) 0.34226 g Alizarin Red S (Sigma MW:342.26) in 20 ml destilliertem Wasser lösen
- 2) Lösung mit Ammonium Hydroxid auf einen pH von 4,1 einstellen
- 3) Lösung mit destilliertem Wasser auf 25 ml auffüllen
- 4) Farbstofflösung abfiltrieren (125 mm Filterpapier)

### 7.7.3.3 Färbung der adipogenen und osteogenen Differenzierung

- 1) Zellmedium absaugen
- 2) 6-Wells 2 x mit PBS waschen
- 3) Jedes Well mit 1 ml 4%igem Formaldehyd bedecken
- 4) 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren lassen
- 5) 6-Wells 3 x mit destilliertem Wasser spülen
- 6) Jedes Well mit 1 ml der Färbelösung bedecken
- 7) 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren lassen
- 8) Mit destilliertem Wasser waschen bis möglichst wenig Farbstoff übrig ist

### 7.7.3.4 Quantifizierung der adipogenen Differenzierung

- 1) Wells mit 2 ml PBS waschen
- 2) Wells mit 5 ml PBS (**mit Kalzium und Magnesium**) bedecken
- 3) 140 µl AdipoRed Assay Reagenz hinzufügen
- 4) Mittels, auf und ab pipetieren, die Flüssigkeiten vermischen
- 5) 10 Minuten Inkubation bei RT
- 6) Messung am Fluorimeter bei 485 nm Excitation und 572 nm Emission

### 7.7.3.5 Quantifizierung der osteogenen Differenzierung

Herstellung der Standard-Kurve:

- 1) 200 µl 10 x ARS Dilution Buffer mit 1,8 ml dest. Wasser verdünnen
- 2) Für 2 mM 20 µl Alizarin Red in 380 µl 1 x ARS Dilution Buffer lösen
- 3) Für die halbe Konzentration jeweils 200 µl der vorherigen Lösung in 200 µl 1 x ARS Dilution Buffer lösen

2 mM	1 mM	500 µM	250 µM	125 µM	62,5 µM	31,3 µM	Blank
------	------	--------	--------	--------	---------	---------	-------

- 1) In jedes Well 1,2 ml Essigsäure hinzufügen
- 2) 30 Minuten inkubieren und schütteln
- 3) Mittels Cell scraper den Zellrasen lösen
- 4) Zellreste, sowie Essigsäure in ein 2ml Eppendorf Gefäß überführen
- 5) 30 Sekunden vortexen
- 6) Gefäße 10 Minuten lang auf 85 °C aufheizen
- 7) Gefäße 5 Minuten lang auf Eis legen
- 8) Gefäße zentrifugieren (13.000 g / 15 Minuten)

- 9) 400 µl des Überstandes mit 150 ml 10%igem Ammoniumhydroxid vermischen
- 10) 150 µl des Gemisches auf ein 96-Well (transparenter Boden) transferieren
- 11) Bei einer optischen Dichte von 405 mittels ELISA-Reader messen

#### 7.7.4 Oberflächenmarker

##### 7.7.4.1 Färbung der Oberflächenproteine

- 1) Zellen trypsinieren und in 10 ml Falcons sammeln
- 2) Zellen zentrifugieren (500 g, 5 Minuten)
- 3) Den Überstand absaugen
- 4) Zellen in 800 µl PBS resuspendieren
- 5) Je 200 µl in ein FACS-Röhrchen übertragen und auf Eis legen
- 6) 20 µl der Farbstoffe bzw. Iso-Kontrollen mit der anderen zu einer 40 µl Stocklösung vermischen

Kontrolle 1	Färbung 1	Kontrolle 2	Färbung 2
FITC Mouse IgG1	FITC CD90	FITC Mouse IgG2a	FITC CD11b/c
PE Hamster IgG	PE CD 29	PE Mouse IgG1	PE CD 45

- 1) 5 µl der Stocklösung in je eins der 4 FACS-Röhrchen zugeben
- 2) 20 Minuten im Kühlschrank inkubieren
- 3) Zellen zentrifugieren (500 g, 5 Minuten)
- 4) In PBS resuspendieren
- 5) Zellen zentrifugieren (500 g, 5 Minuten)
- 6) In PBS resuspendieren

##### 7.7.5 Colony Forming Unit Färbung

- 1) 250 mg von 0,5% Crystal Violett (SIGMA, Steinheim) in 50 ml Ethanol lösen
- 2) Zellrasen 2 x mit PBS waschen
- 3) 3 ml der Crystal Violett Färbelösung in die Petrischale überführen
- 4) 10 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubieren
- 5) Färbelösung entfernen und erneut 2 x mit PBS abwaschen
- 6) Bei Raumtemperatur trocknen lassen

### 7.7.6 Morphologie Färbung

- 1) Medium absaugen
- 2) Mit PBS (**mit Kalzium und Magnesium**) waschen
- 3) PBS absaugen
- 4) Licht ausschalten
- 5) Farbstoff in T-75 pipettieren
- 6) 15 Minuten in den Inkubationsschrank (CAVE: Normoxischen Inkubationsschrank; auch für Hypoxie Zellen)
- 7) Farbstoff (CFDA) absaugen
- 8) 3 x mit PBS waschen
- 9) 5 ml PBS in T-75 belassen

### 7.7.7 Zytoskelettfärbung

- 1) Medium absaugen
- 2) Objektträger mit PBS (**mit Kalzium und Magnesium**) waschen
- 3) Mit 4%igem PFormaldehyd fixieren
- 4) 10 Minuten Inkubation bei RT
- 5) 3 x mit PBS waschen
- 6) Zellen mit 0,2%igem Triton X-100 permeabilisieren
- 7) 20 Minuten Inkubation bei RT
- 8) 1 x mit PBS waschen
- 9) Mittels Dako-Pen zwei Felder zeichnen
- 10) Zellen mittels 3%igem BSA blocken
- 11) 1 Stunde Inkubation bei RT
- 12) Währenddessen Paxillin abzentrifugieren und 1 : 70 mit BSA vermischen
- 13) 150 µl Paxillin auf eine Feld auftragen
- 14) BSA auf das andere Feld auftragen

### 7.7.8 Apoptosefärbung

- 1) Zellen trypsinieren
- 2) 10 Minuten bei 1500 U / min zentrifugieren
- 3) Zellen in 200 µl Binding Buffer (1 : 10 Mischung mit destilliertem Wasser) resuspendieren
- 4) Zentrifugieren

## Anhang

- 5) Zellen in 200  $\mu$ l Binding Buffer resuspendieren
- 6) 5  $\mu$ l Annexin V-APC Apoptosis Detection Kit hinzufügen
- 7) 15 Minuten bei RT inkubieren lassen
- 8) Zentrifugieren
- 9) Zellen in 200  $\mu$ l Binding Buffer resuspendieren
- 10) 5  $\mu$ l Propidium Iodide Färbelösung hinzufügen
- 11) Suspension mit 1ml Kryomedium vermischen und auf Trockeneis legen.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Drenckhahn, D., et al., *Zellen- und Gewebelehre, Entwicklungslehre, Skelett- und Muskelsystem, Atemsystem, Verdauungssystem, Harn- und Genitalsystem*. 16., völlig neu bearb. Aufl. ed. Anatomie. 2003, München [u.a.]: Urban & Fischer. XI, 956 S.
2. Einhorn, T.A., *The cell and molecular biology of fracture healing*. Clin Orthop Relat Res, 1998(355 Suppl): p. S7-21.
3. Berchtold, R., H.-P. Bruch, and R. Keller, *Chirurgie : 335 Tabellen und 343 Praxisfragen ; [nach neuer AO ; plus DVD]*. 6., aktualisierte Aufl. ed. 2008, München [u.a.]: Elsevier. Online Ressource.
4. DeCoster, T.A., et al., *Management of posttraumatic segmental bone defects*. J Am Acad Orthop Surg, 2004. **12**(1): p. 28-38.
5. Attias, N., et al., *Surgical management of a long segmental defect of the humerus using a cylindrical titanium mesh cage and plates: a case report*. J Orthop Trauma, 2005. **19**(3): p. 211-6.
6. Schieker, M. and W. Mutschler, *[Bridging posttraumatic bony defects. Established and new methods]*. Unfallchirurg, 2006. **109**(9): p. 715-32.
7. Kneser, U., et al., *Engineering of vascularized transplantable bone tissues: induction of axial vascularization in an osteoconductive matrix using an arteriovenous loop*. Tissue Eng, 2006. **12**(7): p. 1721-31.
8. Cancedda, R., et al., *Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone*. Matrix Biol, 2003. **22**(1): p. 81-91.
9. Kneser, U., et al., *Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view*. J Cell Mol Med, 2006. **10**(1): p. 7-19.
10. Arrington, E.D., et al., *Complications of iliac crest bone graft harvesting*. Clin Orthop Relat Res, 1996(329): p. 300-9.
11. Banwart, J.C., M.A. Asher, and R.S. Hassanein, *Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity. A statistical evaluation*. Spine (Phila Pa 1976), 1995. **20**(9): p. 1055-60.
12. Ebraheim, N.A., H. Elgafy, and R. Xu, *Bone-graft harvesting from iliac and fibular donor sites: techniques and complications*. J Am Acad Orthop Surg, 2001. **9**(3): p. 210-8.
13. De Long, W.G., Jr., et al., *Bone grafts and bone graft substitutes in orthopaedic trauma surgery. A critical analysis*. J Bone Joint Surg Am, 2007. **89**(3): p. 649-58.
14. Hing, K.A., *Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering?* Philos Transact A Math Phys Eng Sci, 2004. **362**(1825): p. 2821-50.
15. Schieker, M., C. Heiss, and W. Mutschler, *[Bone substitutes]*. Unfallchirurg, 2008. **111**(8): p. 613-9; quiz 620.
16. Grayson, W.L., et al., *Effects of hypoxia on human mesenchymal stem cell expansion and plasticity in 3D constructs*. J Cell Physiol, 2006. **207**(2): p. 331-9.
17. Mylotte, L.A., et al., *Metabolic flexibility permits mesenchymal stem cell survival in an ischemic environment*. Stem Cells, 2008. **26**(5): p. 1325-36.
18. Drosse, I., et al., *Tissue engineering for bone defect healing: an update on a multi-component approach*. Injury, 2008. **39** Suppl 2: p. S9-20.

19. Thanner, M. and E. Nagel, [A comprehensive assessment of ATMP. Difficulties and approaches]. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz, 2011. **54**(7): p. 843-8.
20. Ciapetti, G., D. Granchi, and N. Baldini, *The combined use of mesenchymal stromal cells and scaffolds for bone repair*. Curr Pharm Des, 2012. **18**(13): p. 1796-820.
21. Seo, S. and K. Na, *Mesenchymal stem cell-based tissue engineering for chondrogenesis*. J Biomed Biotechnol, 2011. **2011**: p. 806891.
22. Vacanti, C.A., *The history of tissue engineering*. J Cell Mol Med, 2006. **10**(3): p. 569-76.
23. Volkmer, E., et al., *Hypoxia in static and dynamic 3D culture systems for tissue engineering of bone*. Tissue Eng Part A, 2008. **14**(8): p. 1331-40.
24. Friedenstein, A.J., R.K. Chailakhyan, and U.V. Gerasimov, *Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers*. Cell Tissue Kinet, 1987. **20**(3): p. 263-72.
25. Friedenstein, A.J., et al., *Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues*. Transplantation, 1968. **6**(2): p. 230-47.
26. Friedenstein, A.J., S. Piatetzky, II, and K.V. Petrakova, *Osteogenesis in transplants of bone marrow cells*. J Embryol Exp Morphol, 1966. **16**(3): p. 381-90.
27. Barry, F.P. and J.M. Murphy, *Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(4): p. 568-84.
28. Caplan, A.I. and J.E. Dennis, *Mesenchymal stem cells as trophic mediators*. J Cell Biochem, 2006. **98**(5): p. 1076-84.
29. Pittenger, M.F., et al., *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. Science, 1999. **284**(5411): p. 143-7.
30. Das, R., et al., *The role of hypoxia in bone marrow-derived mesenchymal stem cells: considerations for regenerative medicine approaches*. Tissue Eng Part B Rev, 2010. **16**(2): p. 159-68.
31. Herzog, E.L., L. Chai, and D.S. Krause, *Plasticity of marrow-derived stem cells*. Blood, 2003. **102**(10): p. 3483-93.
32. Jung, Y., G. Bauer, and J.A. Nolte, *Concise review: Induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells: progress toward safe clinical products*. Stem Cells, 2012. **30**(1): p. 42-7.
33. Firth, A.L. and J.X. Yuan, *Identification of functional progenitor cells in the pulmonary vasculature*. Pulm Circ, 2012. **2**(1): p. 84-100.
34. Beltrami, A.P., et al., *Multipotent cells can be generated in vitro from several adult human organs (heart, liver, and bone marrow)*. Blood, 2007. **110**(9): p. 3438-46.
35. Schaffler, A. and C. Buchler, *Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies*. Stem Cells, 2007. **25**(4): p. 818-27.
36. Zuk, P.A., et al., *Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(12): p. 4279-95.
37. Lin, H.H., et al., *The osteoblastogenesis potential of adipose mesenchymal stem cells in myeloma patients who had received intensive therapy*. PLoS One, 2014. **9**(4): p. e94395.
38. Fraser, J., et al., *Differences in stem and progenitor cell yield in different subcutaneous adipose tissue depots*. Cytotherapy, 2007. **9**(5): p. 459-67.

39. Schofield, R., *The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell*. Blood Cells, 1978. **4**(1-2): p. 7-25.
40. Watt, F.M. and B.L. Hogan, *Out of Eden: stem cells and their niches*. Science, 2000. **287**(5457): p. 1427-30.
41. Vunjak-Novakovic, G. and D.T. Scadden, *Biomimetic platforms for human stem cell research*. Cell Stem Cell, 2011. **8**(3): p. 252-61.
42. Haasters, F., et al., *Morphological and immunocytochemical characteristics indicate the yield of early progenitors and represent a quality control for human mesenchymal stem cell culturing*. J Anat, 2009. **214**(5): p. 759-67.
43. Ke, Q. and M. Costa, *Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)*. Mol Pharmacol, 2006. **70**(5): p. 1469-80.
44. Semenza, G.L., *Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O<sub>2</sub> homeostasis*. Curr Opin Genet Dev, 1998. **8**(5): p. 588-94.
45. Wang, Y., et al., *The hypoxia-inducible factor alpha pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development*. J Clin Invest, 2007. **117**(6): p. 1616-26.
46. Saller, M.M., et al., *Increased stemness and migration of human mesenchymal stem cells in hypoxia is associated with altered integrin expression*. Biochem Biophys Res Commun, 2012. **423**(2): p. 379-85.
47. Vogel, S., et al., *Migration of mesenchymal stem cells towards glioblastoma cells depends on hepatocyte-growth factor and is enhanced by aminolaevulinic acid-mediated photodynamic treatment*. Biochem Biophys Res Commun, 2013.
48. Zhang, X., et al., *Model microgravity enhances endothelium differentiation of mesenchymal stem cells*. Naturwissenschaften, 2012.
49. Ma, T., et al., *Hypoxia and stem cell-based engineering of mesenchymal tissues*. Biotechnol Prog, 2009. **25**(1): p. 32-42.
50. Lord, B.I. and M.J. Murphy, Jr., *Hematopoietic stem cell regulation. II. Chronic effects of hypoxic-hypoxia on CFU kinetics*. Blood, 1973. **42**(1): p. 89-98.
51. Murphy, M.J., Jr. and B.I. Lord, *Hematopoietic stem cell regulation. I. Acute effects of hypoxic-hypoxia on CFU kinetics*. Blood, 1973. **42**(1): p. 81-7.
52. Csete, M., *Oxygen in the cultivation of stem cells*. Ann N Y Acad Sci, 2005. **1049**: p. 1-8.
53. Weijers, E.M., et al., *The influence of hypoxia and fibrinogen variants on the expansion and differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells*. Tissue Eng Part A, 2011. **17**(21-22): p. 2675-85.
54. Gneccchi, M., et al., *Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement*. FASEB J, 2006. **20**(6): p. 661-9.
55. Potier, E., et al., *Hypoxia affects mesenchymal stromal cell osteogenic differentiation and angiogenic factor expression*. Bone, 2007. **40**(4): p. 1078-87.
56. Sadat, S., et al., *The cardioprotective effect of mesenchymal stem cells is mediated by IGF-I and VEGF*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **363**(3): p. 674-9.
57. Keith, B. and M.C. Simon, *Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer*. Cell, 2007. **129**(3): p. 465-72.
58. Percy, M.J., et al., *A gain-of-function mutation in the HIF2A gene in familial erythrocytosis*. N Engl J Med, 2008. **358**(2): p. 162-8.
59. Cipolleschi, M.G., P. Dello Sbarba, and M. Olivotto, *The role of hypoxia in the maintenance of hematopoietic stem cells*. Blood, 1993. **82**(7): p. 2031-7.

60. Kofoed, H., et al., *Bone marrow circulation after osteotomy. Blood flow, pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub>, and pressure studied in dogs.* Acta Orthop Scand, 1985. **56**(5): p. 400-3.
61. Matsumoto, A., et al., *Absolute oxygen tension (pO<sub>2</sub>) in murine fatty and muscle tissue as determined by EPR.* Magn Reson Med, 2005. **54**(6): p. 1530-5.
62. Suda, T., F. Arai, and A. Hirao, *Hematopoietic stem cells and their niche.* Trends Immunol, 2005. **26**(8): p. 426-33.
63. Zhang, J., et al., *Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size.* Nature, 2003. **425**(6960): p. 836-41.
64. Jager, M., et al., *Bone healing and migration of cord blood-derived stem cells into a critical size femoral defect after xenotransplantation.* J Bone Miner Res, 2007. **22**(8): p. 1224-33.
65. Seitz, S., et al., *Influence of in vitro cultivation on the integration of cell-matrix constructs after subcutaneous implantation.* Tissue Eng, 2007. **13**(5): p. 1059-67.
66. Arkudas, A., et al., *Axial prevascularization of porous matrices using an arteriovenous loop promotes survival and differentiation of transplanted autologous osteoblasts.* Tissue Eng, 2007. **13**(7): p. 1549-60.
67. Polzer, H., et al., *Comparison of different strategies for in vivo seeding of prevascularized scaffolds.* Tissue Eng Part C Methods, 2014. **20**(1): p. 11-8.
68. Drosse, I., et al., *Validation of a femoral critical size defect model for orthotopic evaluation of bone healing: a biomechanical, veterinary and trauma surgical perspective.* Tissue Eng Part C Methods, 2008. **14**(1): p. 79-88.
69. Schieker, M., et al., *[Tissue engineering of bone. Integration and migration of human mesenchymal stem cells in colonized constructs in a murine model].* Orthopade, 2004. **33**(12): p. 1354-60.
70. Zhang, X., et al., *Periosteal progenitor cell fate in segmental cortical bone graft transplantations: implications for functional tissue engineering.* J Bone Miner Res, 2005. **20**(12): p. 2124-37.
71. Betz, O.B., et al., *Direct percutaneous gene delivery to enhance healing of segmental bone defects.* J Bone Joint Surg Am, 2006. **88**(2): p. 355-65.
72. Axelson, H., et al., *Hypoxia-induced dedifferentiation of tumor cells--a mechanism behind heterogeneity and aggressiveness of solid tumors.* Semin Cell Dev Biol, 2005. **16**(4-5): p. 554-63.
73. Genbacev, O., et al., *Regulation of human placental development by oxygen tension.* Science, 1997. **277**(5332): p. 1669-72.
74. Studer, L., et al., *Enhanced proliferation, survival, and dopaminergic differentiation of CNS precursors in lowered oxygen.* J Neurosci, 2000. **20**(19): p. 7377-83.
75. Malda, J., T.J. Klein, and Z. Upton, *The roles of hypoxia in the in vitro engineering of tissues.* Tissue Eng, 2007. **13**(9): p. 2153-62.
76. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement.* Cytotherapy, 2006. **8**(4): p. 315-7.
77. Kern, S., et al., *Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue.* Stem Cells, 2006. **24**(5): p. 1294-301.
78. Kocaoemer, A., et al., *Human AB serum and thrombin-activated platelet-rich plasma are suitable alternatives to fetal calf serum for the expansion of*

- mesenchymal stem cells from adipose tissue*. Stem Cells, 2007. **25**(5): p. 1270-8.
79. Cristofalo, V.J., et al., *Relationship between donor age and the replicative lifespan of human cells in culture: a reevaluation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(18): p. 10614-9.
  80. Battula, V.L., et al., *Human placenta and bone marrow derived MSC cultured in serum-free, b-FGF-containing medium express cell surface frizzled-9 and SSEA-4 and give rise to multilineage differentiation*. Differentiation, 2007. **75**(4): p. 279-91.
  81. Collins, T.J., *ImageJ for microscopy*. Biotechniques, 2007. **43**(1 Suppl): p. 25-30.
  82. Dimri, G.P., et al., *A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(20): p. 9363-7.
  83. Choi, J.H. and D. Kim, *Effects of age and dietary restriction on lifespan and oxidative stress of SAMP8 mice with learning and memory impairments*. J Nutr Health Aging, 2000. **4**(3): p. 182-6.
  84. Kim, H., et al., *Expression profiles of p53-, p16(INK4a)-, and telomere-regulating genes in replicative senescent primary human, mouse, and chicken fibroblast cells*. Exp Cell Res, 2002. **272**(2): p. 199-208.
  85. Mishima, K., et al., *Senescence-associated beta-galactosidase histochemistry for the primate eye*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999. **40**(7): p. 1590-3.
  86. van Engeland, M., et al., *Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure*. Cytometry, 1998. **31**(1): p. 1-9.
  87. Ozdemir, D., et al., *Effects of administration of subtoxic doses of acetaminophen on liver and blood levels of insulin-like growth factor-1 in rats*. Toxicol Ind Health, 2013.
  88. Buie, L.K., et al., *Development of a model of elevated intraocular pressure in rats by gene transfer of Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP2)*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013.
  89. Zajusz, K. and M. Zacharewicz, *[Experimental studies with strongly active antirheumatic agents. Effect of the chief component of Ambene double ampules on the blood picture and bone marrow of Wistar rats]*. Med Welt, 1972. **23**(43): p. 1559-61.
  90. King, E.R. and M.P. Smyser, *Ratio of bone weight to live body weight of the Wistar rat*. Tex Rep Biol Med, 1951. **9**(2): p. 319-21.
  91. Liao, H.T. and C.T. Chen, *Osteogenic potential: Comparison between bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells*. World J Stem Cells, 2014. **6**(3): p. 288-95.
  92. Tsuji, W., J.P. Rubin, and K.G. Marra, *Adipose-derived stem cells: Implications in tissue regeneration*. World J Stem Cells, 2014. **6**(3): p. 312-21.
  93. Betz, O.B., et al., *The repair of critical-sized bone defects using expedited, autologous BMP-2 gene-activated fat implants*. Tissue Eng Part A, 2010. **16**(3): p. 1093-101.
  94. Zhou, N., et al., *HIF-1alpha as a Regulator of BMP2-Induced Chondrogenic Differentiation, Osteogenic Differentiation, and Endochondral Ossification in Stem Cells*. Cell Physiol Biochem, 2015. **36**(1): p. 44-60.
  95. Nagaya, N., et al., *Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy*. Circulation, 2005. **112**(8): p. 1128-35.

96. Yue, W.M., et al., *Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, reduce neointimal formation, and enhance endothelial function in a rat vein grafting model*. Stem Cells Dev, 2008. **17**(4): p. 785-93.
97. Neuhuber, B., et al., *Effects of plating density and culture time on bone marrow stromal cell characteristics*. Exp Hematol, 2008. **36**(9): p. 1176-85.
98. Nagaya, N., et al., *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, 2004. **287**(6): p. H2670-6.
99. Barzilay, R., et al., *Comparative characterization of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells from four different rat strains*. Cytotherapy, 2009. **11**(4): p. 435-42.
100. Harting, M., et al., *Immunophenotype characterization of rat mesenchymal stromal cells*. Cytotherapy, 2008. **10**(3): p. 243-53.
101. Tokalov, S.V., et al., *A number of bone marrow mesenchymal stem cells but neither phenotype nor differentiation capacities changes with age of rats*. Mol Cells, 2007. **24**(2): p. 255-60.
102. Yoshimura, H., et al., *Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle*. Cell Tissue Res, 2007. **327**(3): p. 449-62.
103. Carriere, A., et al., *Mitochondrial reactive oxygen species control the transcription factor CHOP-10/GADD153 and adipocyte differentiation: a mechanism for hypoxia-dependent effect*. J Biol Chem, 2004. **279**(39): p. 40462-9.
104. Yun, Z., et al., *Inhibition of PPAR gamma 2 gene expression by the HIF-1-regulated gene DEC1/Stra13: a mechanism for regulation of adipogenesis by hypoxia*. Dev Cell, 2002. **2**(3): p. 331-41.
105. Zhou, S., et al., *Hypoxia inhibition of adipocytogenesis in human bone marrow stromal cells requires transforming growth factor-beta/Smad3 signaling*. J Biol Chem, 2005. **280**(24): p. 22688-96.
106. Lin, Q., Y.J. Lee, and Z. Yun, *Differentiation arrest by hypoxia*. J Biol Chem, 2006. **281**(41): p. 30678-83.
107. Irwin, R., et al., *Prolyl-hydroxylase inhibition and HIF activation in osteoblasts promotes an adipocytic phenotype*. J Cell Biochem, 2007. **100**(3): p. 762-72.
108. Fink, T., et al., *Induction of adipocyte-like phenotype in human mesenchymal stem cells by hypoxia*. Stem Cells, 2004. **22**(7): p. 1346-55.
109. Valorani, M.G., et al., *Hypoxia increases Sca-1/CD44 co-expression in murine mesenchymal stem cells and enhances their adipogenic differentiation potential*. Cell Tissue Res, 2010. **341**(1): p. 111-20.
110. Ren, H., et al., *Proliferation and differentiation of bone marrow stromal cells under hypoxic conditions*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **347**(1): p. 12-21.
111. Volkmer, E., et al., *Hypoxic preconditioning of human mesenchymal stem cells overcomes hypoxia-induced inhibition of osteogenic differentiation*. Tissue Eng Part A, 2010. **16**(1): p. 153-64.
112. He, J., et al., *Oxygen tension differentially influences osteogenic differentiation of human adipose stem cells in 2D and 3D cultures*. J Cell Biochem, 2010. **110**(1): p. 87-96.
113. Malladi, P., et al., *Effect of reduced oxygen tension on chondrogenesis and osteogenesis in adipose-derived mesenchymal cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2006. **290**(4): p. C1139-46.

114. Raheja, L.F., D.C. Genetos, and C.E. Yellowley, *The effect of oxygen tension on the long-term osteogenic differentiation and MMP/TIMP expression of human mesenchymal stem cells*. Cells Tissues Organs, 2010. **191**(3): p. 175-84.
115. Salim, A., et al., *Transient changes in oxygen tension inhibit osteogenic differentiation and Runx2 expression in osteoblasts*. J Biol Chem, 2004. **279**(38): p. 40007-16.
116. Tamama, K., et al., *Differential roles of hypoxia inducible factor subunits in multipotential stromal cells under hypoxic condition*. J Cell Biochem, 2011. **112**(3): p. 804-17.
117. D'Ippolito, G., et al., *Low oxygen tension inhibits osteogenic differentiation and enhances stemness of human MIAMI cells*. Bone, 2006. **39**(3): p. 513-22.
118. Holzwarth, C., et al., *Low physiologic oxygen tensions reduce proliferation and differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells*. BMC Cell Biol, 2010. **11**: p. 11.
119. Merceron, C., et al., *Differential effects of hypoxia on osteochondrogenic potential of human adipose-derived stem cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2010. **298**(2): p. C355-64.
120. Fehrer, C., et al., *Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan*. Aging Cell, 2007. **6**(6): p. 745-57.
121. Javazon, E.H., et al., *Rat marrow stromal cells are more sensitive to plating density and expand more rapidly from single-cell-derived colonies than human marrow stromal cells*. Stem Cells, 2001. **19**(3): p. 219-25.
122. Yamamoto, Y., et al., *Low oxygen tension enhances proliferation and maintains stemness of adipose tissue-derived stromal cells*. Biores Open Access, 2013. **2**(3): p. 199-205.
123. Nekanti, U., et al., *Increased proliferation and analysis of differential gene expression in human Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells under hypoxia*. Int J Biol Sci, 2010. **6**(5): p. 499-512.
124. Grayson, W.L., et al., *Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **358**(3): p. 948-53.
125. Haque, N., et al., *Hypoxic Culture Conditions as a Solution for Mesenchymal Stem Cell Based Regenerative Therapy*. ScientificWorldJournal, 2013. **2013**: p. 632972.
126. Sahlgren, C., et al., *Notch signaling mediates hypoxia-induced tumor cell migration and invasion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(17): p. 6392-7.
127. Sainson, R.C. and A.L. Harris, *Hypoxia-regulated differentiation: let's step it up a Notch*. Trends Mol Med, 2006. **12**(4): p. 141-3.
128. Gustafsson, M.V., et al., *Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state*. Dev Cell, 2005. **9**(5): p. 617-28.
129. Lohmann, M., et al., *Donor age of human platelet lysate affects proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e37839.
130. Dos Santos, F., et al., *Ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells: a more effective cell proliferation kinetics and metabolism under hypoxia*. J Cell Physiol, 2010. **223**(1): p. 27-35.
131. Colter, D.C., et al., *Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(7): p. 3213-8.

132. Colter, D.C., I. Sekiya, and D.J. Prockop, *Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(14): p. 7841-5.
133. Digirolamo, C.M., et al., *Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate*. Br J Haematol, 1999. **107**(2): p. 275-81.
134. Smith, J.R., et al., *Isolation of a highly clonogenic and multipotential subfraction of adult stem cells from bone marrow stroma*. Stem Cells, 2004. **22**(5): p. 823-31.
135. Sekiya, I., et al., *Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality*. Stem Cells, 2002. **20**(6): p. 530-41.
136. Prockop, D.J., I. Sekiya, and D.C. Colter, *Isolation and characterization of rapidly self-renewing stem cells from cultures of human marrow stromal cells*. Cytotherapy, 2001. **3**(5): p. 393-6.
137. Docheva, D., et al., *Researching into the cellular shape, volume and elasticity of mesenchymal stem cells, osteoblasts and osteosarcoma cells by atomic force microscopy*. J Cell Mol Med, 2008. **12**(2): p. 537-52.
138. McBeath, R., et al., *Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment*. Dev Cell, 2004. **6**(4): p. 483-95.
139. Nava, M.M., M.T. Raimondi, and R. Pietrabissa, *Controlling self-renewal and differentiation of stem cells via mechanical cues*. J Biomed Biotechnol, 2012. **2012**: p. 797410.
140. Sun, Y., C.S. Chen, and J. Fu, *Forcing stem cells to behave: a biophysical perspective of the cellular microenvironment*. Annu Rev Biophys, 2012. **41**: p. 519-42.
141. Engler, A.J., et al., *Matrix elasticity directs stem cell lineage specification*. Cell, 2006. **126**(4): p. 677-89.
142. Schwartz, M.A., *Integrins and extracellular matrix in mechanotransduction*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(12): p. a005066.
143. Schwartz, M.A. and D.W. DeSimone, *Cell adhesion receptors in mechanotransduction*. Curr Opin Cell Biol, 2008. **20**(5): p. 551-6.
144. Pollard, T.D., L. Blanchoin, and R.D. Mullins, *Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2000. **29**: p. 545-76.
145. Titushkin, I. and M. Cho, *Modulation of cellular mechanics during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells*. Biophys J, 2007. **93**(10): p. 3693-702.
146. Muller, P., et al., *Modulating the actin cytoskeleton affects mechanically induced signal transduction and differentiation in mesenchymal stem cells*. PLoS One, 2013. **8**(7): p. e71283.
147. Tsukita, S. and S. Yonemura, *Cortical actin organization: lessons from ERM (ezrin/radixin/moesin) proteins*. J Biol Chem, 1999. **274**(49): p. 34507-10.
148. Wang, N., et al., *Mechanical behavior in living cells consistent with the tensegrity model*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(14): p. 7765-70.
149. Hayflick, L. and P.S. Moorhead, *The serial cultivation of human diploid cell strains*. Exp Cell Res, 1961. **25**: p. 585-621.
150. Harley, C.B., et al., *The telomere hypothesis of cellular aging*. Exp Gerontol, 1992. **27**(4): p. 375-82.

151. Harley, C.B., A.B. Futcher, and C.W. Greider, *Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts*. Nature, 1990. **345**(6274): p. 458-60.
152. Ozturk, S., B. Sozen, and N. Demir, *Telomere length and telomerase activity during oocyte maturation and early embryo development in mammalian species*. Mol Hum Reprod, 2013.
153. Bochkov, N.P., et al., *Statistical analysis of clone formation in cultures of human stem cells*. Bull Exp Biol Med, 2011. **151**(4): p. 498-501.
154. Tarte, K., et al., *Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation*. Blood, 2010. **115**(8): p. 1549-53.
155. Kim, J.W., et al., *HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia*. Cell Metab, 2006. **3**(3): p. 177-85.
156. Semenza, G.L., *Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1*. Physiology (Bethesda), 2009. **24**: p. 97-106.
157. Brahimi-Horn, M.C. and J. Pouyssegur, *Oxygen, a source of life and stress*. FEBS Lett, 2007. **581**(19): p. 3582-91.
158. Lavrentieva, A., et al., *Effects of hypoxic culture conditions on umbilical cord-derived human mesenchymal stem cells*. Cell Commun Signal, 2010. **8**: p. 18.
159. Movafagh, S., S. Crook, and K. Vo, *Regulation of Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  by Reactive Oxygen Species : New Developments in an Old Debate*. J Cell Biochem, 2014.
160. Bodnar, A.G., et al., *Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells*. Science, 1998. **279**(5349): p. 349-52.
161. Richter, T. and T. von Zglinicki, *A continuous correlation between oxidative stress and telomere shortening in fibroblasts*. Exp Gerontol, 2007. **42**(11): p. 1039-42.
162. Polzer, H., et al., *Long-term detection of fluorescently labeled human mesenchymal stem cell in vitro and in vivo by semi-automated microscopy*. Tissue Eng Part C Methods, 2012. **18**(2): p. 156-65.
163. Hu, X., et al., *Transplantation of hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells improves infarcted heart function via enhanced survival of implanted cells and angiogenesis*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2008. **135**(4): p. 799-808.
164. Wei, L., et al., *Transplantation of hypoxia preconditioned bone marrow mesenchymal stem cells enhances angiogenesis and neurogenesis after cerebral ischemia in rats*. Neurobiol Dis, 2012. **46**(3): p. 635-45.
165. Kudo, T., et al., *Hypoxic preconditioning reinforces cellular functions of autologous peripheral blood-derived cells in rabbit hindlimb ischemia model*. Biochem Biophys Res Commun, 2014. **444**(3): p. 370-5.
166. Kriebel, K., et al., *Anaerobic co-culture of mesenchymal stem cells and anaerobic pathogens - a new in vitro model system*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e78226.

## 9 Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei allen, die mir geholfen haben diese Dissertation zu ermöglichen.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Matthias Schieker für die Korrektur meiner Dissertation.

Meinem wissenschaftlichen Betreuer, PD Dr. med. Hans Polzer, für seine nützlichen Ratschläge und Ideen, sowie für diverse kritische Anregungen.

Meinen Laborkollegen, für Ihre Unterstützung bei vielen Experimenten, sowie für die schöne Arbeitsatmosphäre.

Mein besonderer Dank geht an

Maximilian Saller, der für mich zu jeder Tages- und Nachtzeit ein kompetenter Ansprechpartner war und dem keine Sekunde zu schade war mich bei Experimenten, dem Erstellen von Graphiken und Texten zu unterstützen.

meine Eltern Monika und Karl-Heinz Nöding, die mich zu allen Zeiten seelisch, moralisch und auch finanziell unterstützt haben und immer für mich da waren und sind.

meine Freundin die mich unglaublich glücklich macht und mir jeden Tag den Rücken für meine Arbeit frei hält.

## **Eidesstattliche Versicherung**

Nöding, Robert

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,  
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf die Physiologie von  
mesenchymalen Vorläuferzellen der Ratte**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Augsburg , 05.02.2018    Robert Nöding

---

Ort, Datum Unterschrift Doktorandin/Doktorand