

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik-Innenstadt
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. W. Mutschler

Charakterisierung von
humanen mesenchymalen Stammzellen
durch immunzytochemische Vierfachfärbung

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Katharina Leske, geb. Reitz

aus

Landau in der Pfalz

2007

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. W. Mutschler
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. M. Götz Prof. Dr. med. H.-J. Kolb
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Priv.-Doz. Dr. med. M. Schieker
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	06.12.2007

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	4
1.1.Humane mesenchymale Stammzellen.....	4
1.1.1. Potential humaner mesenchymaler Stammzellen.....	4
1.1.2. Vorkommen	5
1.1.3. Identifikation von mesenchymalen Stammzellen	6
1.2. Identifizierung durch Immunzytochemie.....	8
1.2.1. Vorteile der Immunzytochemie	8
1.2.2. Immunfluoreszenz	8
1.2.3. Verwendete Marker	9
1.3. Bildakquisition	12
1.3.1. Auftrennung durch Filter	12
1.3.2. Auftrennung durch Spektralanalyse.....	12
1.4. Aufgabenstellung	15
2. Material und Methode.....	16
2.1. Zellkultur	16
2.1.1. Zellen und Medien	16
2.1.2. Zellkulturbedingungen	16
2.2. Immunfluoreszenz.....	17
2.2.1. Immunfluoreszenzmarkierungen	17
2.2.2. Anwendungskonzentration der verwendeten Antikörper	19
2.3. Mikroskopie und Bildauswertung	20
2.3.1. Mikroskope	21
2.3.2. Spektrale Bildauswertung.....	22

2.4. Verwendete Materialien	25
3. Ergebnisse.....	26
3.1. Einfachfluoreszenz.....	26
3.1.1. Einfachfluoreszenz von Fibronectin.....	27
3.1.2. Einfachfluoreszenz von Kollagen IV	28
3.1.3. Einfachfluoreszenz von Kollagen I.....	29
3.1.4. Einfachfluoreszenz von CD 44	30
3.2. Zweifachfluoreszenz	31
3.3. Dreifachfluoreszenz	32
3.4. Vierfachfluoreszenz.....	34
3.4.1. Aufnahme mit AHF-Filter F61002 (Aufnahmen mit Digitalkamera).....	34
3.4.2. Vierfachfluoreszenz aufgenommen mit Filter #01, #10, #15 (Digitalaufn.)	36
3.4.3. Vierfachfluoreszenz mit AHF-Filter F61002 - Spektralanalyse	38
3.4.4. Vierfachfluoreszenz aufgenommen mit Filter SKY (Spektralaufnahme) ..	40
3.4.5. Vierfachfluoreszenz aufgenommen mit Filter #01 (Spektralaufnahme) ...	42
3.4.6. Übersichtstafel aller Spektralaufnahmen mit Filter SKY und Filter #01 ...	44
4. Diskussion	45
4.1. Identifikation von mesenchymalen Stammzellen	45
4.2. Verwendete Zellen	47
4.3. Verwendete Marker.....	48
4.4. Immunfluoreszenz.....	50
4.5. Bildauswertung und Spektralanalyse	53
5. Zusammenfassung	56
6. Anhang	57
6.1. Passageprotokoll hMSC.....	57
6.2. Protokoll Immunfluoreszenz.....	57

7. Referenzen	59
8. Lebenslauf	75

1. Einleitung

1.1. Humane mesenchymale Stammzellen

1.1.1. Potential humaner mesenchymaler Stammzellen

Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) gehören zu einem Pool an multipotenten Zellen in unserem Körper, der in der Lage ist, Zellen zu ersetzen, die durch Krankheit, Trauma oder Alterungsprozesse untergegangen sind (Palermo et al. 2005; Caplan and Goldberg 1999). Mesenchymale Vorläuferzellen im Knochenmark, die unabhängig von den hämatopoetischen Stammzellen sind, wurden erstmalig 1974 von Friedenstein et al. nachgewiesen (Friedenstein et al. 1974).

Adulte Stammzellen sind, anders als Zellen mit spezifischer Funktion, undifferenzierte und unspezialisierte Zellen (Pittenger et al. 1999). Sie können sich aber bei entsprechender Stimulation in kurzer Zeit zu spezialisierten Zellen ihres Keimblattes ausdifferenzieren (Wulf et al. 2006; Grove et al. 2004; Cancedda et al. 2003; Bianco et al. 2001). Im Fall der mesenchymalen Stammzelle sind dies Osteoblasten, Chondroblasten, Adipozyten, Knochenmarksstromazellen und Myozyten (Pittenger et al. 1999; Beresford 1989).

Für das *tissue engineering*, die *in vitro*-Herstellung von Gewebe, sind Stammzellen auf Grund ihrer Fähigkeit zur Selbstreplikation (Zellteilung ohne Differenzierung) und ihre Differenzierbarkeit in andere Gewebe von besonderem Interesse (Gangji et al. 2004; Chen et al. 2004; Fuchs et al. 2003; Deb et al. 2003; Fouillard et al. 2003; Horwitz et al. 2002; Kadereit et al. 2002; Koc et al. 2002; Quarto et al. 2001). Eine schnelle Proliferationsrate mit kurzen Zellzyklen (Bruder et al. 1998b) ermöglicht eine rasche Vervielfältigung der Zellen.

Diese Fähigkeiten können im *tissue engineering* folgendermaßen genutzt werden: Stammzellen werden einem Patienten entnommen, proliferieren durch Stimulation, z.B. mit Wachstumsfaktoren, stark, und werden anschließend zu spezialisierten Zellen ausdifferenziert. In den menschlichen Körper reimplantiert könnten sie nach Krankheit oder Trauma untergegangenes Gewebe ersetzen, ohne dass die Gefahr einer Abstoßungsreaktion bestünde (Gangji et al. 2004; Zhang et al. 2004; Fouillard et al. 2003; Bianco et al. 2001).

Lange Zeit ging man davon aus, dass die Differenzierbarkeit von Stammzellen auf Zelllinien ihres Keimblatts beschränkt sei. Jedoch konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, mesenchymale Stammzellen zu Nervenzellen (Benvenuti et al. 2006; Long et al. 2005; Priller et al. 2001; Brazelton et al. 2000) , Hepatozyten (Talens-Visconti et al. 2006; Lee et al. 2004a; Schwartz et al. 2002), hämatopoetischen Zellen (Jiang et al. 2002a) oder Myokardzellen (Kadivar et al. 2006; Zhang et al. 2006) zu differenzieren. Die möglichen Anwendungsgebiete im medizinischen Bereich vergrößern sich damit enorm.

1.1.2. Vorkommen

In vivo und *in vitro* Studien konnten zeigen, dass hMSC in größerer Anzahl vor allem im Knochenmark vorkommen (Tuli et al. 2003; Prockop 1997).

Dort bilden Proteine, die von hMSC sezerniert werden, eine Mikroumgebung, die entscheidend ist für die Funktion der hämatopoetischen Stammzellen. Das Vorhandensein dieser Proteine, wie z.B. Fibronectin, Laminin, Kollagene und Proteoglykane, in der Extrazellulärmatrix war in Versuchen Voraussetzung für die erfolgreiche Proliferation hämatopoetischer Stammzellen (Gottschling et al. 2006; Kobune et al. 2004; Chiba et al. 2004; Kawano et al. 2003; Tavassoli and Minguell 1991). Entscheidend für die Regulierung dieser Mikroumgebung war dabei auch der direkte Kontakt der Zellen untereinander (Fuchs et al. 2003; Watt and Hogan 2000). Stammzellen besitzen jedoch die Fähigkeit, ihren Ruheplatz im Knochenmark zu verlassen und im Blut zu zirkulieren, wo sie nachgewiesen werden können (Kassis et al. 2006; Wexler et al. 2003). Während bei Mäusen mesenchymale Stammzellen aus dem peripheren Blut in ausreichender Anzahl gewonnen werden können (Kuznetsov et al. 2001), ist dies beim Menschen durch die geringe Anzahl der Zellen schwieriger (Kassis et al. 2006).

Ihre Existenz konnte auch im menschlichen Fettgewebe nachgewiesen werden (Zuk et al. 2001; Gronthos et al. 2001a) und entsprechende Zellen konnten dort isoliert (Wagner et al. 2005; Dicker et al. 2005; Zuk et al. 2002) und ausdifferenziert (Musina et al. 2006; Wagner et al. 2005; Mizuno et al. 2002) werden. Desweiteren konnten hMSC in der Skelettmuskulatur und im Bindegewebe der Dermis nachgewiesen werden (Musina et al. 2006; Mastrogiacomo et al. 2005; Jiang et al. 2002b). Vielversprechend erscheint auch der Ansatz, hMSC aus Nabelschnurblut zu

gewinnen, wobei ihre Anzahl geringer ist als im Knochenmark (Musina et al. 2006; Kogler et al. 2004; Bieback et al. 2004; Goodwin et al. 2001; Erices et al. 2000).

Das gängigste Isolationsverfahren für hMSC ist die Dichtegradientenzentrifugation aus Knochenmarksaspiraten gesunder Spender (Pittenger et al. 1999). Nach Aufbringen in Kulturschalen adhären hMSC umgehend, wohingegen hämatopoetische Zellen nicht adhären und durch Mediumwechsel entfernt werden (Wulf et al. 2006; Le Blanc and Pittenger 2005).

1.1.3. Identifikation von mesenchymalen Stammzellen

Um einen gezielten und verlässlichen Einsatz von hMSC zu ermöglichen, muß man sie sicher identifizieren können. Die Hauptschwierigkeit der Zellgewinnung besteht in der Abgrenzung der undifferenzierten hMSC gegenüber differenzierteren Vorläuferzellen und Osteoblasten (Wagner et al. 2005; Conget and Minguell 1999). Humane mesenchymale Stammzellen kommen dabei in einem Verhältnis von einer Stammzelle auf 34000 kernhaltiger Zellen vor (Wexler et al. 2003). Der Identifikation dieser Zellen kommt damit entscheidende Bedeutung zu.

Bislang ging man davon aus, dass die durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnenen Zellen homogen sind und charakterisierte ganze Zellpopulationen. Im Rahmen dessen wurden zahlreiche Genprodukte mit RT-PCR (Gronthos et al. 2003; Frank et al. 2002; Conget and Minguell 1999; Pittenger et al. 1999) analysiert.

Auch wurde versucht über Aktivitätsmessungen von Enzymen, wie z.B. der Alkalischen Phosphatase (Halvorsen et al. 2001; Kuznetsov et al. 2001; Pittenger et al. 1999), eine Abgrenzung zu anderen Zellen zu ermöglichen oder Differenzierungsstadien voneinander abzugrenzen .

Jedoch sind die durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnenen Zellen keinesfalls homogen. Zellen, die in der Lichtmikroskopie ein homogenes Aussehen besitzen, können in ihrer Genexpression, Differenzierungskapazität und ihrem Wachstumspotential stark variieren ((Le Blanc and Pittenger 2005; Colter et al. 2001). So können bei Zellen niedriger Passage spindelförmige fibroblastenähnliche Zellen, große flache Zellen und kleine runde Zellen unterschieden werden (Vogel et al. 2003).

Kulturen, die mit kleinen runden Zellen angereichert werden, zeigten in Differenzierungssays ein deutlich größeres Differenzierungspotential als gemischte Populationen. Aber selbst diese morphologisch gleich aussehenden Zellen wiesen

bei Analyse der Oberflächenmarker ein heterogenes Färbemuster auf. Außerdem konnten aus diesen Zellen wiederum alle morphologischen Subtypen entstehen (Colter et al. 2001). Zusätzlich zeigen Untersuchungen, dass die Proliferationsfähigkeit innerhalb einer Zellpopulation starken Schwankungen unterliegt (Satomura et al. 2000).

Während bei hämatopoetischen Stammzellen eine Identifikation durch FACS-Analyse mit Hilfe des Oberflächenmarkers CD34 sicher gelingt, ist ein solcher, spezifischer Marker bei hMSCs bis jetzt nicht gefunden worden (Wulf et al. 2006). Selbst umfangreiche FACS-Analysen mesenchymaler Stammzellen konnten keinen selektiven Marker identifizieren (Wagner et al. 2005; Conget and Minguell 1999; Pittenger et al. 1999; Majumdar et al. 1998).

Mesenchymale Stammzellen exprimieren ein Antigenmuster, das mesenchymale, endotheliale, epitheliale und muskuläre Anteile enthält (Minguell et al. 2001). Dieses unspezifischen Expressionsprofil (Bianco and Robey 2001) macht bisher eine gezielte Identifikation unmöglich. Der Nachweis, dass es sich um mesenchymale Stammzellen handelt, wird daher zumeist indirekt aufgrund ihrer Plastizität erbracht. In Differenzierungsassays werden die Zellen durch Stimulation in Richtung der osteogenen, adipogenen und chondrogenen Linie ausdifferenziert und entsprechende Genprodukte nachgewiesen oder histologische Färbungen erstellt (Kogler et al. 2004; Niemeyer et al. 2004; Ryden et al. 2003; Muraglia et al. 2000; Pittenger et al. 1999; Johnstone et al. 1998; Bruder et al. 1998a). Der Nachweis einer osteogenen Differenzierung erfolgt dabei durch „von Kossa Färbung“ und Nachweis erhöhter Aktivität der Alkalischen Phosphatase (Wagner et al. 2005). Die adipogene Differenzierung hingegen wird durch „Oil red-O Färbung“ nachgewiesen (Pittenger et al. 1999). Bei diesem Verfahren verlieren die Zellen jedoch ihre Fähigkeit zur Selbstreplikation (Aubin 1998) und sind für das *tissue engineering* nur noch begrenzt nutzbar.

Daher war es Ziel dieser Arbeit hMSC zu charakterisieren, ohne dass die Zellen ihr Stammzellpotential verlieren. Um die heterogene Zellpopulation der mesenchymalen Stammzellen zu untersuchen, wurde ein Verfahren gewählt, das eine Beurteilung auf Einzelzellebene erlaubt. Da bisher kein Erkennungsmarker für hMSC bekannt ist, sollte durch eine gleichzeitige Markierung mehrerer Antigene ein spezifisches Färbeprofil erstellt werden können. Dies soll die Abgrenzung zwischen hMSC und differenzierteren Vorläuferzellen ermöglichen.

1.2. Identifizierung durch Immunzytochemie

1.2.1. Vorteile der Immunzytochemie

Die Immunzytochemie bzw. die Immunfluoreszenz ist ein Verfahren, welches die oben genannten Anforderungen (Charakterisierung ohne Ausdifferenzierung bzw. ohne Verlust der Selbstreplikation) erfüllt. Damit ist es möglich, die Zellen nicht nur als Zellpopulation zu untersuchen, sondern es können klare Aussagen über das Vorhandensein eines Antigens auf Einzelzellebene getroffen werden. Des Weiteren können Antigene in ihrer genauen Lokalisation und ihrem Verteilungsmuster beschrieben werden und Rückschlüsse auf Zellstrukturen geschlossen werden.

Das Verfahren beruht auf folgendem Prinzip: Primärantikörper binden in einem Inkubationsschritt an ihr spezifisches Antigen. Durch die genaue Zuordnung des Antikörpers an sein Antigen (Schlüssel-Schloss-Prinzip) wird eine hohe Spezifität der Reaktion gewährleistet.

Sekundärantikörper, die gegen die Spezies, in der die Primärantikörper erzeugt wurden, gerichtet sind, binden an die Primärantikörper. An den Sekundärantikörper ist ein Stoff gekoppelt, welcher durch biochemische Verfahren (Peroxidase-Methode) oder Fluoreszenzmikroskopie (Immunfluoreszenz-Methode) sichtbar gemacht werden kann. Da mehrere Sekundärantikörper pro Primärantikörper binden können, kommt es zu einer Amplifikation, so dass das Verfahren eine hohe Nachweisempfindlichkeit besitzt (Lamvik et al. 2001).

Nach der Bindung eines Antikörpers an sein spezifisches Antigen, kann, anhand der Fluoreszenz, eine klare Aussage getroffen werden, ob das Antigen in der Zelle vorhanden ist und wo in der Zelle es lokalisiert ist.

1.2.2. Immunfluoreszenz

Da bislang kein einzelner spezifischer Marker zur Charakterisierung von hMSC bekannt ist, wurde eine Methode gewählt, mit der die Erstellung eines Antigenprofils möglich ist. Um den gleichzeitigen Nachweis mehrerer Antigene pro Zelle zu gewährleisten, wurde die Immunfluoreszenzmarkierung verwendet. Fluoreszenz beschreibt die Fähigkeit eines Stoffes bei Anstrahlung durch eine Lichtquelle zu leuchten. Die zugeführte Lichtenergie wird von einem Teil der Atome absorbiert und

bewirkt eine Anregung in einen energiereicheren Zustand. Diese Energie wird in Form von Wärme, chemischer Energie oder elektromagnetischer Energie (Licht) wieder abgegeben. Stoffe mit dieser Eigenschaft nennt man Fluorochrome. Verschiedene Fluorochrome entsenden Licht spezifischer Wellenlänge, die für das menschliche Auge als Farbe sichtbar sind (Jülich 2003) oder aber im ultravioletten Licht nur durch spezielle Messgeräte nachgewiesen werden können. Dadurch ist es möglich verschiedenen Fluorochrome voneinander abzugrenzen.

Um nun Zellstrukturen, die keine Eigenfluoreszenz besitzen, unter dem Mikroskop zu betrachten, werden Antikörper verwendet, an die Fluorochrome gekoppelt sind. Mit diesem Verfahren gelingt es, bei Verwendung verschiedener Fluorochromfarben, mehrere Antigene pro Zelle zu markieren und zu diskriminieren.

Bisher ist für humane mesenchymale Stammzellen jedoch lediglich eine Zweifachfluoreszenz beschrieben (Jiang et al. 2002a). Ziel dieser Arbeit war es, eine Vierfachfluoreszenz auf humanen mesenchymalen Stammzellen zu etablieren, um diese Zellen zu charakterisieren und sie gegen andere Zellen abzugrenzen.

1.2.3. Verwendete Marker

Die verwendeten Marker, Fibronectin, Kollagen I, Kollagen IV und CD44, wurden aus folgenden Gründen ausgewählt: Sie gehören zum Expressionsprofil von mesenchymalen Stammzellen und ihre Existenz in hMSC wurde mehrfach nachgewiesen (Otto and Rao 2004). Jedes Antigen besitzt ein spezifisches Verteilungsmuster und eine spezifische Lokalisation, die sie von den anderen Antigenen klar unterscheidet. Dies ermöglicht eine einfache Identifikation, und die Spezifität der Immunfluoreszenzmarkierung kann überprüft werden.

Oberflächenantigene	Sekretierte Proteine
CD13	Interleukins: 1 α , 6, 7, 8, 11, 12, 14, 15
CD29	LIF, SCF, FLT-3 ligand, GM-CSF,
CD44	G-CSF, M-CSF
CD49a	Oberflächenrezeptoren
CD71 (Rezeptor für Transferrin)	IL1-R, II-3R, II4-R, II-6R, II-7R, LIFR,
CD90	SCFR, G-CSFR, VCAM-1, ALCAM-1,
CD105 (SH2; Endoglin)	LFA-3 IFN γ R, TNF1R, TNF2R, TGFB
CD114 (c-kit)	1R, TGF β 2R, bFGFR, PDGFR, EGFR
CD166	Proteine des Cytoskeletts
HLA-ABC	A-Smooth muscle actin
Glycophorin A	GFAP
gp130	Bestandteile der Extrazellulärmatrix
ICAM-1/2	Kollagen I, III, IV, V und VI
Mab 1740	Fibronectin
p75 NGF-R	Laminin
SH3	Hyaluronsäure
SH4	Proteoglykane
Stro-1	
HLA class II-ve	

Tabelle 1.1: Phänotypische Marker für mesenchymale Stammzellen (Otto and Rao 2004). Die in dieser Arbeit verwendeten Marker sind gelb hinterlegt.

Fibronectin

Fibronectin, ein Protein der Extrazellulärmatrix, vermittelt die Haftung von Zellen an Kollagenfasern und an Heparinseitenketten von Proteoglykanen, da Zellen nur schlecht an Kollagene binden (Sottile and Hocking 2002). An der Zelloberfläche bindet Fibronectin an Integrine, die die transmembranäre Verbindung zum Zytoskelett der Zelle herstellen.

Fibronectin wird von mesenchymalen Stammzellen sehr stark exprimiert (Vogel et al. 2003; Chichester et al. 1993). In Versuchen, bei denen die Genexpression von hMSC mit Hilfe von Genom-Microassays untersucht wurden, zeigte sich eine starke Expression von Fibronectin im Vergleich zu Fibroblasten (Wagner et al. 2005).

Kollagen I

Kollagen I gehört zur Gruppe der Kollagene, die in Form von Fasern eine wichtige Rolle zur Stabilisierung von Bindegeweben spielen. Kollagen I Fasern bilden ein fibrilläres Netz im straffen und lockeren Bindegewebe sowie im Knochen (Viguet-Carrin et al. 2006a; Viguet-Carrin et al. 2006b; An et al. 2004). Kollagen I ist ein klassischer Marker für hMSC, der von den Zellen exprimiert wird, sobald sie auf einer

Fläche adhären (Wexler et al. 2003; Shur et al. 2002; Zohar et al. 1997). Werden hMSC auf Kollagen I beschichteten Oberflächen kultiviert, so ist dieser Kontakt ausreichend, um die Zellen in Richtung der osteogenen Kaskade auszudifferenzieren (Kundu and Putnam 2006; Liu et al. 2004).

Kollagen IV

Kollagen IV kann nur in mesenchymalen Stammzellen und unreifen Osteoblasten-Vorläufern nachgewiesen werden, nicht jedoch in reiferen Vorläuferzellen (Deschaseaux and Charbord 2000; Chichester et al. 1993). Kollagen IV ist ein spezialisiertes Kollagen der Basalmembran von Zellen. Es stellt den Befestigungsort für Laminin dar, welches wiederum an transmembranäre Integrine bindet und so eine Verbindung von Zellinnerem und Extrazellulärmatrix herstellt (Pasco et al. 2003; Alberts B. et al. 1998).

CD44

CD 44 gehört zur Gruppe der Oberflächenantigene, die in der Zellmembran lokalisiert sind, und ist ein Rezeptor für zahlreiche Liganden wie Hyaluronsäuren und Osteopontin (Conget and Minguell 1999; Pittenger et al. 1999). CD 44 überwacht Veränderungen der Extrazellulärmatrix, die Einfluss haben auf Zellwachstum, Überleben der Zelle und Differenzierung (Ponta et al. 2003). CD44 ist ein etablierter und vielfach untersuchter Marker, der zum phänotypischen Profil von hMSC gehört (Javazon et al. 2004; Kogler et al. 2004; Tocci and Forte 2003; Hou et al. 2003; Reyes et al. 2001). Es kann auf hMSC nachgewiesen werden, sobald mesenchymale Stammzellen auf einer Oberfläche adhären (Wexler et al. 2003; Shur et al. 2002; Zohar et al. 1997).

1.3. Bildakquisition

Die gleichzeitige Erfassung mehrerer Antigene bzw. Fluorochrome stellt besondere Ansprüche an die Mikroskopie und die nachfolgende Bildauswertung.

Ziel der Bildakquisition war der eindeutige Nachweis aller vier verwendeten Fluorochrome und der Kernfärbung. Dabei sollte einerseits die Existenz der Antigene, andererseits ihr Verteilungsmuster und ihre Lokalisation innerhalb bzw. außerhalb der Zelle nachgewiesen und dokumentiert werden. Zur besseren Beurteilbarkeit dieser Kriterien kamen computergestützte Methoden zum Einsatz.

1.3.1. Auftrennung durch Filter

Zur Exzitation und Emission von Fluoreszenzlicht wird für jedes Fluorochrom Licht einer definierten Wellenlänge benötigt. Um störende Wellenlängen zu blocken, wurden verschieden Filter verwendet. Diese waren entweder Einzelfilter, die spezifisch Licht für ein Fluorochrom/Farbspektrum selektieren oder Band-Filter, die für mehrere Fluorochrome/Farbspektren geeignet sind.

1.3.2. Auftrennung durch Spektralanalyse

Bei Mehrfachfärbungen gelingt die Abgrenzung der einzelnen Farben mit bloßem Auge oftmals nicht mehr. Einerseits kommt es durch Überlagerung verschiedenfarbiger Fluorochrome zu Mischfarben. Andererseits sind eng beieinander liegende Farbspektren (z.B. rot und orange) schwierig voneinander abzugrenzen. Um dennoch einen gesicherten Nachweis aller verwendeten Fluorochrome bieten zu können, wurde die Spektralanalyse zur Hilfe genommen. Diese errechnet das Wellenspektrum eines jeden Pixels innerhalb eines definierten Bereichs. Dadurch ist es möglich Wellenlängenunterschiede von 10nm aufzutrennen, eine Leistung, die mit dem bloßen Auge nicht möglich ist (Malik et al. 1996).

Das Verfahren kombiniert zwei Techniken, CCD-Imaging und Spektralanalyse. CCD-Imaging erzeugt detaillierte Bilder eines Objekts in schwarz-weiß mit Hilfe einer digitalen Kamera. Die Spektralanalyse hingegen analysiert das Bild Pixel für Pixel, misst die zugehörigen Wellenspektren und stellt sie als Graphen dar. Damit ist das Wellenspektrum für jeden Pixel des Bildes bekannt (Rothmann et al. 1998; Malik et al. 1996). Durch linear unmixing (Zuweisung von Falschfarben zu bestimmten

Wellenlängen) können nun auch geringe Farbunterschiede mit bloßem Auge erkannt werden. Außerdem kann auch in Mehrfachfärbungen jedes Fluorochrom einzeln dargestellt werden, um die Lokalisation besser beurteilen zu können

Dieses Verfahren ist für die Chromosomenanalyse bei genetischen oder tumorbedingten Chromosomenaberrationen seit langem etabliert (Schrock et al. 2006; Belaud-Rotureau et al. 2003; Schrock et al. 1996). Mit „multicolor fluorescence in situ hybridisation“ können bis zu 24 verschiedene Fluorochrome detektiert und sichtbar gemacht werden (Schrock and Padilla-Nash 2000; Macville et al. 1997).

Abb. 1.1 erläutert noch einmal das zu Grunde liegende Verfahren.

Der Einsatz dieses Verfahrens zur Charakterisierung von Zellen auf Einzelzellebene ist hingegen eine aktuellere Entwicklung. Wir präsentieren daher einen neuen Ansatz zur Charakterisierung von mesenchymalen Stammzellen durch Etablierung einer Vierfach-Immunfluoreszenz und anschließender Spektralanalyse.

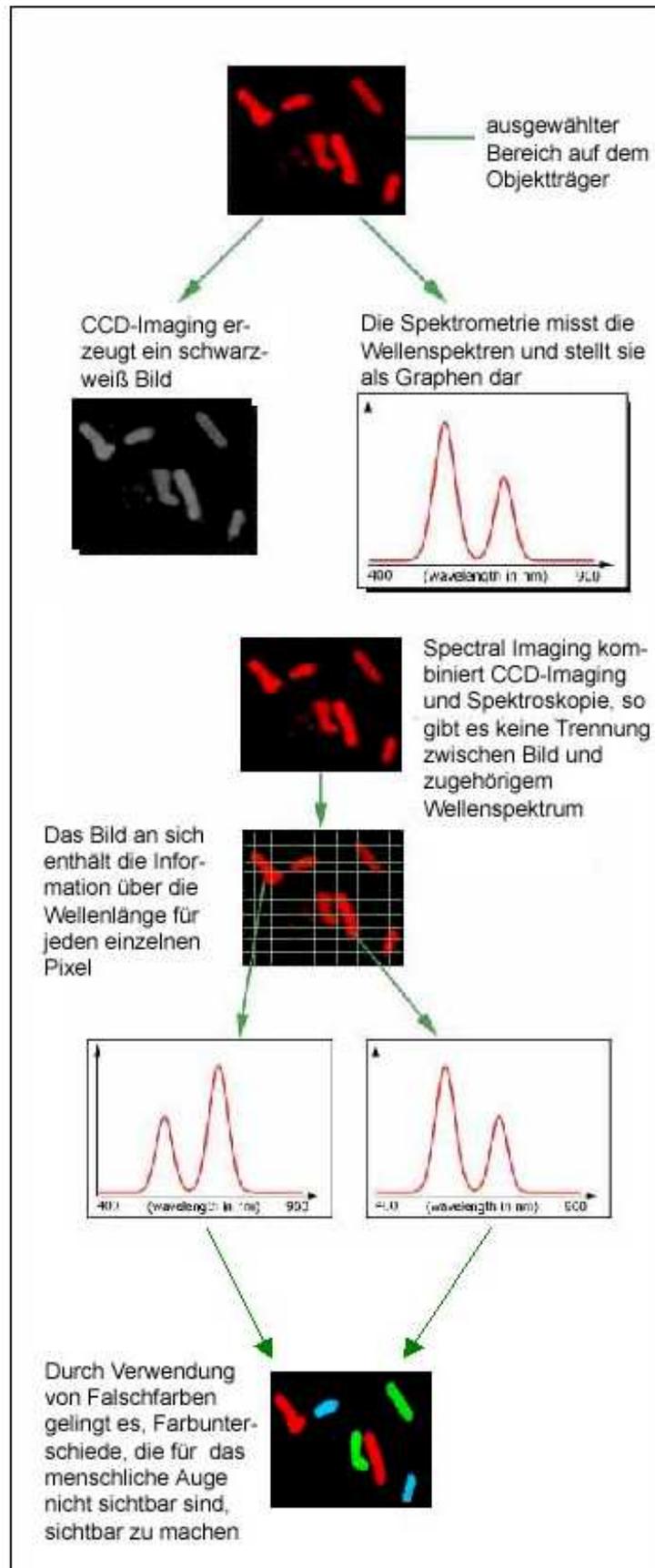


Abb 1.1: Prinzip der Spektralanalyse am Beispiel einer Chromosomenanalyse (aus „Spectral Imaging“, Homepage der Firma „Applied spectral imaging“, Israel, www.spectral-imaging.com, Oktober 2006)

1.4. Aufgabenstellung

Humane mesenchymale Stammzellen sind auf Grund ihrer Fähigkeit zur Selbstreplikation und ihrer Differenzierbarkeit in mesenchymale und keimblattüberschreitende Zelltypen von großer Bedeutung bei der Herstellung von Gewebeersatz im Rahmen des *tissue engineering*. Entscheidend ist hierfür die Identifikation der Zellen mit dem größten Differenzierungspotential, ohne vorherige Ausdifferenzierung. Da eine Identifizierung mittels eines spezifischen Markers bis heute nicht gelungen ist, sollte mit dieser Arbeit eine Methode entwickelt werden, die es ermöglicht, über gleichzeitige Markierung mehrerer Antigene ein Färbeprofil auf Einzelzellniveau zu erstellen.

Als Nachweismethode wurde die Immunfluoreszenz gewählt. Sie erlaubt nicht nur eine Beurteilung der Zellen auf Einzelzellniveau, sondern auch eine Beurteilung des Färbemusters und der Lokalisation. So können zusätzlich Unterschiede in der Antigenexpression einzelner Zellen beurteilt werden. Durch die anschließende Bearbeitung mit computergestützten Untersuchungsverfahren sollten die Ergebnisse für das menschliche Auge sichtbar gemacht werden. Zur Analyse und besseren Darstellung der Fluorochromfarben wurde erstmalig das Programm SpectraCube (ASI, Israel) angewendet. Dabei wird ein spektrales Bild erzeugt, die Wellenlängen für jeden einzelnen Pixel werden durch *linear unmixing* bestimmt und durch Falschfarbenzuweisung für das menschliche Auge sichtbar gemacht.

2. Material und Methode

2.1. Zellkultur

2.1.1. Zellen und Medien

Humane mesenchymale Stammzellen wurden von der Firma CAMBREX, USA bezogen und entsprechend den Herstellerangaben kultiviert. Die Zellen wurden durch Dichtegradientenzentrifugation aus Knochenmarksaspiraten gesunder Spender gewonnen. Der Nachweis, dass es sich um Stammzellen handelt, wurde mit Hilfe von Differenzierungsassays in Richtung der chondroblastären, adipogenen und osteoblastären Linie erbracht. Des Weiteren wurde durch den Nachweis verschiedener Oberflächenantigene ausgeschlossen, dass es sich um Zellen der hämatogenen Linie handelt (Pittenger et al. 1999).

2.1.2. Zellkulturbedingungen

Die Zellen wurden in einem Brutschrank (Jouan, Frankreich) bei 37°C und 5% CO₂ gezüchtet. Die Kultivierung erfolgte in Kulturflaschen T75 (Nunc, USA) bei einer Anfangskonzentration von ca. 5000 Zellen/cm². Als Medium für die Zellkultur wurde Dulbecco Modified Eagle Medium (Gibco BRL, Deutschland) verwendet, welches als etabliertes Medium für mesenchymale Stammzellen gilt (Otto and Rao 2004). Ein Wechsel fand alle 3 bzw. 4 Tage statt. Bei einer Zellkonfluenz von ca. 90% erfolgte eine Passagierung der Zellen. Dafür wurden die Zellen ca. 5 Minuten bei 37°C mit Trypsin/EDTA-Lösung (Cambrex, USA), gelöst in PBS (phosphate buffered saline, Merck, Deutschland), inkubiert. Nach Ablösung der Zellen wurde 3ml Medium zur Neutralisierung des Trypsins zugegeben. Diese Suspension wurde anschließend bei 600G für 5min zentrifugiert (Zentrifuge, Jouan, Frankreich) und der Überstand wurde abgenommen. Danach wurden die Zellen in Medium resuspendiert und auf Kulturflaschen T75 (Nunc, USA) verteilt.

Alle Arbeitsschritte fanden unter sterilen Arbeitsbedingungen unter einer Arbeitsbank Antares (Biohit, Deutschland) statt, welche über einen kontinuierlichen laminaren Luftstrom verfügte.

2.2. Immunfluoreszenz

2.2.1. Immunfluoreszenzmarkierungen

Für die Immunfluoreszenzfärbungen wurden die Zellen vor Erreichen der siebten Passage von den Kulturflaschen auf Glasobjektträger transferiert. Dazu wurden sie trypsiniert und zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet so resuspendiert, dass für jeden Objektträger 0,8ml Lösung mit $0,8 \times 10^5$ Zellen vorhanden waren. Der jeweilige Anteil der Resuspension wurde auf sterile, unbeschichtete Glasobjektträger, die sich in Quadriperm-Schalen (Schubert, Deutschland) befanden, aufgebracht. Die Zellen adhärten über Nacht, bevor sie am nächsten Tag fixiert wurden. Dazu wurde das überschüssige Medium abgeklopft, und die Zellen in PBS (phosphate buffered saline, Merck, Deutschland) gewaschen. Anschließend erfolgte die Fixierung durch Eintauchen der Glasobjektträger in Methanol (Merck, Deutschland) bei -20°C für 8 Minuten. Durch erneutes Waschen in PBS wurden eventuelle Reste des Methanols entfernt.

Um die Glasobjektträger mit einem Fettstift (Dako, Deutschland) in verschiedene Felder zu unterteilen, mussten die Objektträger komplett getrocknet sein. Es erfolgte eine Einteilung der Glasobjektträger in 8 Felder. Dadurch war es möglich auf einem Objektträger Mehrfachmarkierungen, Positivkontrollen der Einfachfluoreszenzen und Negativkontrollen aufzutragen. Anschließend wurden die Objektträger in PBS (phosphate buffered saline, Merck, Deutschland) rehydriert, um die Proteinstruktur wieder herzustellen.

Ein Blockier-Schritt diente dem Absättigen unspezifischer Bindungsstellen für die Sekundärantikörper. Dazu wurde Esel-Serum (Dianova, Deutschland), entsprechend der Herkunftsspezies der Sekundärantikörper, mit PBS auf 1:20 verdünnt, für eine Stunde auf die Zellen aufgebracht. Für diesen Schritt, sowie für alle Färbeschritte, wurden die Zellen in einer abgedunkelten Feuchtkammer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Blocken erfolgte kein Waschschrift, sondern die Objektträger wurden nach dem Abklopfen des Blockingserums direkt mit dem Primärantikörper inkubiert.

Für die Inkubation mit den Primärantikörpern wurden alle verwendeten Antikörper in ihrer entsprechenden Verdünnung mit PBS gemischt (nähere Information zur Anwendungskonzentration siehe Tabelle 1) und auf die verschiedenen Felder aufgetragen (für genauere Angaben zu den Primär- und Sekundärantikörpern z.B.

zu Antikörpertyp, der Herstellungsspezies, den verwendeten Fluorochromen und dem Hersteller siehe Tabelle 1 und 2). Nach einer halbstündigen Inkubation wurden Antikörperüberstände durch Waschen mit PBS entfernt.

Die Sekundärantikörper waren gegen die Tierart gerichtet, in der der jeweilige Primärantikörper hergestellt worden war. So wurde z.B. für den Fibronectin-Primärantikörper, der in der Maus erzeugt worden war, ein Sekundärantikörper verwendet, der gegen Mausproteine gerichtet war.

Außerdem waren alle verwendeten Sekundärantikörper so gewählt, dass sie in der selben Spezies (Esel), hergestellt worden waren. Dadurch war es möglich, bei Mehrfachmarkierungsschritten alle Sekundärantikörper in einem Färbeschritt aufzutragen, ohne Kreuzreaktionen der Sekundärantikörper untereinander befürchten zu müssen. Da mit Ratte und Maus Primärantikörper aus sehr nah verwandte Spezies ausgewählt worden waren, mußten diese Antikörper gegen die jeweils andere Art adsorbiert sein. Das heißt Sekundärantikörper aus der Ratte, die auf Mäuseantigene reagiert hatten, waren durch entsprechende Reinigung vom Hersteller entfernt worden. Zusätzlich waren die Sekundärantikörper gegen Kaninchen und Ziege adsorbiert. Somit konnten Kreuzreaktionen auf Grund von Artverwandtschaften reduziert werden.

Die Inkubation mit den Sekundärantikörper erfolgte nach dem gleichen Verfahren, wie das der Primärantikörper (nähere Informationen zur Anwendungskonzentration siehe Tabelle 2).

Zur Überprüfung der Spezifität der Antikörper wurden sowohl Positiv- als auch Negativkontrollen durchgeführt. Für die Negativkontrolle wurden auf einem Feld statt Primärantikörper PBS und anschließend alle Sekundärantikörper aufgetragen. So konnte sichergestellt werden, dass ein Sekundärantikörper keine Hintergrundfärbung besaß. Des weiteren wurden zur Positivkontrolle bei Mehrfachfärbungen alle verwendeten Antikörper auch in Einfachfärbungen mitgefärbt, um die Färbemuster vergleichen zu können.

Um alle Zellkerne sichtbar zu machen, wurde im Anschluss an die Antikörperfärbungen eine Kernfärbung mit 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) (MolecularProbes, Deutschland) durchgeführt. DAPI lagert sich an die DNS im Zellkern und färbt das Zytoplasma der Zelle nicht an.

Für die Färbung wurde DAPI mit PBS auf 1:5000 verdünnt und für 2 Minuten auf die Objektträger aufgetragen und anschließend mit PBS entfernt. Durch dieses Verfahren wurde eine fünfte Fluoreszenz erzeugt.

Im Anschluss an die Immunfluoreszenzmarkierung sollte die Fluoreszenz durch Eindecken möglichst langfristig vor dem Austrocknen geschützt werden und die Intensität der Färbungen erhalten bleiben. Als Eindeckmedium wurde ProLong (Molecular Probes, Invitrogen, Deutschland) verwendet, ein hydrophiles, polymerisierendes Eindeckmedium, welches die Zellen sicher vor der Austrocknung schützte und ein Verrutschen des Deckgläschens auch bei Verwendung von Ölfiltren zuverlässig verhinderte. Zusätzlich beinhaltete es einen Inhaltsstoff, welcher ein Verblässen der Färbungen auch über einen Zeitraum bis zu 6 Monaten verhinderte. ProLong wurde entsprechend den Herstellerangaben (siehe Anhang: Protokoll Immunfluoreszenz) vorbereitet und zwischen Objektträger und Deckgläschen eingefüllt. Zur Aushärtung wurden die Objektträger über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt.

2.2.2. Anwendungskonzentration der verwendeten Antikörper

Antigen	Antikörper	Verdünnung	Spezies	Hersteller, Katalog-Nr.
Kollagen I Anti-human	Col I	1:5	Kaninchen	Chemicon, USA Nr. AB745
Kollagen IV Anti-human	Col IV	1:5	Ziege	Accurate Chemical, USA Nr. YMPS063
Fibronectin Anti-human	HFN7.1	1:5	Maus	DSHB, USA Nr. HFN7.1
CD44 Anti-human	Hermes – 1	1:5	Ratte	DSHB, USA Nr. Hermes - 1

Tabelle 1: Produktinformation aller verwendeten Primärantikörper

Antigen	Antikörper	Verdünnung	Spezies	Hersteller, Katalog-Nr.
Anti-Maus IgG	Conjugated to Texas Red	1:50	Esel	Dianova, Deutschland Nr. 715-075-151
Anti-Ratte IgG	Conjugated to AMCA	1:25	Esel	Dianova, Deutschland Nr. 712-155-153
Anti-Kaninchen IgG	Conjugated to Fluorescein (FITC)	1:25	Esel	Dianova, Deutschland, Nr. 711-095-152
Anti-Ziege IgG	Conjugated to Alexa 546	1:250	Esel	Molecular Probes, Deutschland Nr. A-11056

Tabelle 2: Produktinformation aller verwendeten Sekundärantikörper

2.3. Mikroskopie und Bildauswertung

Zur Auswertung der Fluoreszenz wurden die Mikroskope Axioskop 2 FS Plus mit Quecksilberdampflampe HBO 103 Watt (Zeiss, Deutschland) und Axioskop (Zeiss, Deutschland) verwendet. Die Fluoreszenzen wurden mit Filter #40 (Zeiss, Deutschland) und mit Standardfiltersets #01, #10, #15 (Zeiss, Deutschland) ausgewertet. Zur Auswertung von Mehrfachfluoreszenzen wurden die Trippelbandfilter AHF 61002 (AHF, Deutschland) und SKY (ASI, Israel), sowie das Standardfilterset #01 benutzt (weitere Informationen zu den verwendeten Filtern siehe Tabelle 3). Die Aufnahmen wurden mit einem 40-fach Objektiv "Achromplan" 40x/0,8 W ohne Öl (Zeiss, Deutschland) betrachtet. Die Mikroskope standen im abgedunkelten Raum um zusätzliche Ausbleichung der Objektträger zu vermeiden und um die Fluoreszenzsignale besser auswerten zu können.

Die Bildakquisition erfolgte mit einer konventionellen Digitalkamera Cybershot DSC S75 (Sony, Japan). Die Aufnahmen wurden im Nachtmodus fotografiert, in welchem auch schwache Fluoreszenzsignale aufgenommen werden konnten. Zur Akquisition der Spektralanalyse wurde eine CCD-Kamera CCD 5880-C (Hamamatsu, Japan) verwendet.

2.3.1. Mikroskope

Für die Auswertung von Immunfluoreszenz wird energiereiches Licht aller Wellenlängen benötigt. Daher verfügen die Mikroskope zumeist über Quecksilberdampflampen oder Xenondampflampen (im Spektralmikroskop), da diese ein kontinuierliches Lichtspektrum besitzen (siehe Abbildung 2.1, 1.). Dieses Licht wird mit Hilfe eines Anregungsfilters (siehe Abbildung 2.1, 2.) auf die Wellenlänge reduziert, die zur Anregung der Fluorochrome benötigt wird. Über einen Teilungsfilter (siehe Abbildung 2.1, 4.) wird einerseits das Anregungslicht zum Präparat reflektiert, andererseits wird das Fluoreszenzlicht, das vom Präparat ausgesendet wird, zum Okular frei durchgelassen. Der Sperrfilter (siehe Abbildung 2.1, 3.) dient dazu, Licht das vom Präparat reflektiert wird oder welches nicht spezifisch für das verwendete Fluorochrom ist, herauszufiltern. Die Auswertung (siehe Abbildung 2.1, 5.) erfolgt entweder direkt über das Okular oder über eine Kamera (Spektral oder Digital).

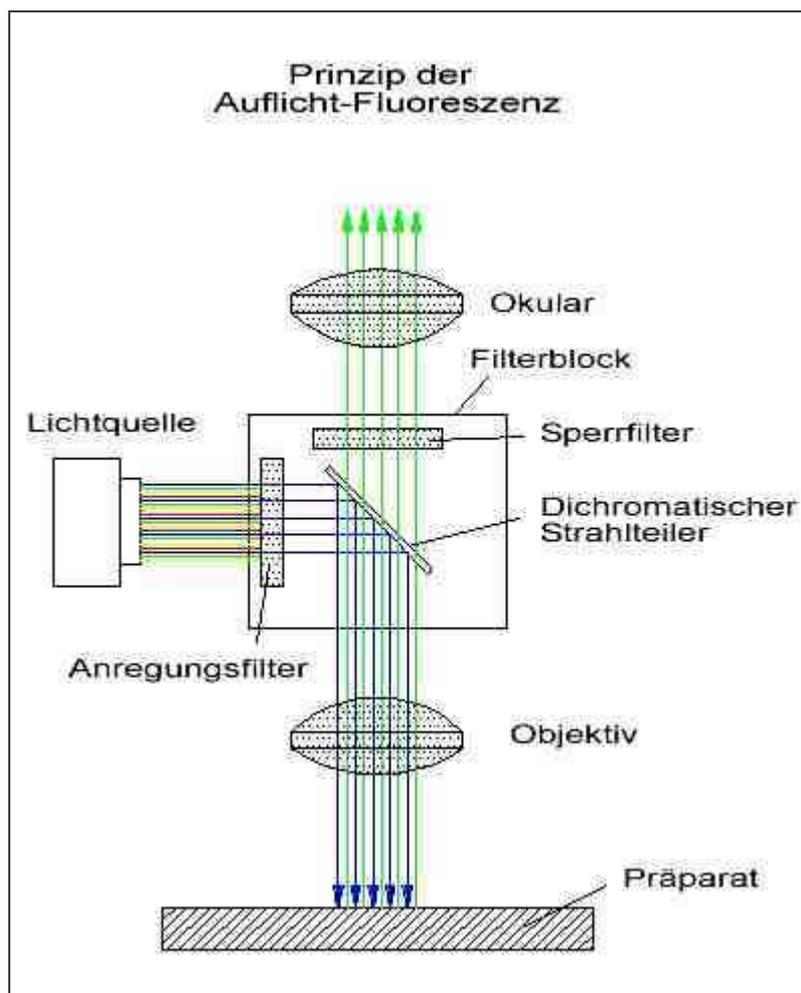


Abb 2.1: Schema eines Fluoreszenzmikroskops (aus „Fluoreszenzmikroskopie“, Homepage der Firma „Optische und elektronische Geräte Jülich“, Deutschland, www.juelich-bonn.com, Oktober 2006)

2.3.2. Spektrale Bildauswertung

Weiterhin erfolgte eine spektrale Analyse mit Hilfe eines Sagnac Interferometers Spectra Cube SD-200 (Applied Spectral Imaging (ASI), Israel). Während das menschliche Auge erst Wellenlängenunterschiede von mehr als 30nm wahrnimmt, ist die Spektralanalyse in der Lage Wellenlängenunterschiede von 10nm zu detektieren (Rothmann et al. 1998; Malik et al. 1996). Das System bestand aus einem Mikroskop Axioskop 2FS (Zeiss, Deutschland), einer CCD-Kamera CCD 5880-C (Hamamatsu, Japan), einem Sagnac-Interferometer SpectraCube (ASI, Israel) und einem Computer ausgerüstet mit der Software SpectraView (ASI, Israel).

Aufnahmen mit dem Sagnac Interferometers wurden mit einem 40fach Objektiv (Öl) hergestellt. Die Funktion des Interferometers beruht auf folgendem Prinzip (siehe Abb 2.2): Der Lichtstrahl, der von einem ausgewählten Bereich des Objektträgers (2.2, 1.) kommt, wird von einem Strahlenteiler (2.2, 2.) in unendlich viele Strahlen aufgeteilt. Ein System von Spiegeln (2.2, 3.) schickt die verschiedenen Strahlen über unterschiedlich lange Wege, um sie am Ende mit einem Gangunterschied wieder zusammenzulagern. Dieser *Optical Path Difference* (OPD) ist abhängig vom Längenunterschied der zurückgelegten Wege. Die Intensität des überlagerten Strahls wird von der CCD-Kamera (2.2, 4.) gemessen. Jede Messung wird als frame abgespeichert. Durch Benutzung unterschiedlicher OPDs können viele verschiedene frames gespeichert werden. Dabei wird bei Änderungen des OPDs jeder Pixel neu erfasst. Aus diesen Informationen wird anschließend für jeden Pixel ein Interferogram (2.2, 5.), eine Darstellung der Lichtintensität bei wechselnden OPDs, erstellt.

Mit Hilfe der Fourier-Analyse (2.2, 6.) wird aus dem Interferogram die Wellenlänge für jeden Pixel bestimmt.

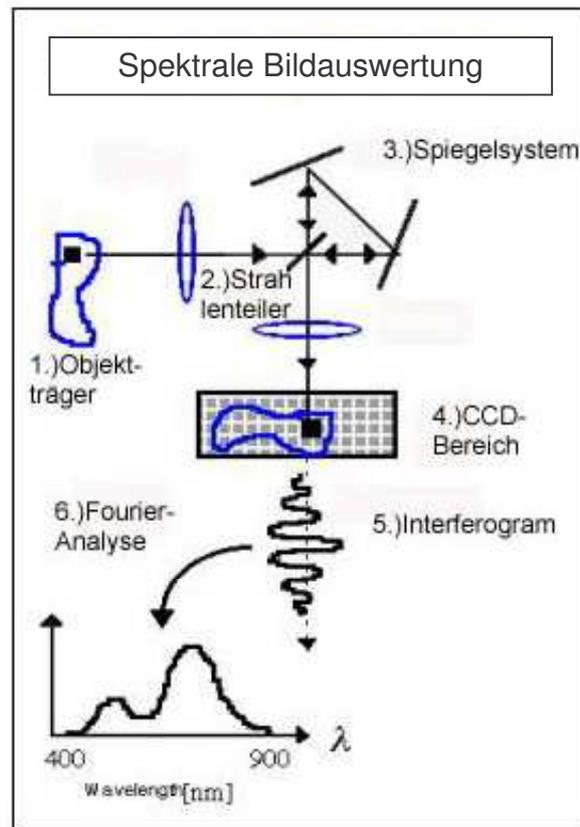


Abb 2.2: Prinzip der spektralen Bildauswertung (aus: „SpectraCube“, Homepage der Firma „Applied Spectral Imaging“, Israel, www.spectral-imaging.com, August 2004)

Zuerst wurden Einzelfärbungen, die als Kontrolle auf jedem Objektträger mitgefärbt worden waren, mit Spektralanalyse ausgewertet. Zur Bildverarbeitung und Analyse wurde das Programm SpectraView (ASI, Israel) verwendet. Dieses trennte das Bild in die einzelnen reinen Spektralkomponenten auf. Die Ergebnisse wurden als Referenz im Programm SpectraView (ASI, Israel) gespeichert, um sie anschließend mit der Vierfachfärbung abzugleichen. Die Vierfachfluoreszenzen wurden mit SpectraView bearbeitet, um die Ergebnisse für das menschliche Auge sichtbar zu machen. Dazu verglich das Programm die Vierfachfärbung mit den zuvor gewonnenen Referenzen. Die Wellenspektren der Fluorochrome der Vierfachfluoreszenz mussten für ein positives Ergebnis mit denen der Einfachfluoreszenz übereinstimmen. Das Programm ordnete dem Schwarz-Weiß-Bild anhand der bekannten Wellenlängen entsprechende Farben zu. Des weiteren konnten mit Hilfe des linear unmixing Falschfarben für definierte Wellenspektren gewählt werden, um Wellenspektren besser voneinander abgrenzen zu können. Folgende Farben wurden dabei den Fluorochromen zugeordnet: rot (Texas Red),

gelb (Kollagen IV), grün (FITC), blau (AMCA) und hellblau (DAPI-Kernfärbung). Dargestellt wurden die Ergebnisse einmal als Übereinanderlagerung aller Farben und zusätzlich als Einzelbilder. Angegeben waren auch die Wellenlängen jedes Fluorochroms. Als Positivkontrolle dienten digitale Aufnahmen des gleichen Bereiches. Diese wurden mit der Digitalkamera mit einem 63fach Objektiv (Öl) gewonnen, um die gleiche Bildvergrößerung zu erzielen.

Filter	Hersteller	Emissions-Wellenlänge	Exzitations-Wellenlänge	Verwendet für Fluorochrom
Filter 1	Zeiss, Deutschland	LP 397	BP 365	AMCA, DAPI
Filter 10	Zeiss, Deutschland	BP 515-565	BP 450-490	FITC
Filter 15	Zeiss, Deutschland	LP 590	BP 546/12	Alexa 546, Texas Red
Filter 40	Zeiss, Deutschland	TBP 460/ 520/ 600	BP 360/51 BP 485/17 BP 560/18	AMCA, DAPI, Alexa 546, FITC
Trippelbandfilter SKY	ASI, Israel	500-545 580-620 660	465-485 555-565 630-655	FITC, Alexa 546, Texas Red
Trippelbandfilter F61 002	AHF Analysentechnik GmbH, Deutschland	TBP 460/520/600	BP 360/51 BP 485/17 BP560/18	FITC, Alexa 546, Texas Red, AMCA, DAPI

Tabelle 3.: Angaben zu den verwendeten Filtern

2.4. Verwendete Materialien

Material	Typ	Hersteller
HMSC		Cambrex, USA
Brutschrank	IG 150	Jouan, jetzt Thermo Electron, USA
Kulturflaschen	T25, T75 flasks	Nalge Nunc. Int. USA
Trypsin EDTA Lösung	CC 5012	Cambrex, USA
PBS (phosphate buffered saline)	Na ⁺ H ₂ PO ₄ H ₂ O; Na ₂ H ₂ PO ₄ 2H ₂ O; Na ⁺ Cl ⁻	Merck, Deutschland
Alkohole		Merck, Deutschland
Kulturmedium	Dulbeccos Modified Eagle Medium	Gibco BRL, Deutschland
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole	Molecular Probes, Invitrogen, Deutschland
Unkonj. Normalserum Esel	Nr. 017-000-121	Dianova, Deutschland
Kulturflaschen für Objektträger	Quadriperm in vitro	Labor Schubert, Deutschland
Sterilisator	Zirbus LTA 400	Zirbus GmbH, Deutschland
Glasobjektträger und Deckgläser	76x26 (AA00000102E) 60x40 (Sonderanf.)	Menzel Gläser, Deutschland
Sterilbank	Antarres 48172	Biohit, Deutschland
Analysenwaage	Typ 770	Kern und Sohn, Deutschland
Schüttler	Typ VM4	CAT, Deutschland
Pipettierhilfe	Pipetus akku	Hirschmann Laborgeräte Deutschland
Einmal-Pipettenspitzen	20, 100, 200, 1000µl	Eppendorf, Deutschland
Mikroskop	Axioskop 2FS	Carl Zeiss, Deutschland
Mikroskop	Axioskop	Carl Zeiss, Deutschland
Sagnac Interferometer	SpectraCube SD-200	Applied Spectral Imaging, Israel
Software	SpectraView 1.6	Applied Spectral Imaging, Israel
Software	Adobe Photoshop Elements 5.1	Adobe, USA
Digitalkamera	Cybershot DSC S75	Sony, Japan
CCD Camera	CCD 5880-C	Hamamatsu, Japan
Fettstift für Immunhistochemie	Dako Pen S2002	Dako, Deutschland
Reaktionsgefäße	1,5ml Eppendorf Nr. 0030125.150	Eppendorf, Deutschland
Eindeckmedium	ProLong Antifade Kit P7481	Molecular Probes, Invitrogen, Deutschland
Zentrifuge	CT422	Jouan, jetzt Thermo Electron, USA
Zentrifugenröhrchen		Nürnbrecht, Deutschland

Tabelle 4.: Liste der verwendeten Materialien

3. Ergebnisse

Die Immunfluoreszenzmarkierungen gegen die Antigene Fibronectin, Kollagen I, Kollagen IV und CD44 wurden unter folgenden Gesichtspunkten ausgewertet: Verteilungsmuster (retikulär, granulär etc.) und Lokalisation (intra- bzw. extrazellulär). Eine Beurteilung der Intensität war hingegen nur indirekt möglich, da beim Auftragen der Sekundärantikörper eine Amplifikation stattfindet. Präsentiert werden die Ergebnisse nach Anzahl der verwendeten Fluorochrome. Zusätzlich erfolgt eine Gliederung hinsichtlich der verwendeten Filter bzw. Filtersysteme.

3.1. Einfachfluoreszenz

Die Aufnahmen der Einfachfluoreszenzen entstanden am Mikroskop Axioskop 2FS (Zeiss, Deutschland) mit Hilfe des Filters #40 (Zeiss, Deutschland), der es erlaubt die Fluorochrome FITC, AMCA, DAPI und Alexa 546 zu detektieren. Licht das vom Präparat reflektiert wurde und welches nicht spezifisch für das verwendete Fluorochrom war, wurde mit Hilfe eines Sperrfilters (Zeiss, Deutschland) herausgefiltert. Die Bildakquisition erfolgte mit einer Digitalkamera vom Typ Sony Cybershot DSC S75 (Sony, Japan). Beurteilt wurden einerseits die Einfachfluoreszenzen des jeweiligen Fluorochrom (z.B. FITC) und andererseits die DAPI Kernfärbung. Dies erfolgte in zwei getrennten Schritten: zuerst unter Verwendung der Sperrfiltereinstellung für die Fluorochromfarbe und anschließend unter der Sperrfiltereinstellung für DAPI. Die beiden Bilder wurden anschließend im Computer unter Zuhilfenahme des Programms Adobe Photoshop Elements 5.1 (Adobe, USA) digital übereinandergelagert. Für die Einfachmarkierung von CD44 mit DAPI war eine zweite Aufnahme nicht nötig, da beide Farben mit der selben Sperrfiltereinstellung sichtbar waren.

3.1.1. Einfachfluoreszenz von Fibronectin

Das Antigen Fibronectin wurde mit Primärantikörper HFN7.1 (DSHB, USA) markiert. Der Sekundärantikörper, an den das Fluorochrom Texas Red (Dianova, Deutschland) gekoppelt ist, bindet in einem zweiten Schritt an den Primärantikörper. Der Kern wurde mit DAPI-Kernfärbung markiert. Fibronectin weist intrazellulär ein granuläres und extrazellulär ein deutliches retikuläres Verteilungsmuster auf.

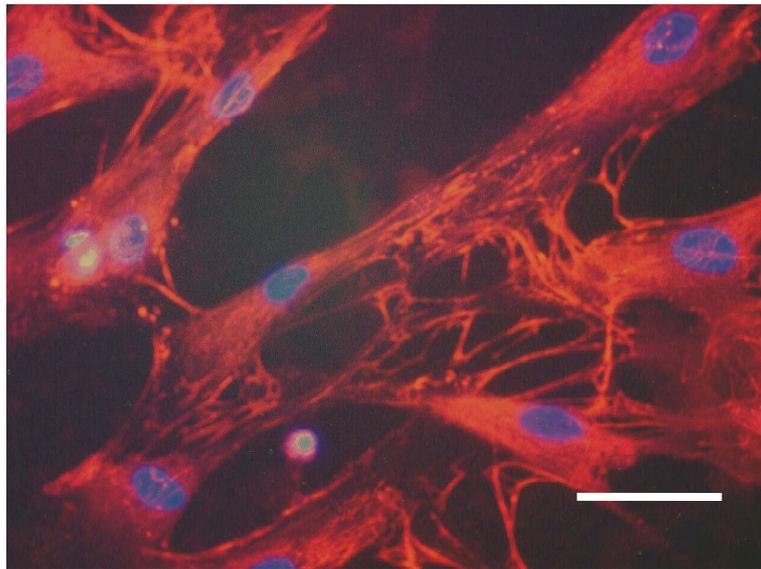


Abb 3.1: Immunzytochemische Markierung gegen Fibronectin, Sekundär-Antikörper Texas Red, DAPI-Kernfärbung, Balken 50 μ m

3.1.2. Einfachfluoreszenz von Kollagen IV

Das Antigen Kollagen IV wurde mit Primärantikörper Col IV (Southern Biotech, USA) markiert. Der Sekundärantikörper, an den das Fluorochrom Alexa 546 (Molecular Probes, Deutschland) gekoppelt ist, bindet in einem zweiten Schritt an den Primärantikörper. Der Kern wurde mit DAPI-Kernfärbung markiert.

Kollagen IV zeigt eine rein intrazelluläre, perinukleär jedoch deutlich granuläre Fluoreszenz. Die Zellen weisen dabei inhomogene Farbintensitäten auf.

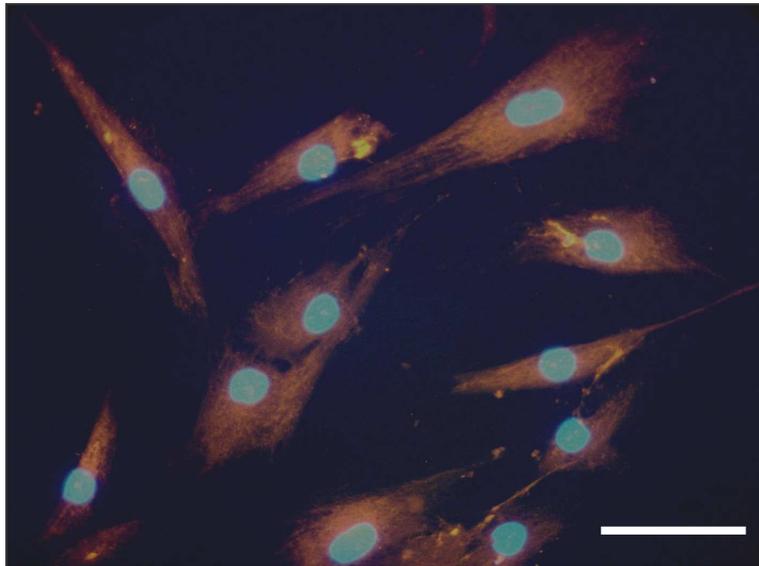


Abb. 3.2: Immunzytochemische Markierung gegen Kollagen IV, Sekundärantikörper Alexa 546, DAPI-Kernfärbung, Balken 50µm

3.1.3. Einfachfluoreszenz von Kollagen I

Das Antigen Kollagen I wurde mit Primärantikörper Col I (Chemicon, USA) markiert. Der Sekundärantikörper, an den das Fluorochrom FITC (Dianova, Deutschland) gekoppelt ist, bindet in einem zweiten Schritt an den Primärantikörper. Der Zellkern wurde mit einer DAPI-Kernfärbung detektiert.

Kollagen I zeigt intrazellulär ein granuläres Färbemuster und extrazellulär ein retikuläres Färbemuster. Alle Zellen färbten homogen an.

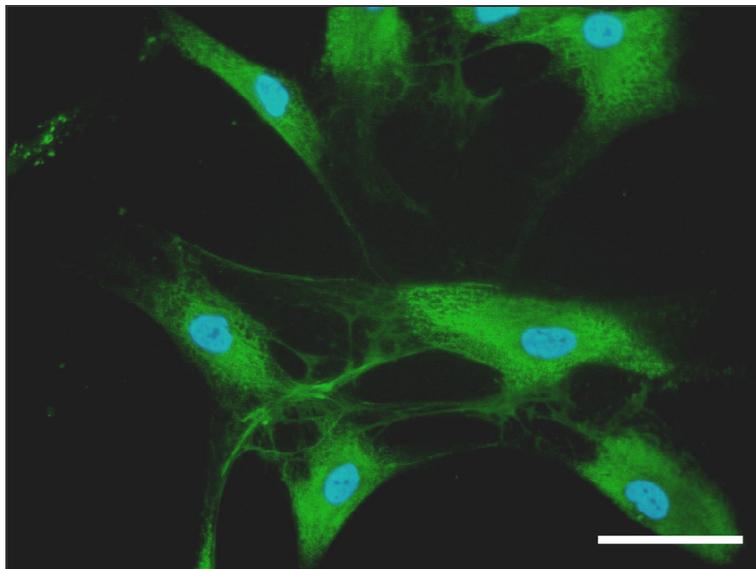


Abb.3.3: Immunzytochemische Markierung gegen Kollagen I, Sekundärantikörper FITC, DAPI-Kernfärbung, Balken 50µm

3.1.4. Einfachfluoreszenz von CD 44

Das Antigen CD 44 wurde mit Primärantikörper Hermes-1 (DSHB, USA) markiert. Der Sekundärantikörper, an den das Fluorochrom AMCA (Dianova, Deutschland) gekoppelt ist, bindet in einem zweiten Schritt an den Primärantikörper. Der Kern wurde mit DAPI-Kernfärbung markiert

CD 44 weist eine homogenen Verteilung mit Betonung der Zellmembran auf. Die Emissionswellenlänge von AMCA beträgt 444nm, die von DAPI 463nm. Das menschliche Augen nimmt Wellenlängenunterschiede aber erst von einer Differenz von mehr als 30nm wahr. Die Unterscheidung der Blautöne von AMCA und DAPI gelingt nicht auf Grund des Wellenlängenunterschiedes, sondern auf Grund des großen Intensitätsunterschiedes der beiden Farben.

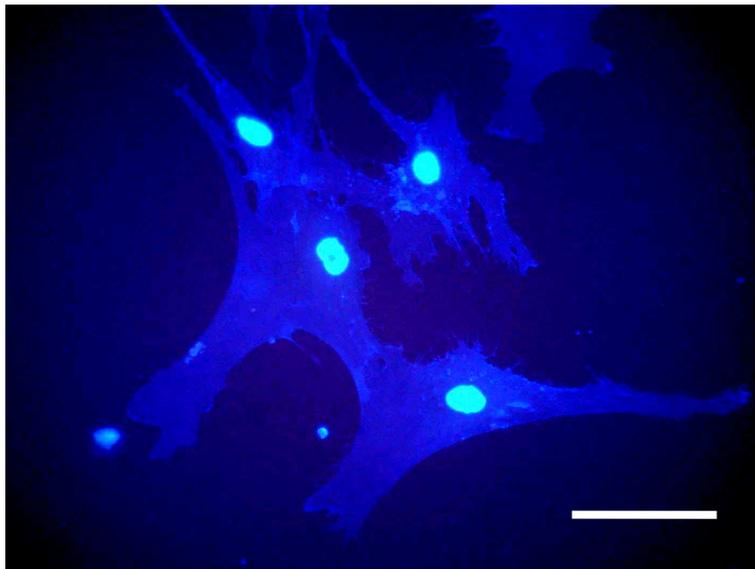


Abb 3.4: Immunzytochemische Markierung gegen CD 44, Sekundärantikörper AMCA, DAPI Kernfärbung, Balken 50µm

3.2. Zweifachfluoreszenz

Markiert wurden die Antigene Fibronectin mit Primärantikörper HFN7.1 (DHSB, USA) und Sekundärantikörper gekoppelt an Fluorochrom Texas Red (Dianova, Deutschland) (Abb. 3.6) sowie Kollagen I mit Primärantikörper Col I (Chemicon, USA) und Sekundärantikörper gekoppelt an Fluorochrom FITC (Dianova, Deutschland) (Abb. 3.7). Des weiteren wurde eine DAPI-Kernfärbung (Abb. 3.8) durchgeführt. Die Bildakquisition erfolgte mit dem Filter #40 (Zeiss, Deutschland) unter Verwendung der entsprechenden Sperrfiltereinstellung für rot, grün und blau. Die drei Aufnahmen der zwei Fluoreszenzen (Abb. 3.6, Abb. 3.7) und der Kernfärbung (Abb. 3.8) wurden anschließend im Computer mit Adobe Photoshop Elements 5.1 (Adobe, USA) digital überlagert (Abb. 3.5)

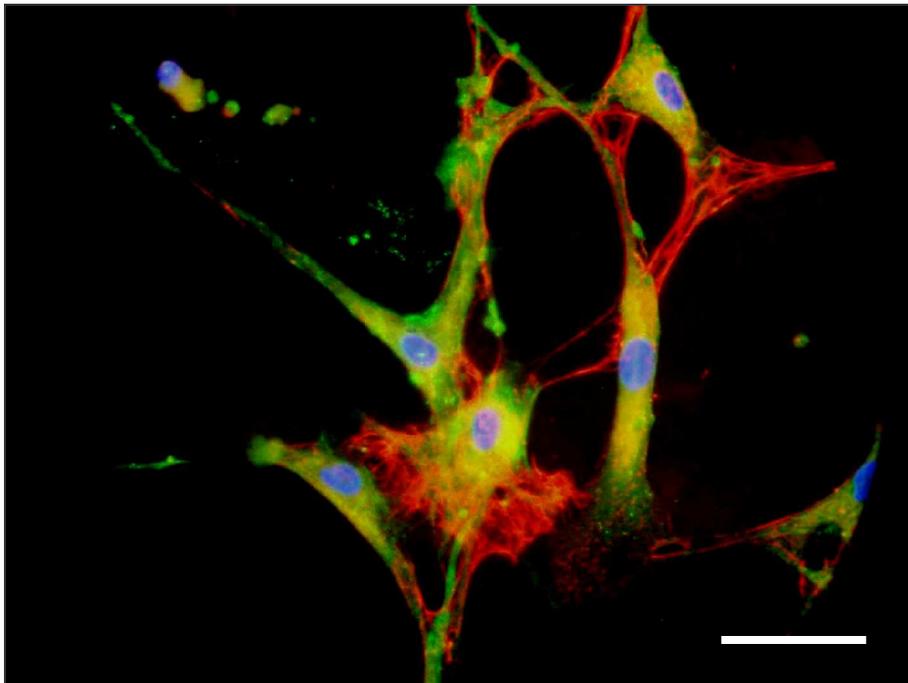


Abb 3.5: Zweifachfluoreszenz, digitale Überlagerung der Abb.3.10. – Abb.3.12.

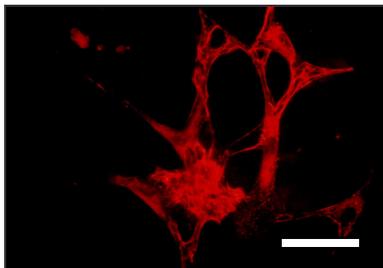


Abb. 3.6

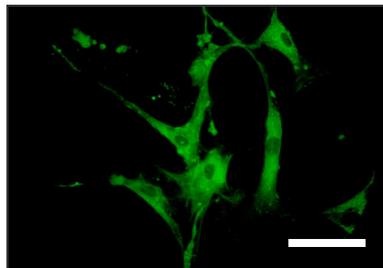


Abb. 3.7

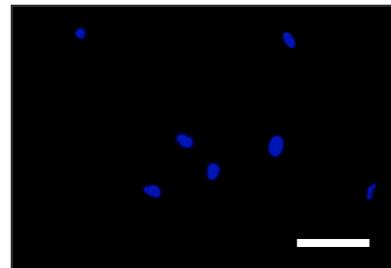


Abb. 3.8

Abb 3.6: Markierung gegen Fibronectin, Sekundärantikörper Texas Red; Abb 3.7: Markierung gegen Kollagen I, Sekundärantikörper FITC; Abb 3.8: DAPI-Kernfärbung; Abb.3.5-Abb.3.8: Balken 50µm

3.3. Dreifachfluoreszenz

Markiert wurden die folgenden Antigene:

- Fibronectin mit Primärantikörper HFN7.1 (DSHB, USA) und Sekundärantikörper gekoppelt an Fluorochrom Texas Red (Dianova, Deutschland) (Abb. 3.10)
- Kollagen I mit Primärantikörper Col I (Chemicon, USA) und Sekundärantikörper gekoppelt an Fluorochrom FITC (Dianova, Deutschland) (Abb. 3.11).
- CD 44 mit Primärantikörper Hermes-1 (DSHB, USA) und Sekundärantikörper gekoppelt an Fluorochrom AMCA (Dianova, Deutschland) (Abb. 3.12)

Zusätzlich erfolgte eine DAPI-Kernfärbung (Abb. 3.12). Die Bildaufnahmen entstanden mit Filter #40 (Zeiss, Deutschland) unter Verwendung der entsprechenden Sperrfiltereinstellungen. Die drei Einzelaufnahmen der Fluoreszenzen (Abb.3.10 - Abb. 3.12) und der Kernfärbung (Abb.3.12) wurden anschließend im Computer mit Adobe Photoshop Elements 5.1 (Adobe, USA) digital überlagert (siehe Abb. 3.9).

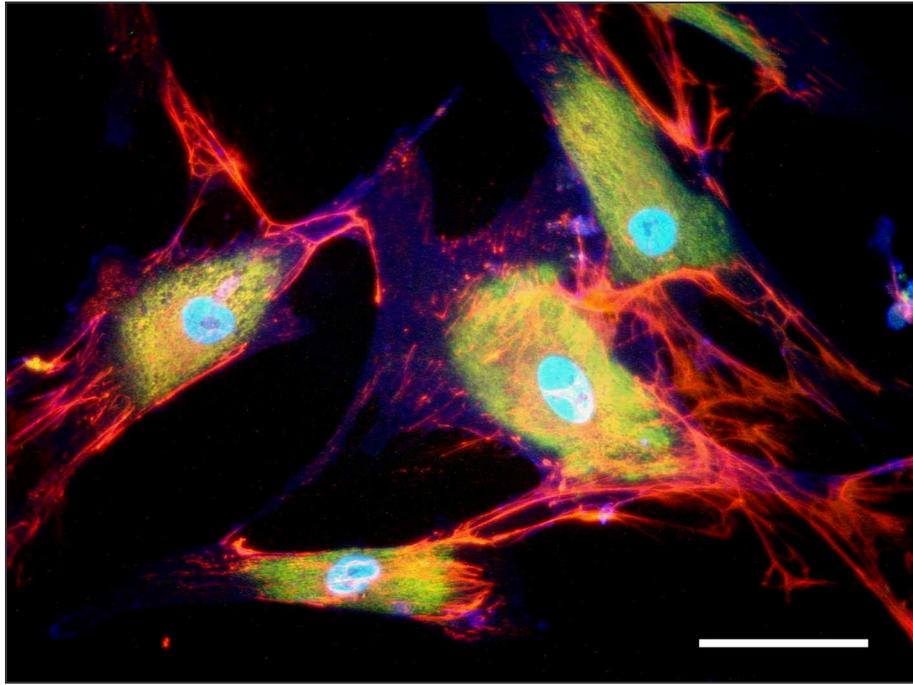


Abb 3.9: Dreifachfluoreszenz, digitale Überlagerung der Abb.3.10– Abb.3.12

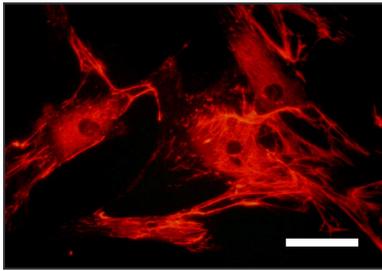


Abb 3.10

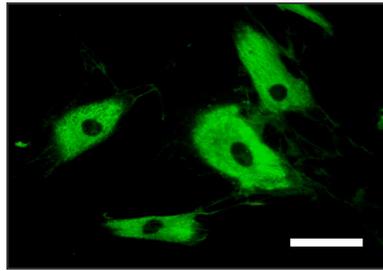


Abb 3.11

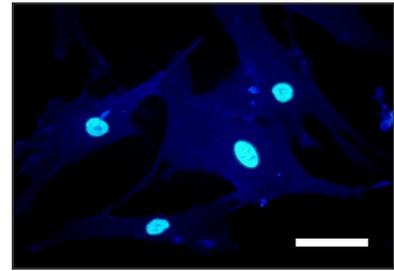


Abb 3.12

Abb 3.10: Markierung gegen Fibronectin, Sekundärantikörper Texas Red; Abb 3.11: Markierung gegen Kollagen I, Sekundärantikörper FITC; Abb 3.12: Markierung gegen CD 44, Sekundärantikörper AMCA, DAPI-Kernfärbung; Abb 3.9 - 3.12.: Balken 50µm

3.4. Vierfachfluoreszenz

3.4.1. Aufnahme mit AHF-Filter F61002 (Aufnahmen mit Digitalkamera)

Markiert wurden die folgenden Antigene:

- Fibronectin mit Primärantikörper HFN7.1 (DSHB, USA) und Sekundärantikörper gekoppelt an Fluorochrom Texas Red (Dianova, Deutschland)
- Kollagen I mit Primärantikörper Col I (Chemicon, USA) und Sekundärantikörper gekoppelt an Fluorochrom FITC (Dianova, Deutschland)
- CD 44 mit Primärantikörper Hermes-1 (DSHB, USA) und Sekundärantikörper gekoppelt an Fluorochrom AMCA (Dianova, Deutschland)
- Kollagen IV mit Primärantikörper Col IV (Southern Biotech, USA) und Sekundärantikörper gekoppelt an Fluorochrom Alexa 546 (Molecular Probes, Deutschland)

Die Zellkerne wurden mit einer DAPI-Kernfärbung detektiert. Die Vierfachfluoreszenz wurde am Mikroskop Axioskop (Zeiss, Deutschland) unter Verwendung des Tripelbandfilters F61002 (Firma AHF, Deutschland) und der Digitalkamera Sony Cybershot DSC S75 (Sony, Japan) ausgewertet. Da dieser Filter geeignet ist um Exzitations- und Emissionslicht im roten, grünen und blauen Bereich durchzulassen, war es unser Ziel, alle fünf Spektren gleichzeitig zu detektieren, ohne eine anschließende digitale Überlagerung der Bilder durchführen zu müssen.

Obwohl es sich um Vierfachfluoreszenz plus DAPI-Kernfärbung handelt (Abb. 3.13 und Abb. 3.14), ist eine eindeutige Diskriminierung der vier Fluorochromfarben nicht mehr möglich. Sichtbar sind die grüne Fluoreszenz FITC (Markierung von Kollagen I) und die rote Fluoreszenz Texas Red (Markierung von Fibronectin). Nicht mehr abgrenzbar sind hingegen die blaue Fluoreszenz AMCA (Markierung von CD44) und die orangefarbene Fluoreszenz Alexa 546 (Markierung von Kollagen IV). Besonders um den Zellkern kommt es zu einer starken Überlagerung aller Fluorochrome, so dass es zur Entstehung von Mischfarben, gemäß der additiven Farblehre, kommt.

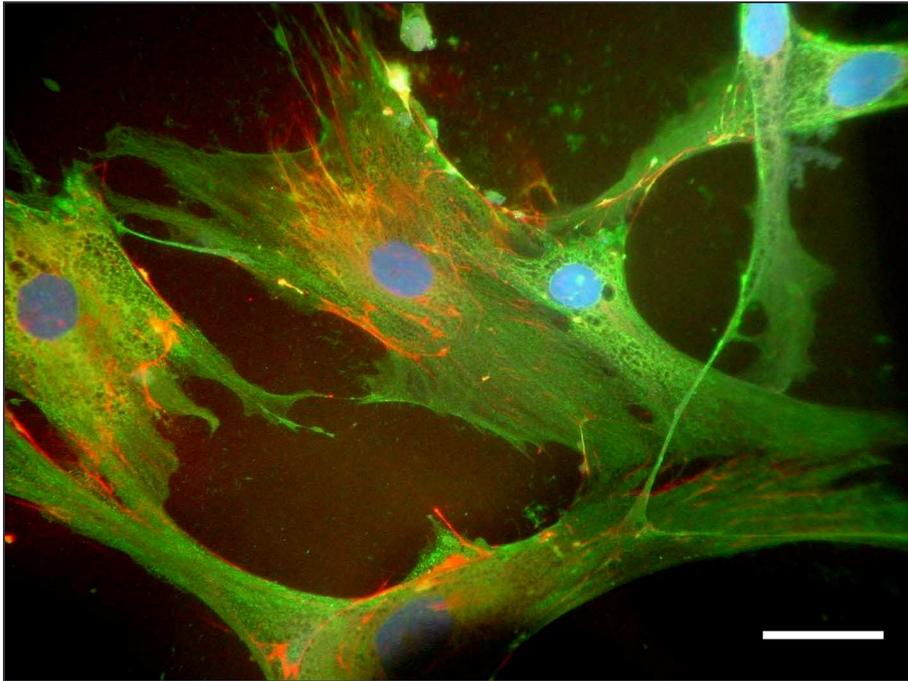
Vierfachfluoreszenz mit AHF-Filter F61002 (Aufnahmen mit Digitalkamera)

Abb 3.13: Vierfachimmunfluoreszenz gegen Fibronectin (Sekundärantikörper Texas Red), Kollagen I (Sekundärantikörper FITC), Kollagen IV (Sekundärantikörper Alexa 546) und CD 44 (Sekundärantikörper AMCA). DAPI-Kernfärbung; Balken 50 μ m; digitale Aufnahme mit AHF-Filter F61002. Mit bloßen Auge sind die Fluorochrome Texas Red (rot) und FITC (grün) zu sehen. Die Fluorochrome Alexa 546 (orange) und AMCA (blau) lassen sich hingegen nicht eindeutig ausmachen.

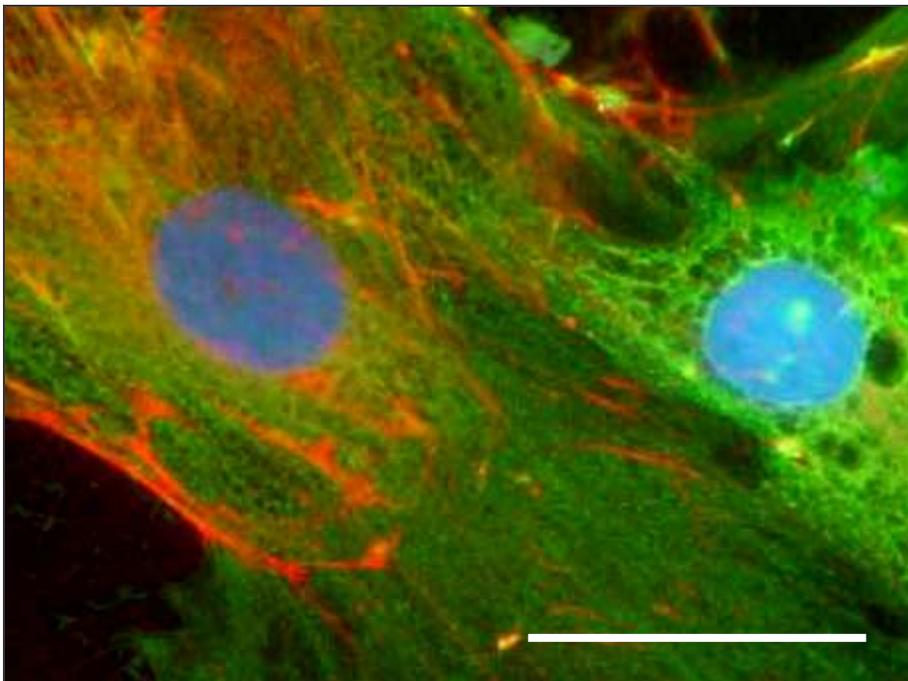


Abb. 3.14.: vergrößerter Ausschnitt aus Abb.3.13., Balken 50 μ m

3.4.2. Vierfachfluoreszenz aufgenommen mit Filter #01, #10, #15 (Digitalaufn.)

Da eine Auftrennung in die vier Fluorochromfarben unter Verwendung des Filter AHF 61002 nicht möglich war (Abb. 3.13), wurde derselbe Bildausschnitt mit spezifischen Filtern für jedes einzelne Fluorochrom analysiert. Diese bieten ein begrenztes Emissions- bzw. Exzitationswellenspektrum und eignen sich daher für eine filtergestützte Auftrennung der vier Fluorochrome. Filter #01 (Abb.3.21) bietet dabei eine Anregung im blauen, Filter #10 (Abb.3.20.) im grünen und Filter #15 (Abb.3.19.) im roten Bereich.

Die blaue Fluoreszenz von AMCA, die davor durch andere Fluorochrome überlagert war, ist nun sichtbar (Abb.3.21.). Die Abgrenzung zu DAPI beruht jedoch nach wie vor auf dem großen Intensitätsunterschied.

Eine Diskriminierung zwischen der roten Fluoreszenz von Texas Red und der orangefarbenen von Alexa 546 (Abb.3.19.) gelingt nicht.

Da die Emissionswellenlänge zwischen dem Fluorochrom Texas Red (613nm) und Alexa 546 (603nm) bzw. zwischen AMCA (444nm) und DAPI (463nm) weniger als 30nm beträgt, ist eine weitere Auftrennung mit filtergestützten Analyseverfahren und bloßem Auge nicht möglich.

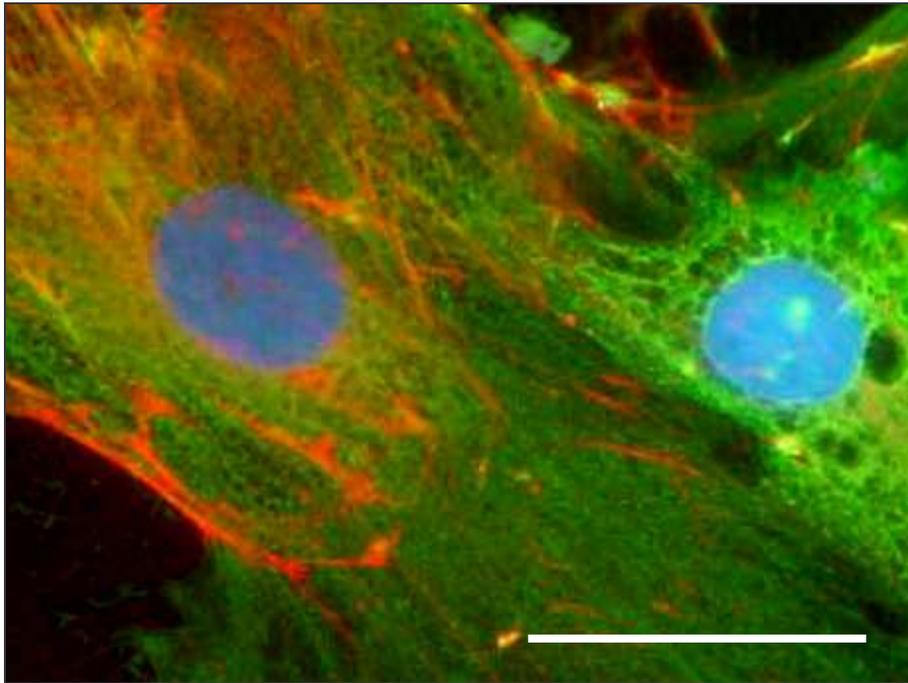
Vierfachfluoreszenz aufgenommen mit Filter #01, #10, #15 (Digitalaufn.)

Abb 3.15: Vierfachimmunfluoreszenz gegen Fibronectin (Sekundärantikörper Texas Red), Kollagen I (Sekundärantikörper FITC), Kollagen IV (Sekundärantikörper Alexa 546) und CD 44 (Sekundärantikörper AMCA). DAPI-Kernfärbung; Balken 50µm; digitale Aufnahme mit Filter F61002

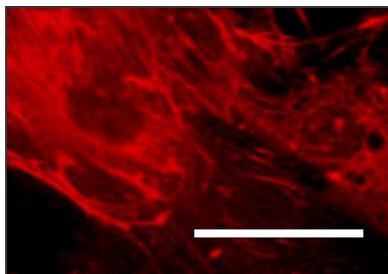


Abb 3.16

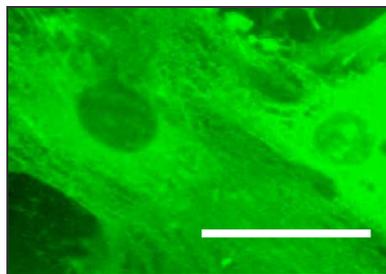


Abb 3.17

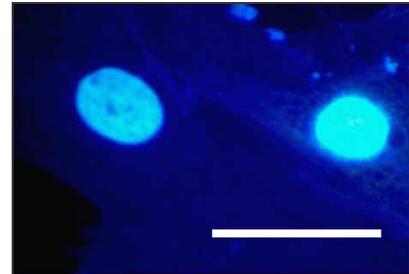


Abb 3.18

Abb 3.16: Filter #15, Markierung gegen Fibronectin (Sekundärantikörper Texas Red) und Kollagen IV (Sekundärantikörper Alexa 546). Differenzierung mit bloßem Auge nicht möglich; Abb 3.17: Filter #10, Markierung Markierung gegen Kollagen I, Sekundärantikörper FITC; Abb 3.18: Filter #01, Markierung gegen CD 44, Sekundärantikörper AMCA; Abb.3.16. – Abb.3.18.: Balken 50µm

3.4.3. Vierfachfluoreszenz mit AHF-Filter F61002 - Spektralanalyse

Um die Fluorochrome trotz ihrer geringen Wellenlängeunterschiede differenzieren zu können, wurde derselbe Bildausschnitt durch Spektralanalyse untersucht. Das System bestand aus Mikroskop Axioskop 2FS (Zeiss, Deutschland), AHF Filter F61002 (AHF, Deutschland), CCD-Kamera (Hamamatsu, Japan) und Sagnac Interferometer (ASI, Israel).

Im Vergleich zu der digitalen Aufnahme (Abb 3.13) bietet die spektrale Aufnahme (Abb 3.19) keine neuen Informationen. Um die vier Fluorochrome für das menschliche Auge sichtbar zu machen, wurde der Bildausschnitt mit Hilfe des Computerprogrammes SpectraView (ASI, Israel) analysiert, und die Fluorochromfarben durch Falschfarben ersetzt und einzeln dargestellt. Die verwendeten Farben haben dabei Wellenspektren, die für das menschliche Auge einfach aufzutrennen sind. Es wurden folgende Falschfarben verwendet:

- Fibronectin/ Texas Red: rot
- Kollagen IV/ Alexa 546: gelb
- Kollagen I/ FITC: grün
- CD 44/ AMCA: dunkelblau
- DAPI: hellblau

Erst die Einzeldarstellungen (Abb 3.20.–Abb 3.24) mit Falschfarben zeigen nach Analyse mit der Referenzbibliothek aus den Einfachfluoreszenzen, dass es sich um 5 unterschiedliche Fluorochrome handelt.

Bei näherer Betrachtung der Fluorochrome Alexa 546 (Abb 3.21) und Texas Red (Abb 3.20) sowie der zugehörigen Wellenspektren (Abb 3.25) fällt auf, dass eine Trennung der Farben nicht zufriedenstellend gelingt. Das Wellenspektrum von Alexa 546 ist im Vergleich zu Literaturangaben (603nm, ((Zeiss Deutschland 2006)) nach rechts, hin zu längeren Wellenspektren (620nm) verschoben. Dies macht eine Differenzierung zu Texas Red (620nm im Vergleich zur Literatur 613nm (Zeiss Deutschland 2006)) schwierig.

Auch bei AMCA (444nm, (Zeiss Deutschland 2006)) kommt es zu einer Verschiebung hin zu längeren Wellenspektren (460nm), was eine Auftrennung zu DAPI (463nm) behindert. Die Analyse der blauen Fluoreszenz gelingt mit diesem Filter nicht.

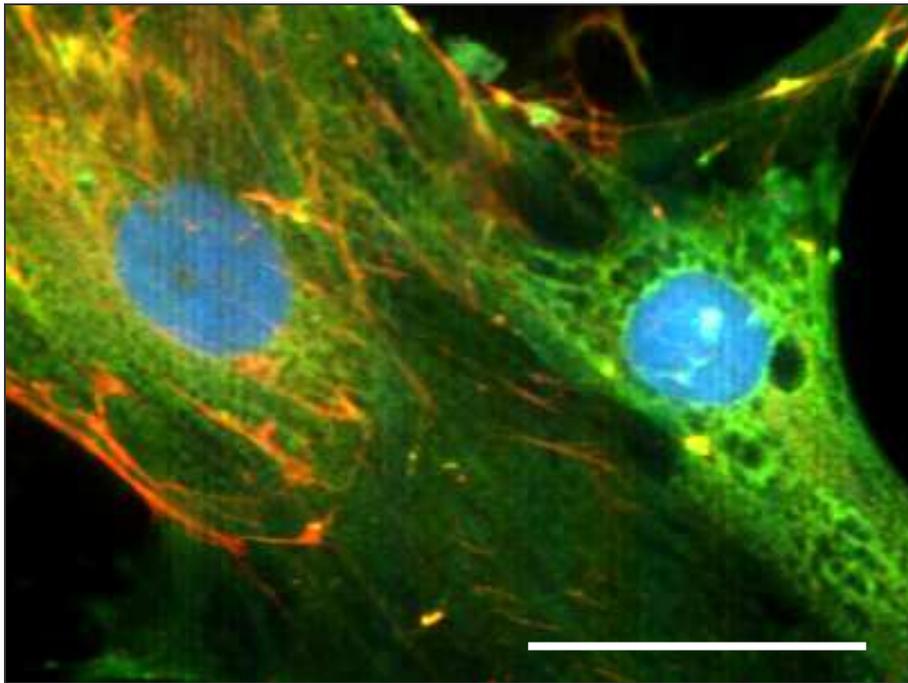


Abb 3.19.: Vierfachfluoreszenz, mit AHF-Filter 61002, spektrale Überlagerung

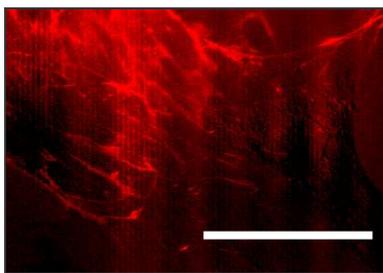


Abb 3.20

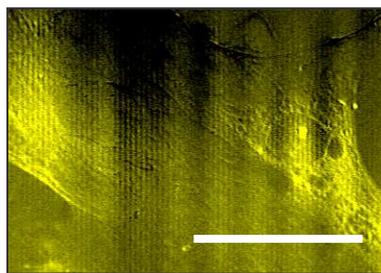


Abb 3.21

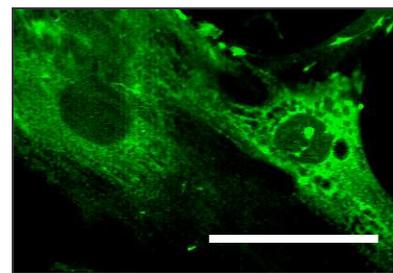


Abb 3.22

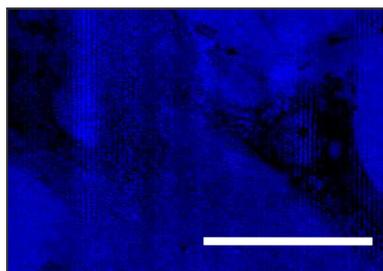


Abb 3.23

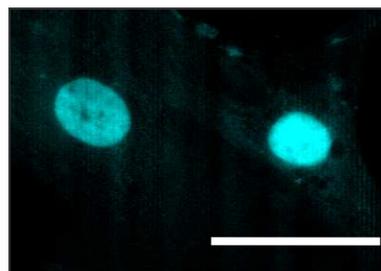


Abb 3.24

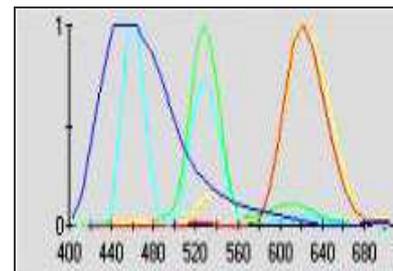


Abb 3.25

Abb 3.20: Markierung gegen Fibronectin, Sekundärantikörper Texas Red, Falschfarbe rot; Abb 3.21: Markierung gegen Kollagen IV, Sekundärantikörper Alexa 546, Falschfarbe gelb; Abb 3.22: Markierung gegen Kollagen I, Sekundärantikörper FITC, Falschfarbe grün; Abb 3.23: Markierung gegen CD 44, Sekundärantikörper AMCA, Falschfarbe dunkelblau; Abb 3.24: DAPI – Kernfärbung, Falschfarbe hellblau; Abb 3.25: Wellenspektren aller fünf detektierten Fluorochrome; Abb.3.19 – Abb.3.24: Filter AHF 61002, Balken 50µm

3.4.4. Vierfachfluoreszenz aufgenommen mit Filter SKY (Spektralaufnahme)

Um eine Auftrennung von Alexa 546 und Texas Red zu ermöglichen, wurde eine weitere Aufnahme mit dem Trippelbandfilter SKY (ASI, Israel) für grüne, rote und infrarote Spektren erstellt. Dazu wurde verwendet: Mikroskop Axioskop 2FS (Zeiss, Deutschland), Trippelbandfilter SKY (ASI, Israel), CCD-Kamera (Hamamatsu, Japan), Sagnac Interferometer SpectraCube (ASI, Israel) und Computerprogramm SpectraView (ASI, Israel). Es wurden die schon zuvor verwendeten Falschfarben zugeordnet.

Die beiden Fluorochrome Texas Red und Alexa 546 lassen sich mit dem SKY Filter deutlich differenzieren. Lokalisation und Verteilungsmuster entsprechen denen der Einzelfärbungen (Abb 3.1 – Abb 3.2).

Das Wellenspektrum von Alexa 546 (Abb 3.30) liegt jetzt bei 600nm und das Wellenspektrum von Texas Red bei 610nm. Dies entspricht den Literaturangaben (Zeiss Deutschland 2006) und ermöglicht eine exakte Differenzierung der beiden Fluorochrome.

Die grüne Fluoreszenz FITC (Abb 3.29) zeigte die erwartete Färbung, Lokalisation und das erwartete Wellenspektrum; 522nm im Vergleich zur Literatur von 517nm (Zeiss Deutschland 2006).

Eine Analyse von AMCA und DAPI ist auf Grund der Exzitations- und Emissionswellenlängen dieses Filters nicht möglich.

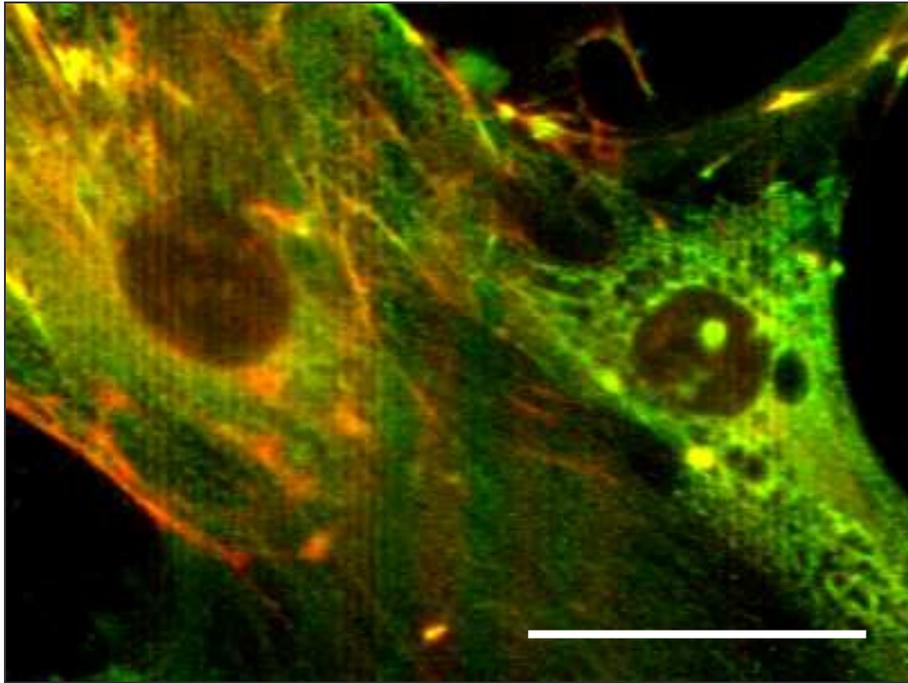


Abb 3.26: Vierfachfluoreszenz mit Filter SKY, spektrale Überlagerung

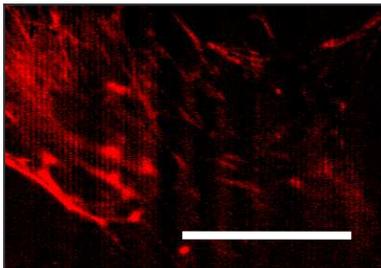


Abb 3.27

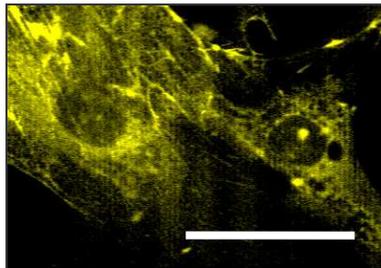


Abb 3.28

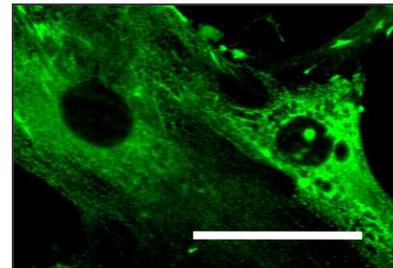


Abb 3.29

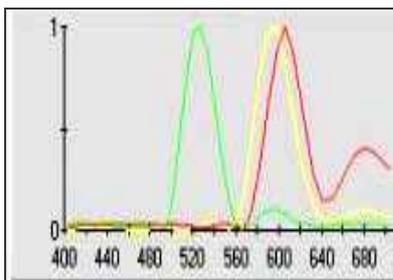


Abb 3.30

Abb 3.27: Markierung gegen Fibronectin, Sekundärantikörper Texas Red, Falschfarbe rot; Abb 3.28: Markierung gegen Kollagen IV, Sekundärantikörper Alexa 546, Falschfarbe gelb; Abb 3.29: Markierung gegen Kollagen I, Sekundärantikörper FITC, Falschfarbe grün; Abb 3.30: Wellenspektren aller drei detektierten Fluorochrome; Abb.3.26 – Abb.3.29: Filter SKY, Balken 50µm

3.4.5. Vierfachfluoreszenz aufgenommen mit Filter #01 (Spektralaufnahme)

Zur Darstellung von CD44 und DAPI wurde eine weitere Aufnahme unter Verwendung des Filters #01 (Zeiss, Deutschland) erstellt. Das System bestand aus Mikroskop Axioskop 2FS (Zeiss, Deutschland), Filter #01 (Zeiss, Deutschland), CCD-Kamera (Hamamatsu, Japan), Sagnac Interferometer SpectraCube (ASI, Israel) und Computerprogramm SpectraView (ASI, Israel).

Nach spektraler Analyse und Zuweisung von Falschfarben zeigten sich die gewünschten Ergebnisse. Sowohl AMCA als auch DAPI zeigen die aus Einzelfärbungen bekannten Lokalisationen und Verteilungsmuster. Das Wellenspektrum von AMCA lag dabei bei 450nm (Literatur: 444nm (Zeiss Deutschland 2006) und das von DAPI bei 470nm (Literatur: 463nm (Zeiss Deutschland 2006)). Diese Differenz ist ausreichend zur computergestützten Separation.

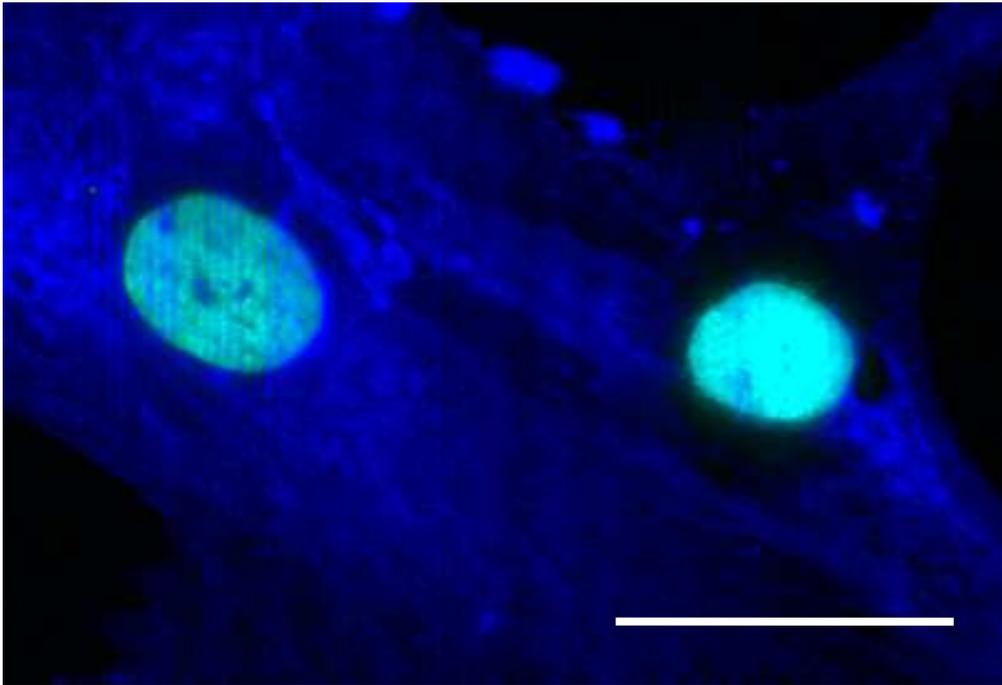


Abb 3.31: Vierfachfluoreszenz, mit Filter #01, spektrale Überlagerung

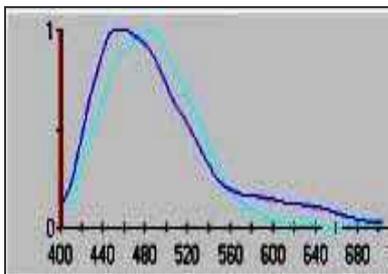


Abb 3.32

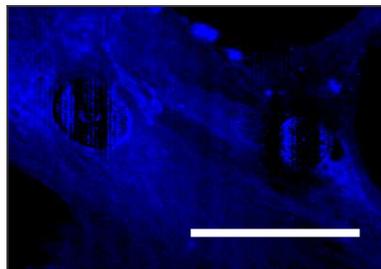


Abb 3.33

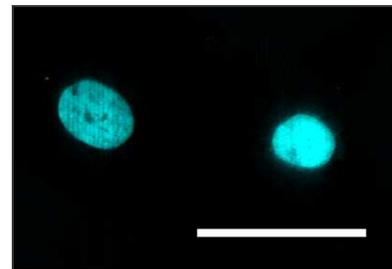


Abb 3.34

Abb 3.25: Wellenspektren der beiden detektierten Fluorochrome; Abb 3.33: Markierung gegen CD 44, Sekundärantikörper AMCA, Falschfarbe dunkelblau; Abb 3.34: DAPI – Kernfärbung, Falschfarbe hellblau;; Abb.3.31, Abb 3.33, Abb 3.34: Filter #01, Balken 50 μ m

3.4.6. Übersichtstafel aller Spektralaufnahmen mit Filter SKY und Filter #01

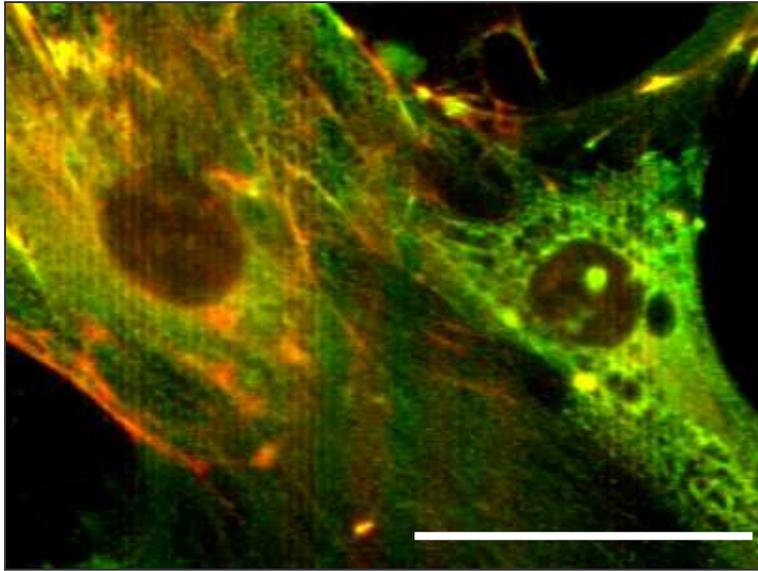


Abb 3.35

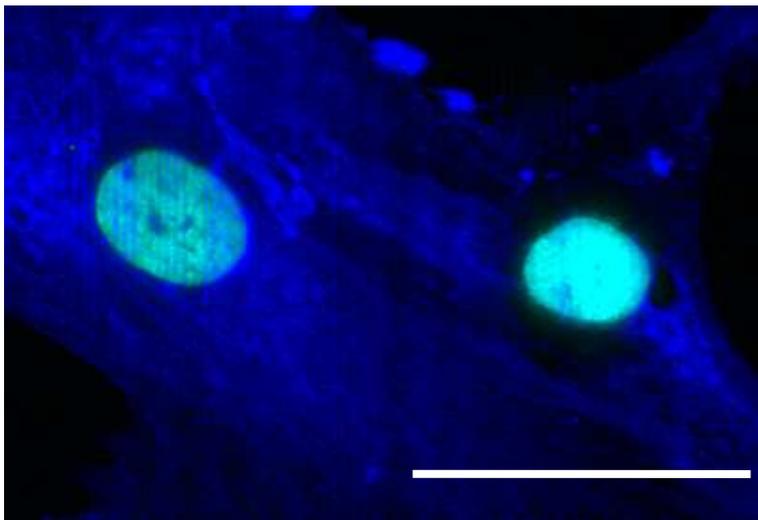


Abb 3.36

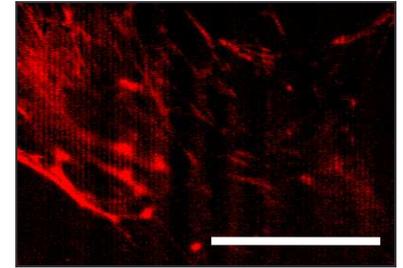


Abb.3.37

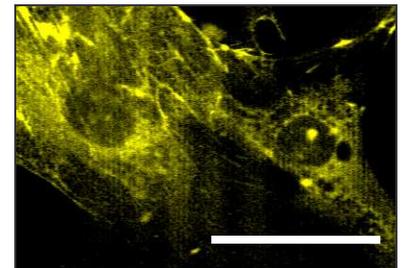


Abb 3.38

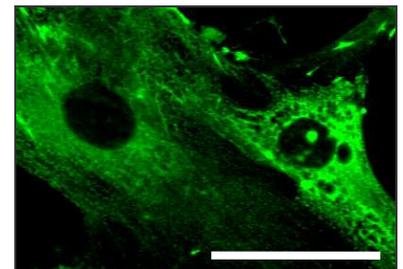


Abb 3.39

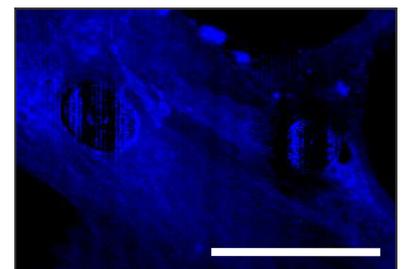


Abb 3.40

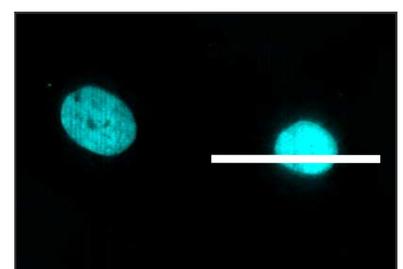


Abb 3.41

Abb 3.35: Vierfachfluoreszenz mit Filter SKY, spektrale Überlagerung;
 Abb 3.36: Vierfachfluoreszenz mit Filter #01, spektrale Überlagerung;
 Abb 3.37 – Abb 3.39: Filter SKY; Abb 3.37: Markierung gegen Fibronectin, Sekundärantikörper Texas Red, Falschfarbe rot;
 Abb 3.38: Markierung gegen Kollagen IV, Sekundärantikörper Alexa 546, Falschfarbe gelb; Abb 3.39: Markierung gegen Kollagen I, Sekundärantikörper FITC, Falschfarbe grün; Abb 3.40 – Abb 3.41: Filter #01; Abb 3.40: Markierung gegen CD 44, Sekundärantikörper AMCA, Falschfarbe dunkelblau; Abb 3.41: DAPI – Kernfärbung, Falschfarbe hellblau; Abb.3.35 – Abb.3.41: Balken 50µm

4. Diskussion

4.1. Identifikation von mesenchymalen Stammzellen

Mesenchymale Stammzellen sind eine der interessantesten adulten Stammzellen. Sie können einfach isoliert, kultiviert und manipuliert werden. Dies macht sie besonders interessant für *tissue engineering* und Zelltherapie (Gangji et al. 2004; Chen et al. 2004; Zhang et al. 2004; Fuchs et al. 2003). Die aus dem Knochenmark isolierten Zellen sind jedoch keineswegs eine homogene Zellpopulation, sondern vielmehr ein heterogenes Zellgemisch mit Unterpopulationen, welche morphologisch als auch immunzytochemisch unterschieden werden können (Vogel et al. 2003; Hung et al. 2002; Colter et al. 2001; Conget et al. 2001). Diese Heterogenität hat nicht nur zu einer Vielzahl an Namen geführt, sondern auch, je nach Arbeitsgruppe, zu unterschiedlichen phänotypischen Eigenschaften. Kultivierte hMSC sind in der Vergangenheit ausführlich analysiert worden, sowohl morphologisch als auch in Hinsicht auf Oberflächen- oder molekulare Marker. Bisher war jedoch keiner dieser Ansätze ausreichend, um diese Zellen adäquat zu definieren, sprich eindeutig von anderen Differenzierungsstufen oder Zelltypen abzugrenzen (Beyer and da Silva 2006). Die gängigste Definition ist daher nach wie vor ihre Fähigkeit zur Selbstreplikation und ihre Differenzierbarkeit in Zelltypen der mesenchymalen Reihe (Kogler et al. 2004; Niemeyer et al. 2004). Dafür werden die Zellen unter Verwendung etablierter Protokolle und spezifischer Medien zu Osteoblasten, Chondroblasten und Adipozyten ausdifferenziert und nachgewiesen (Pittenger et al. 1999). Die kultivierten Zellen weisen dabei große Unterschiede in ihrer Differenzierbarkeit auf. Standardanalysen nach Ausdifferenzierung zeigen ein pluripotentes Verhalten, wobei die Zellen entweder tri-potent (osteogene, adipogene und chondrogene Differenzierbarkeit) (De Ugarte et al. 2003) oder sogar multipotent (hepatogene, neurale Differenzierbarkeit) (Anjos-Afonso et al. 2004) sind. Klonale Analysen der gleichen Zellen ergaben hingegen, daß nur ein Drittel aller Zellen pluripotent sind, während der Großteil über uni- bzw bi-potente Differenzierbarkeit verfügt (Muraglia et al. 2000; Digirolamo et al. 1999). Um jedoch hMSC für *tissue engineering* nutzen zu können, müssen sie ohne Ausdifferenzierung charakterisiert werden und multipotente Zellen müssen zuverlässig identifiziert werden können.

Ausführliche Untersuchungen wurden durchgeführt, um ein spezifisches Profil ihrer Genexpression zu erstellen. Dabei wurden Veränderungen in der Genexpression im Verlauf der Differenzierung in Richtung der osteogenen (Doi et al. 2002), chondrogenen (Qi et al. 2003; Sekiya et al. 2002) und adipogenen Reihe (Sekiya et al. 2004; Nakamura et al. 2003) analysiert. Andere Forschungsgruppen untersuchten verschiedene Populationen von hMSC auf Unterschiede in ihrem Genprofil (Lee et al. 2004b; Jiang et al. 2002b; Majumdar et al. 1998). Ein neuerer Ansatz ist die Erstellung von DNA-Microarrays, die die RNA Menge bestimmter Gene nachzuweisen. Die Gruppe um Wagner hat hierbei ausführlich die Genexpression von hMSC aus verschiedenen Quellen (Knochenmark, Fettgewebe und Nabelschnur) und ausdifferenzierten Fibroblasten untersucht. Auch diese Studie konnte keine eindeutigen Kriterien für die Identifizierung von hMSC festlegen (Wagner et al. 2005). Den oben genannten Verfahren ist gemeinsam, dass sie eine Zellpopulation als Ganzes analysieren, sprich die Zellen lysieren und homogenisieren. Nachteilig ist hierbei, dass heterogene Zellpopulationen wie hMSC nicht weitergehend analysiert werden können. Es können keine Aussagen auf Einzelzellebene oder gar über die Lokalisation von Antigenen getroffen werden.

Ein weiterer Ansatz zur Analyse besteht in der unterschiedlichen Morphologie dieser Zellen. Wie in der Literatur beschrieben fanden sich in unseren Zellkulturen große, flache und lange, spindelförmige Zellen (D'Ippolito et al. 2004; Pittenger and Martin 2004; Hung et al. 2004). Die funktionelle Bedeutung dieser unterschiedlichen Zelltypen ist nach wie vor unklar.

Ein seit vielen Jahren etabliertes Verfahren ist der Versuch, hMSC über die Markierung von Oberflächenantigenen zu definieren. Ein spezifischer Marker, wie er für hämatopoetische Stammzellen in Form von CD 34 etabliert ist (Morrison and Weissman 1994; Buckner et al. 1970), konnte bisher nicht identifiziert werden (Sekiya et al. 2002; Gronthos et al. 2001b). Daher wurde versucht, über Markierung mehrerer Oberflächenmarker ein Antigenprofil zu erstellen. Eine große Anzahl von Markern wurden bisher auf mesenchymalen Stammzellen beschrieben (Otto and Rao 2004), unter anderem CD44, CD29, CD 90 und CD 105 (Javazon et al. 2004; Tocci and Forte 2003; Deans and Moseley 2000). Spezifische Antigene für hMSC sind auch die Marker Stro-1, SH2, SH3 und SH4 (Barry and Murphy 2004). Keiner dieser Marker ist jedoch nach bisherigem Stand des Wissens ein spezifischer Parameter für den Nachweis der Homogenität einer Zellkultur von hMSC (Beyer and da Silva

2006). Selbst die simultane Analyse von 22 Oberflächenmarkern durch *flow cytometry* war ungeeignet, um hMSC zuverlässig von Fibroblasten abzugrenzen (Wagner et al. 2005).

Daher wurde in unserer Arbeit mit der immunocytochemischen Vielfachfärbung ein Verfahren verwendet, das einerseits durch Markierung mehrerer Antigene in der Lage ist, ein Färbeprofil zu erstellen und andererseits eine Beurteilung der Zellen auf Einzelzellebene ermöglicht, um die Heterogenität dieser Zellen besser zu verstehen. Damit kann sowohl die Lokalisation und das Verteilungsmuster eines Antigens auf einer Zelle als auch heterogenes Färbeverhalten innerhalb einer Kultur analysiert werden. All diese Eigenschaften sind entscheidend für die Identifikation der Zellen mit dem größten Differenzierungs- und Replikationspotential.

Bisher wurden auf hMSC lediglich Einfachmarkierungen bzw. der gleichzeitige Nachweis von zwei Antigenen mittels Immunfluoreszenz beschrieben (Jiang et al. 2002a). Mehrfachmarkierungen von hMSC sind aus mehreren Gründen schwierig durchzuführen. Der wichtigste Grund ist sicherlich das unspezifische Expressionsprofil der hMSC, das sich aus mesenchymalen, endothelialen, epithelialen und muskulären Anteilen zusammensetzt (Sekiya et al. 2002; Minguell et al. 2001).

4.2. Verwendete Zellen

Da hMSC über keinen spezifischen Oberflächenmarker verfügen, ist die gebräuchlichste Isolierungsmethode die Gewinnung aus Knochenmarksaspiraten gesunder Spender. Für die selektive Isolierung werden die Zellen gewaschen, gezählt, in Medium resuspendiert und in Kulturschalen aufgebracht. Nicht adhärierte Zellen werden nach 24-72 Stunden durch Entfernen des Mediums abgenommen. Mesenchymale Stammzellen werden dabei über ihre Fähigkeit definiert, auf Plastikoberflächen zu adhären (Javazon et al. 2004; Muraglia et al. 2000). hMSC können in ausreichender Anzahl auch aus dem Fettgewebe oder aus Nabelschnurblut gewonnen werden (Lu et al. 2006; Kogler et al. 2004; Bieback et al. 2004; Zuk et al. 2002). Verschiedene Verfahren wurden entwickelt, um den Anteil von mesenchymalen Stammzellen in den Kulturen zu erhöhen, unter anderem durch Entfernen von hämatopoetischen Kontaminationen. CD 34-, CD 45- und CD 11b-positiven Zellen werden dabei durch Immun-Depletion herausgefischt (Ortiz et al.

2003; Baddoo et al. 2003). Andere Verfahren beinhalten eine Größenselektion durch 3 µm große Filter (Tuli et al. 2003; Hung et al. 2002) oder Variierung der Zelldichte in Kultur (Sekiya et al. 2002; Colter et al. 2001). Mit keiner dieser Methoden ist es jedoch gelungen, homogene Zellkulturen zu erhalten, so dass bis heute kein standardisiertes Verfahren für die Gewinnung von hMSC existiert. Der Vergleich von Studien, die unterschiedlich gewonnene Zellen verwenden, ist daher nur begrenzt möglich. Daher wurden in dieser Studie kommerziell erhältliche Zellen verwendet. Dies bietet den Vorteil, dass die Zellen nach etablierten Verfahren gewonnen werden und einen möglichst großen Anteil hMSC enthalten (Pittenger et al. 1999).

Kulturbedingungen für mesenchymale Stammzellen sollten idealerweise dieselben sein, wie in ihrer Mikroumgebung im Knochenmark, damit sie ihre Fähigkeit zur Selbstreplikation und ihre Differenzierbarkeit behalten. Die Fähigkeit zur Selbstreplikation kann in unterschiedlichen Kulturbedingungen sehr variieren, sollte aber mindestens 40 Verdopplungen der Population erreichen, bevor ihre Wachstumsrate sich deutlich verlangsamt (Bianco et al. 2001; Bruder et al. 1997)

Diese kann durch Zugabe von Wachstumsfaktoren oder Verringerung der Zelldichte in Kultur beeinflusst werden (Bianchi et al. 2003; Colter et al. 2001). Kulturmedien variieren je nach Forschungsgruppe, das auch von uns verwendete *Dulbecco's modified Eagle medium* ist aber sicherlich das etablierteste Medium für hMSC (Otto and Rao 2004). Darüberhinaus können durch Zugabe von Wachstumsfaktoren die phänotypischen Charakteristika der Zellen deutlich beeinflusst werden. Es wird postuliert, dass dies ein wichtiger Faktor für die Heterogenität der Zellen in Kultur ist (Jiang et al. 2002b). Um möglichst reproduzierbare und vergleichbare Zellkulturbedingungen zu erhalten, hielten wir uns an die Vorgaben des Hersteller bezüglich Medium und Zusätze (Pittenger et al. 1999).

4.3. Verwendete Marker

Mesenchymale Stammzellen im Knochenmark produzieren Extrazellulärmatrixkomponenten und Wachstumsfaktoren, die eine wichtige Rolle für die Hämatopoese spielen. Matrixproteine in dieser Mikroumgebung sind unter anderem Fibronectine, Kollagene, Vitronectin und verschiedene Stammzellwachstumsfaktoren. Die in dieser Studie verwendeten Marker sollten dabei zum etablierten phänotypischen Profil dieser Zellen gehören. Die Auswahl an

geeigneten Markern unterliegt jedoch vielen Einschränkungen. So gilt zum Beispiel STRO-1 als selektiverer Marker für hMSC (Gronthos et al. 1994). STRO-1 bindet an ein Trypsin-resistentes Oberflächenantigen, das von einer begrenzten Anzahl an Zellen in Kultur exprimiert wird. Einige Forschungsgruppen verwenden Selektionsverfahren für STRO-1 positive Zellen, um die Anzahl an hMSC in Kultur zu erhöhen (Stewart et al. 2003; Gronthos et al. 1994). Allerdings verlieren mesenchymale Zellen nach Oberflächenadhärenz weitestgehend die Expression dieses Antigens (Gronthos et al. 1994). Damit ist dieser Marker für die von uns verwendete Markierung von Zellen in Kultur ungeeignet. Andere Antigene werden in so geringer Anzahl von hMSC exprimiert, dass sie mit Immunfluoreszenz nur schwer nachzuweisen sind. So war in Vorversuchen die Immunfluoreszenzmarkierung des Proteins LCAM so schwach, dass sie für weitere Analysen ungeeignet war.

Die vier in dieser Studie detektierten Antigene Kollagen I, Kollagen IV, Fibronectin und CD44, gehören zum typischen Expressionsprofil von hMSC, sind aber einzeln für sich betrachtet nicht spezifisch. Wichtig bei der Auswahl der Marker war die Kombination aus Oberflächenmarkern und Extrazellulärmatrixkomponenten. Jedes der vier verwendeten Antigene besitzt ein typisches Verteilungs- und Färbemuster, so dass eine deutliche optische Unterscheidbarkeit gegeben war, bzw. die Vierfachfärbung gegen die Kontroll-Einfachfärbungen abgeglichen werden konnte.

Fibronectin wird von hMSC in großer Menge synthetisiert (Wagner et al. 2005; Vogel et al. 2003). Es ist am Aufbau der Extrazellulärmatrix beteiligt und vermittelt die Haftung an Kollagene und Proteoglykane (Sottile and Hocking 2002). Dies bestätigte sich in unseren Färbungen durch seine Präsenz in der Extra- und Intrazellulärmatrix.

Kollagen I gehört zur Gruppe der fibrillären Kollagene und wird exprimiert, sobald die Zellen auf einer Oberfläche adhären (Wexler et al. 2003; Shur et al. 2002; Zohar et al. 1997). Bei der Beurteilung von Kollagen I ergibt sich folgendes: Das Antigen weist innerhalb der Zelle ein granuläres und außerhalb der Zelle ein retikuläres Färbemuster auf. Ersteres spricht dafür, dass das Antigen vom Golgi-apparat sezerniert wird, zweiteres hingegen dafür, dass es an der Bildung einer Extrazellulärmatrix beteiligt ist. Kollagen IV ist ein netzbildendes Kollagen und ist an der Bildung von Basalmembranen beteiligt. Wir konnten es, wie erwartet, im Intra- und Extrazellulärraum nachweisen. Kollagen IV kann nur in hMSC und frühen Vorläuferstufen nachgewiesen werden. Ausdifferenzierte Zellen hingegen exprimieren Kollagen IV nicht mehr (Deschaseaux and Charbord 2000; Chichester et

al. 1993). Damit können undifferenziertere von differenzierteren Stadien abgegrenzt werden. Färben nicht alle Zellen homogen, wie wir es bei Kollagen IV beobachteten, kann dies ein Hinweis auf unterschiedlich differenzierte Zellen sein und kann genutzt werden, um verschiedene Vorläuferstufen voneinander abzugrenzen. CD44, ein Oberflächenmarker, ist ein Rezeptor für Hyaluronsäuren und Osteopontin (Pittenger et al. 1999). Die von uns gefärbten Zellen wiesen, wie in der Literatur beschrieben (Knudson 2003), eine gleichmäßige Markierung der Zelloberfläche auf. Auch CD 44 wird von hMSC erst exprimiert, wenn die Zellen auf einer Oberfläche adhärieren (Wexler et al. 2003; Shur et al. 2002).

Obwohl jeder dieser Marker auch von anderen Zellen exprimiert wird, repräsentiert die gleichzeitige Expression aller vier Marker das typische Antigenprofil von humanen mesenchymalen Stammzellen. Vor allem das heterogene Expressionsmuster für Kollagen IV weist darauf hin, dass nur ein Teil der Population aus hMSC und frühen Differenzierungsstufen besteht. Eine weitergehende Spezifizierung des Antigenprofils und die Verwendung von zusätzlichen Markern, könnten hier helfen, hMSC von differenzierteren Zellen abzugrenzen.

4.4. Immunfluoreszenz

Immunfluoreszenz ist eine seit langem etablierte Methode, um Antigene auf Zellen nachzuweisen und wurde erstmalig 1941 von Albert Coons angewendet (Coons et al. 1941). Über lange Jahre war dabei FITC das einzige erhältliche Fluorochrom. Erst durch die Entdeckung von weiteren Fluorochromen 1957 wurde die gleichzeitige Markierung mehrerer Antigene überhaupt möglich (Silverstein 1957). Mehrfachfärbungen werden dabei durch 2 Faktoren limitiert. Das erste Hindernis sind die Fluorochromspektren, die durch Band-Filter in Exzitations- und Emissions-Wellenlängen aufgetrennt werden müssen. Wenn Wellenlängen überlappen, wie es häufig bei Verwendung mehrerer Fluorochrome vorkommt, wird die Diskriminierung zwischen den Signalen der einzelnen Fluorochrome sehr schwierig (Wahlby et al. 2002). Der zweite limitierende Faktor ist die Verfügbarkeit von Primärantikörpern unterschiedlicher Herkunft. Der Großteil der kommerziell erhältlichen Antikörper wird in Mäusen oder Kaninchen hergestellt, was die Kombination von Primärantikörpern limitiert (Wahlby et al. 2002). Verschiedene Ansätze wurden daher entwickelt, um das Fehlen von adäquaten Primärantikörpern zu überkommen. So können zwei

Primärantikörper aus der gleichen Spezies verwendet werden, wenn in einem Zwischenschritt freie FAB-Fragmente der Primärantikörper blockiert werden. Nach einem ersten Färbeschritt mit Primär- und Sekundärantikörper werden die Zellen mit Serum inkubiert, das unspezifisch gegen die Tierart gerichtet ist, in der der Primärantikörper hergestellt wurde. Dadurch werden alle freien FAB-Fragmente blockiert und ein zweiter Primärantikörper aus der gleichen Tierart kann ohne Kreuzreaktionen benutzt werden (Brown et al. 2004). Dieses Verfahren hat den Nachteil, daß sich mit zunehmender Anzahl der Antikörper die Versuchsdauer signifikant erhöht.

Eine völlig andere Vorgehensweise zur Erstellung von Mehrfachfluoreszenzen wählte die Arbeitsgruppe Wahlby et al. Um einerseits leicht verfügbare Antikörper aus den Spezies Ratte und Kaninchen verwenden zu können und andererseits das Überlappen von Fluorochromwellenlängen zu vermeiden, entfernten sie die gefärbten Antikörper nach jeder Markierung. Dafür wurden die Zellen zweifach markiert, das Ergebnis analysiert, und anschließend wurden die applizierten Antikörper durch Denaturierung und Elution (Auswaschung) entfernt. So konnten insgesamt sechs Antigene in drei Färbeschritten markiert werden. Eine gleichzeitige Beurteilung aller Antikörper ist hierbei jedoch nicht möglich und die analysierten Zellen müssen nach jedem Färbevorgang neu aufgesucht werden. Desweiteren wurden Veränderungen in der Antigenität der Zellen beobachtet (Wahlby et al. 2002). Eine weitere Möglichkeit zur Umgehung des Problem ist die direkte Konjugations des Fluorochroms an den Primärantikörper. So gelang es der Arbeitsgruppe um Tsurui Zellen aus lymphatischem Gewebe von Mäusen durch den gleichzeitigen Nachweis von sieben Antigenen zu charakterisieren. Bei fünf der sieben verwendeten Antikörper waren dabei die Fluorochrome direkt an die Primärantikörper gekoppelt (Tsurui et al. 2000). Damit können Primärantikörper verwendet werden, die in derselben Tierart hergestellt wurden, wodurch sich die Anzahl der zur Verfügung stehend Antikörper deutlich erhöht. Ein wichtiger Vorteil der Immunfluoreszenz, die Amplifikation des Signals, fällt dadurch aber weg. Durch die fehlende Verstärkung können Antigene, die von den Zellen in nur geringer Anzahl exprimiert werden, deutlich schlechter nachgewiesen werden. So war in Vorversuchen mit dieser Methode die Signalstärke des Oberflächenantigens CD 44 zu schwach für weitergehende Beurteilung. Wir entschieden uns daher für die indirekte Immunfluoreszenz bei der Primärantikörper aus verschiedenen Spezies spezifisch ihr

jeweiliges Antigen, und die mit Fluorochromen beladenen Sekundärantikörper wiederum spezifisch ihre Primärantikörper detektierten. Durch Bindung mehrerer Sekundärantikörper pro Primärantikörper kommt es zur gewünschten Amplifikation des Signal (Lamvik et al. 2001). Ein Nachteil der Amplifikation ist die ungenaue Korrelation zwischen der Intensität der Immunreaktion und der tatsächlich vorhandenen Menge an Antigen. Folglich können keine quantitativen Aussagen über die Anzahl an Antigen pro Zelle getroffen werden.

Eine andere Methode zur Analyse von Immunfluoreszenz ist die Durchflußzytometrie. Hierbei werden mit Antikörpern markierte Zellen in Suspension durch eine Kapillare gesaugt und jede einzelne Zelle mit Hilfe eines Lasers auf bestimmte Merkmale, z.B. Fluoreszenz oder Zellgröße untersucht. Die Zellen können im gleichen Verfahren auch auf unterschiedliche Merkmale sortiert werden. Durchflußzytometrie ist, im Vergleich zur konventionellen Fluoreszenzmarkierung, eine deutlich sensitivere Methode, daher kann die Zahl der detektierbaren Antigen größer gewählt werden (Zola et al. 1990). So ist zum Beispiel die Charakterisierung von Lymphozyten durch eine gleichzeitige Detektion von zehn verschiedenen Antigenen ein etabliertes Verfahren (De Rosa et al. 2003). Phänotypische Merkmale von hMSC sind in der Vergangenheit ausführlich mit Hilfe der Durchflußzytometrie untersucht worden (Romanov et al. 2005; De Rosa et al. 2003). Dabei war selbst die simultane Detektion von 22 Oberflächenmarkern nicht ausreichend, um diese Zellen zu charakterisieren (Wagner et al. 2005). Konventionelle Immunfluoreszenz hingegen bietet nicht nur eine Mehrfachmarkierung von Zellen, sondern auch die Beurteilung des Verteilungsmusters eines Antigens. Desweiteren werden mit dieser Methode Zellen analysiert, die auf einer Oberfläche adhären sind. Die Bedeutung dieser Tatsache zeigt sich in den nachfolgenden Studien: Lodie et al. untersuchten zwei Gruppen von Knochenmarksstammzellen, die mittels Durchflußzytometrie nach CD105/Endoglin-Expression immunoselektiert und anschließend kultiviert worden waren. Es zeigte sich, dass die beiden Gruppen nach Adhäsion auf einer Oberfläche und weitergehender Kultur völlig identische Level an CD105 exprimierten (Lodie et al. 2002). Desweiteren konnte die Arbeitsgruppe um Reyes zeigen, daß die Expression des Antigens CD 44 von der Adhärenz der Zellen auf einer Oberfläche abhängt (Reyes et al. 2001).

4.5. Bildauswertung und Spektralanalyse

Fluoreszenzmikroskopie hat sich zu einer der interessantesten Mikroskopie-Methoden in der Medizin und Biologie entwickelt, da es eine selektive und spezifische Markierung von Molekülen bietet, die in geringer Anzahl vorkommen, bei geringer Hintergrundfärbung (Yuste 2005). Fluoreszenz entsteht durch Emission von Licht, wenn Fluorochrome durch Absorption von Licht kürzerer Wellenlängen angeregt werden. Der Wellenlängenunterschied zwischen exzitertem und emittiertem Licht ist dabei der entscheidende Faktor. Durch Filtern des exziterten Lichts kann selektiv emittiertes Licht von den Fluorochromen beurteilt werden (Lichtman and Conchello 2005). Die Fluoreszenzmikroskopie muß dabei folgende Hindernisse überwinden: Exzitertes Licht muß durch einen Anregungsfilter und emittiertes Licht durch einen Sperrfilter auf die spezifischen Wellenlängen reduziert werden, um unspezifische Strahlung zu blockieren. Zusätzlich treffen sich exzitertes und emittiertes Licht im Strahlengang und müssen durch einen dichromatischen Strahlenteiler aufgetrennt werden. Anregungs- und Sperrfilter werden zumeist kombiniert und entweder als Einzelfilter für ein bestimmtes Fluorochrom/Farbspektrum oder als Bandfilter für die Analyse mehrerer Fluorochrome hergestellt. Wir verwendeten die Einzelfilter # 1, 10, 15 (Zeiss, Deutschland) für Einfach-, Zweifach- und Dreifachfärbungen und erzielten einen klaren Nachweis der markierten Fluorochrome.

Folgende Schwierigkeiten ergeben sich bei der Auswertung von Vierfachfärbungen: Die Wellenlängen der Fluorochrome Texas Red (rot) und Alexa 546 (orange) liegen zu dicht beieinander und können nicht durch entsprechende Einzelfilter aufgetrennt werden. Eine Diskriminierung mit bloßem Auge bei Betrachtung durch Filter #15 (Zeiss, Deutschland) gelingt nicht, da es einerseits durch Überlagerungen der Fluorochrome zu Mischfarben kommt, und andererseits die Wellenlängenunterschiede der beiden Farben zu gering sind, um sie mit bloßem Auge zu differenzieren. Diese Probleme versuchten wir durch die Verwendung von *spectral imaging* zu lösen. *Spectral Imaging* wird angewendet, wenn Information in einem Bild so komplex ist, dass sie mit bloßem Auge nicht erfasst werden kann. Dies ist der Fall wenn, wie in unseren Versuchen, mehrere Fluorochrome mit ähnlichen oder überlappenden Farbspektren und Fluorochrome mit überlappender Lokalisation verwendet werden. Eine weitere Anwendung des *spectral imaging* ist das *spectral karyotyping* oder *SKY*, die Analyse von fluoreszenzmarkierten Chromosomen

(Schrock and Padilla-Nash 2000; Schrock et al. 1996). Dieses Verfahren wird intensiv in der Diagnose und Erforschung chromosomaler Veränderungen eingesetzt (Schrock et al. 2006). Weitere Einsatzgebiete sind die Analyse von immunfluoreszenzmarkierten Geweben, wie zum Beispiel die oben erwähnte Siebenfach-Immunfluoreszenz (Tsurui et al. 2000) oder die Siebenfach-intravital-Markierung von Knochengewebe (Pautke et al. 2005). *Spectral imaging* kombiniert dabei zwei etablierte Verfahren, nämlich *spectroscopy*, Spektralanalyse und *imaging*, Bildakquisition. Beste Ergebnisse bei der Bildakquisition liefern zur Zeit digitale Kameras, wie die von uns verwendete CCD-Kamera (Hamamatsu, Japan) (Garini et al. 2006). Spektralanalyse hingegen ist ein Verfahren, bei dem Licht in seine verschiedenen Wellenlängen aufgetrennt wird und deren Intensität gemessen werden. Auf diese Art und Weise erhält man ein spezifische Spektrum für eine Lichtquelle, zum Beispiel für ein Fluorochrom. Für die von uns verwendete Form des *spectral imaging* werden die Lichtstrahlen mit Hilfe eines Sagnac-Interferometers (ASI, Israel) aufgetrennt. Dabei werden zwei Lichtbündel mit Hilfe von Spiegeln oder halbdurchlässigen Platten durch getrennte optische Bahnen geführt, durch Spiegel reflektiert und am Ende wieder zusammengeführt. Ergebnis ist ein Interferenzmuster, welches durch die Differenz der optischen Wege bestimmt wird und Rückschlüsse auf die Lichtintensität und Wellenlänge zulässt (Garini et al. 2006). Eine Spektralaufnahme besteht normalerweise aus unendlich vielen Spektren, deren Informationsgehalt zu groß ist, um sie mit bloßem Auge zu beurteilen. Daher werden Analyseprogramme, wie das von uns verwendete SpectraView (ASI, Israel) benötigt, die die Datenmenge verarbeiten und darstellen (Schwartzkopf et al. 2005). Mit Hilfe von *spectral unmixing* (Zimmermann 2005) konnten wir die die vier verwendeten Fluorochrome und DAPI für das menschlich Auge sichtbar machen. *Spectral unmixing* vergleicht dabei die gewonnenen Wellenspektren mit Referenz-Wellenspektren, die aus den Analysen der Einzelfärbungen erstellt worden waren. Durch Zuweisung von Falschfarben gelingt die Identifizierung der Fluorochrome nun mit bloßem Auge.

Trotz Anwendung des gerade erklärten Verfahrens gelang es nicht, die Fluorochrome DAPI und AMCA im blauen Spektrum sowie Texas Red und Alexa 546 im rot-orangefarbenen Bereich aufzutrennen, obwohl der verwendete Filter F61 002 (AHF, Deutschland) die Wellenspektren aller verwendeten Fluorochrome abdeckte. Die Wellenspektren von DAPI, FITC und Texas Red lagen dicht bei den

Referenzangaben der Hersteller. Bei AMCA und vor allem bei Alexa 546 erhielten wir Wellenspektren, die zu längeren Wellenlängen verschoben waren. Eine mögliche Ursache könnte hier ein Blocken kürzerer Wellenlängen durch die verwendeten Filter sein. Die Diskriminierung dieser Farben gelang erst unter Verwendung eines Trippelbandfilters (SKY, ASI, Israel) für den roten, grünen und infraroten Bereich und Einzelfilter #01, (Zeiss, Deutschland) für den blauen Bereich. Damit erreichten wir eine exakte Auftrennung der vier verwendeten Fluorochrome und DAPI mit anschließender Zuweisung von Falschfarben. Bislang ging man davon aus, dass die Bildakquisition mittels *Spectral Imaging* der Bildakquisition durch Filtersets in Bezug auf Genauigkeit und Hintergrundrauschen überlegen ist (Garini et al. 1999). Nach Auswertung unserer Daten empfehlen wir jedoch die Kombination dieser beiden Methoden für optimale Ergebnisse. Die Bildakquisition erfolgte bei Verwendung von 2 Filtern nicht mehr in einer Aufnahme, sondern musste auf zwei Aufnahmen verteilt werden. Eine Spektralaufnahme dauert pro Bildakquisition durchschnittlich zwei bis drei Minuten, da, im Vergleich zur konventionellen Fluoreszenzmikroskopie, eine deutlich größere Menge an Information erzeugt wird. Prinzipiell können Fluorochrome unendlich häufig angeregt werden, die Bedingungen in denen sie aber angewendet werden, limitieren jedoch diese Anzahl. *Bleaching* oder Ausbleichen ist dabei der gebräuchlichste Begriff, um das Schwächerwerden von Signalen zu beschreiben (Lichtman and Conchello 2005). Eine Vielzahl von Gründen wird hierfür verantwortlich gemacht, der wichtigste ist aber sicherlich die ständige Anregung der Fluorochrome durch Licht. Um dies zu verhindern, wurden in unseren Versuchen die Glasobjektträger stets im Dunkeln aufbewahrt, und die Lichtintensität beim Mikroskopieren so niedrig wie möglich gewählt. Eine Vielzahl von Produkten ist in der Vergangenheit entwickelt worden, um das Ausbleichen von Fluorochromen zu verlangsamen (Ono et al. 2001), unter anderem das von uns benutzte ProLong (Molecular Probes, Deutschland). Ausbleichen von Fluorochromen wurde in dieser Studie nicht quantifiziert, wir konnten aber selbst bei mehrfachen Aufnahmen kein Schwächerwerden des Signals feststellen.

5. Zusammenfassung

Unsere Untersuchungen zeigen erstmalig eine Vierfach-Immunfluoreszenz auf humanen mesenchymalen Stammzellen. Dieses Verfahren ermöglicht es, die Zellen auf Einzelzellebene zu analysieren und die Lokalisation der nachgewiesenen Antigene zu untersuchen.

Die markierten Proteine Fibronectin, Kollagen I, Kollagen IV und CD 44 gehören dabei zum typischen Expressionsmuster von mesenchymalen Stammzellen.

Durch die Kombination von Filtersets und dem Einsatz des spektralen Bildanalyseprogramms SpectraView (ASI, Israel) gelang es selbst Wellenlängen, die näher als 20nm beieinander lagen, voneinander zu unterscheiden.

Bei der Auswertung bestätigte sich, dass hMSC aus einem heterogenen Zellpool bestehen. Dies zeigte sich unter anderem in der unterschiedlichen Expression des Markers Kollagen IV. Erweitert man nun das Färbeprofil um zusätzlichen Marker, so können diese Zellen auf Einzelzellebene eingehender untersucht und von anderen Zellarten und Vorläuferstufen abgegrenzt werden.

Die in dieser Arbeit neu für diese Applikation etablierte Methode stellt einen erfolgsversprechenden Ansatz zur Identifikation und Charakterisierung von humanen mesenchymalen Stammzellen dar.

6. Anhang

6.1. Passageprotokoll hMSC

- Medium mit Pipettierhilfe Pipettus (Hirschmann, Deutschland) entfernen
- Zellen mit 3ml PBS (Merck, Deutschland) waschen
- Inkubieren mit 2ml Trypsin/EDTA-Lösung (Firma Cambrex) bei 37°C
- Mikroskopische Kontrolle nach 5 Minuten, ob sich die Zellen von der Unterlage gelöst haben. Maximale Einwirkzeit 15 Minuten
- Zugabe von 3ml Medium zur Neutralisierung des Trypsins
- Zentrifugation bei 600g für 5 Minuten (Zentrifuge, Jouan, Frankreich)
- Absaugen des Überstandes, um Trypsinreste zu entfernen.
- Zellen in Medium resuspendieren und auf Kulturflaschen T75 (Nunc, USA) verteilen

6.2. Protokoll Immunfluoreszenz

Fixation:

- Objektträger in PBS waschen
- in Methanol bei -20°C für 8min fixieren
- erneut in PBS waschen
- Objektträger trocknen lassen

Blocken:

- mit Fettstift (DAKO, Germany) Felder abtrennen; Objektträger beschriften
- Zellen in PBS rehydrieren
- 1h mit Blockier-Serum bei Raumtemperatur in Feuchtkammer inkubieren

Primärantikörper:

- Blockier-Serum abklopfen
- Ca. 20µl Antikörper pro Feld pipettieren
- 30min bei Raumtemperatur in Feuchtkammer inkubieren
- 3 mal ca. 5min mit PBS waschen

Sekundärantikörper:

- ca. 20µl Antikörper pro Feld pipettieren
- 30min bei Raumtemperatur in Feuchtkammer im Dunkeln inkubieren
- 3 mal ca. 5 min mit PBS waschen

DAPI:

- ca. 20µl DAPI (Verdünnung 1:5000) pro Feld pipettieren
- 5min bei Raumtemperatur in Feuchtkammer im Dunkeln inkubieren
- einmal ca. 5min mit PBS waschen

Eindecken:

- Pro Long Komponente B im Wasserbad für 15min auf 50°C erhitzen
- Komponente A und B mischen
- weitgehend die Flüssigkeit von den Glasobjektträgern (GOT) abklopfen
- ca. 100µl Eindeckmedium pro GOT pipettieren
- Deckgläschen aufbringen und Luftblasen entfernen
- über Nacht im Dunkeln (Kühlschrank) trocknen lassen

7. Referenzen

1. Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (1998) Essential Cell Biology. Essential Cell Biology
2. An KN, Sun YL, Luo ZP (2004) Flexibility of type I collagen and mechanical property of connective tissue. *Biorheology* 41:239-246
3. Anjos-Afonso F, Siapati EK, Bonnet D (2004) In vivo contribution of murine mesenchymal stem cells into multiple cell-types under minimal damage conditions. *J Cell Sci* 117:5655-5664
4. Aubin JE (1998) Bone stem cells. *J Cell Biochem Suppl* 30-31:73-82.:73-82
5. Baddoo M, Hill K, Wilkinson R, Gaupp D, Hughes C, Kopen GC, Phinney DG (2003) Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. *J Cell Biochem* 89:1235-1249
6. Barry FP, Murphy JM (2004) Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol* 36:568-584
7. Belaud-Rotureau MA, Elghezal H, Bernardin C, Sanlaville D, Radford-Weiss I, Raoul O, Vekemans M, Romana SP (2003) [Spectral karyotyping (SKY) principle, advantages and limitations]. *Ann Biol Clin (Paris)* 61:139-146
8. Benvenuti S, Saccardi R, Luciani P, Urbani S, Deledda C, Cellai I, Francini F, Squecco R, Rosati F, Danza G, Gelmini S, Greeve I, Rossi M, Maggi R, Serio M, Peri A (2006) Neuronal differentiation of human mesenchymal stem cells: changes in the expression of the Alzheimer's disease-related gene seladin-1. *Exp Cell Res* 312:2592-2604
9. Beresford JN (1989) Osteogenic stem cells and the stromal system of bone and marrow. *Clin Orthop* 270-280
10. Beyer NN, da Silva ML (2006) Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. *Handb Exp Pharmacol* 249-282

11. Bianchi G, Banfi A, Mastrogiacomo M, Notaro R, Luzzatto L, Cancedda R, Quarto R (2003) Ex vivo enrichment of mesenchymal cell progenitors by fibroblast growth factor 2. *Exp Cell Res* 287:98-105
12. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG (2001) Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 19:180-192
13. Bianco P, Robey PG (2001) Stem cells in tissue engineering. *Nature* 414:118-121
14. Bieback K, Kern S, Kluter H, Eichler H (2004) Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells* 22:625-634
15. Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM (2000) From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 290:1775-1779
16. Brown JK, Pemberton AD, Wright SH, Miller HR (2004) Primary antibody-Fab fragment complexes: a flexible alternative to traditional direct and indirect immunolabeling techniques. *J Histochem Cytochem* 52:1219-1230
17. Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE (1997) Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem* 64:278-294
18. Bruder SP, Jaiswal N, Ricalton NS, Mosca JD, Kraus KH, Kadiyala S (1998a) Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration. *Clin Orthop Relat Res*, 355 Suppl: 247-56
19. Bruder SP, Kurth AA, Shea M, Hayes WC, Jaiswal N, Kadiyala S (1998b) Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 16:155-162
20. Buckner CD, Epstein RB, Rudolph RH, Clift RA, Storb R, Thomas ED (1970) Allogeneic marrow engraftment following whole body irradiation in a patient with leukemia. *Blood* 35:741-750

21. Cancedda R, Bianchi G, Derubeis A, Quarto R (2003) Cell therapy for bone disease: a review of current status. *Stem Cells* 21:610-619
22. Caplan AI, Goldberg VM (1999) Principles of tissue engineered regeneration of skeletal tissues. *Clin Orthop Relat Res*, 367 Suppl: 12-6
23. Chen SL, Fang WW, Ye F, Liu YH, Qian J, Shan SJ, Zhang JJ, Chunhua RZ, Liao LM, Lin S, Sun JP (2004) Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 94:92-95
24. Chiba H, Kobune M, Kato J, Kawano Y, Ito Y, Nakamura K, Asakura S, Hamada H, Niitsu Y (2004) Wnt3 modulates the characteristics and cobblestone area-supporting activity of human stromal cells. *Exp Hematol* 32:1194-1203
25. Chichester CO, Fernandez M, Minguell JJ (1993) Extracellular matrix gene expression by human bone marrow stroma and by marrow fibroblasts. *Cell Adhes Commun* 1:93-99
26. Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ (2001) 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* 98:7841-7845
27. Conget PA, Allers C, Minguell JJ (2001) Identification of a discrete population of human bone marrow-derived mesenchymal cells exhibiting properties of uncommitted progenitors. *J Hematother Stem Cell Res* 10:749-758
28. Conget PA, Minguell JJ (1999) Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol* 181:67-73
29. Coons AH, Creech HJ, Jones RN (1941) Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc Soc Exp Biol Med* 47:200-202
30. D'Ippolito G, Diabira S, Howard GA, Menei P, Roos BA, Schiller PC (2004) Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential. *J Cell Sci* 117:2971-2981

31. De Rosa SC, Brenchley JM, Roederer M (2003) Beyond six colors: a new era in flow cytometry. *Nat Med* 9:112-117
32. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, Dragoo JL, Ashjian P, Thomas B, Benhaim P, Chen I, Fraser J, Hedrick MH (2003) Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs* 174:101-109
33. Deans RJ, Moseley AB (2000) Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* 28:875-884
34. Deb A, Wang S, Skelding KA, Miller D, Simper D, Caplice NM (2003) Bone marrow-derived cardiomyocytes are present in adult human heart: A study of gender-mismatched bone marrow transplantation patients. *Circulation* 107:1247-1249
35. Deschaseaux F, Charbord P (2000) Human marrow stromal precursors are alpha 1 integrin subunit-positive. *J Cell Physiol* 184:319-325
36. Dicker A, Le Blanc K, Astrom G, van H, V, Gotherstrom C, Blomqvist L, Arner P, Ryden M (2005) Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue. *Exp Cell Res* 308:283-290
37. Digirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R, Prockop DJ (1999) 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* 107:275-281
38. Doi M, Nagano A, Nakamura Y (2002) Genome-wide screening by cDNA microarray of genes associated with matrix mineralization by human mesenchymal stem cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 290:381-390
39. Erices A, Conget P, Minguell JJ (2000) Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 109:235-242
40. Fouillard L, Bensidhoum M, Bories D, Bonte H, Lopez M, Moseley AM, Smith A, Lesage S, Beaujean F, Thierry D, Gourmelon P, Najman A, Gorin NC (2003) Engraftment of allogeneic mesenchymal stem cells in the bone marrow

- of a patient with severe idiopathic aplastic anemia improves stroma. *Leukemia* 17:474-476
41. Frank O, Heim M, Jakob M, Barbero A, Schafer D, Bendik I, Dick W, Heberer M, Martin I (2002) Real-time quantitative RT-PCR analysis of human bone marrow stromal cells during osteogenic differentiation in vitro. *J Cell Biochem* 85:737-746
 42. Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luria EA, Ruadkow IA (1974) Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol* 2:83-92
 43. Fuchs JR, Pomerantseva I, Ochoa ER, Vacanti JP, Fauza DO (2003) Fetal tissue engineering: in vitro analysis of muscle constructs. *J Pediatr Surg* 38:1348-1353
 44. Gangji V, Hauzeur JP, Matos C, De M, V, Toungouz M, Lambermont M (2004) Treatment of osteonecrosis of the femoral head with implantation of autologous bone-marrow cells. A pilot study. *J Bone Joint Surg Am* 86-A:1153-1160
 45. Garini Y, Gil A, Bar-Am I, Cabib D, Katzir N (1999) Signal to noise analysis of multiple color fluorescence imaging microscopy. *Cytometry* 35:214-226
 46. Garini Y, Young IT, McNamara G (2006) Spectral imaging: principles and applications. *Cytometry A* 69:735-747
 47. Goodwin HS, Bicknese AR, Chien SN, Bogucki BD, Quinn CO, Wall DA (2001) Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat, and neural markers. *Biol Blood Marrow Transplant* 7:581-588
 48. Gottschling S, Saffrich R, Seckinger A, Krause U, Horsch K, Miesala K, Ho AD (2006) Human Mesenchymal Stroma Cells Regulate Initial Self-Renewing Divisions of Hematopoietic Progenitor Cells by a β 1-Integrin-Dependent Mechanism. *Stem Cells*

49. Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM (2001a) Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol* 189:54-63
50. Gronthos S, Graves SE, Ohta S, Simmons PJ (1994) The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood* 84:4164-4173
51. Gronthos S, Simmons PJ, Graves SE, Robey PG (2001b) Integrin-mediated interactions between human bone marrow stromal precursor cells and the extracellular matrix. *Bone* 28:174-181
52. Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortessidis A, Simmons PJ (2003) Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci* 116:1827-1835
53. Grove JE, Bruscia E, Krause DS (2004) Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *Stem Cells* 22:487-500
54. Halvorsen YD, Franklin D, Bond AL, Hitt DC, Auchter C, Boskey AL, Paschalis EP, Wilkison WO, Gimble JM (2001) Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue-derived stromal cells. *Tissue Eng* 7:729-741
55. Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, Muul L, Hofmann T (2002) Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:8932-8937
56. Hou L, Cao H, Wang D, Wei G, Bai C, Zhang Y, Pei X (2003) Induction of umbilical cord blood mesenchymal stem cells into neuron-like cells in vitro. *Int J Hematol* 78:256-261
57. Hung SC, Chang CF, Ma HL, Chen TH, Low-Tone HL (2004) Gene expression profiles of early adipogenesis in human mesenchymal stem cells. *Gene* 340:141-150

58. Hung SC, Chen NJ, Hsieh SL, Li H, Ma HL, Lo WH (2002) Isolation and characterization of size-sieved stem cells from human bone marrow. *Stem Cells* 20:249-258
59. Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW (2004) Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp Hematol* 32:414-425
60. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM (2002a) Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418:41-49
61. Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM (2002b) Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol* 30:896-904
62. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU (1998) In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 238:265-272
63. Jülich. Optische und elektronische Geräte. 2003.
Ref Type: Internet Communication
64. Kadereit S, Deeds LS, Haynesworth SE, Koc ON, Kozik MM, Szekely E, Daum-Woods K, Goetchius GW, Fu P, Welniak LA, Murphy WJ, Laughlin MJ (2002) Expansion of LTC-ICs and maintenance of p21 and BCL-2 expression in cord blood CD34(+)/CD38(-) early progenitors cultured over human MSCs as a feeder layer. *Stem Cells* 20:573-582
65. Kadivar M, Khatami S, Mortazavi Y, Shokrgozar MA, Taghikhani M, Soleimani M (2006) In vitro cardiomyogenic potential of human umbilical vein-derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 340:639-647
66. Kassis I, Zangi L, Rivkin R, Levdansky L, Samuel S, Marx G, Gorodetsky R (2006) Isolation of mesenchymal stem cells from G-CSF-mobilized human peripheral blood using fibrin microbeads. *Bone Marrow Transplant* 37:967-976

67. Kawano Y, Kobune M, Yamaguchi M, Nakamura K, Ito Y, Sasaki K, Takahashi S, Nakamura T, Chiba H, Sato T, Matsunaga T, Azuma H, Ikebuchi K, Ikeda H, Kato J, Niitsu Y, Hamada H (2003) Ex vivo expansion of human umbilical cord hematopoietic progenitor cells using a coculture system with human telomerase catalytic subunit (hTERT)-transfected human stromal cells. *Blood* 101:532-540
68. Knudson CB (2003) Hyaluronan and CD44: strategic players for cell-matrix interactions during chondrogenesis and matrix assembly. *Birth Defects Res C Embryo Today* 69:174-196
69. Kobune M, Ito Y, Kawano Y, Sasaki K, Uchida H, Nakamura K, Dehari H, Chiba H, Takimoto R, Matsunaga T, Terui T, Kato J, Niitsu Y, Hamada H (2004) Indian hedgehog gene transfer augments hematopoietic support of human stromal cells including NOD/SCID-beta2m^{-/-} repopulating cells. *Blood* 104:1002-1009
70. Koc ON, Day J, Nieder M, Gerson SL, Lazarus HM, Krivit W (2002) Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH). *Bone Marrow Transplant* 30:215-222
71. Kogler G, Sensken S, Airey JA, Trapp T, Muschen M, Feldhahn N, Liedtke S, Sorg RV, Fischer J, Rosenbaum C, Greschat S, Knipper A, Bender J, Degistirici O, Gao J, Caplan AI, Colletti EJ, Almeida-Porada G, Muller HW, Zanjani E, Wernet P (2004) A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med* 200:123-135
72. Kundu AK, Putnam AJ (2006) Vitronectin and collagen I differentially regulate osteogenesis in mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 347:347-357
73. Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, Satomura K, Bianco P, Robey PG (2001) Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol* 153:1133-1140

74. Lamvik J, Hella H, Liabakk NB, Halaas O (2001) Nonlabeled secondary antibodies augment/maintain the binding of primary, specific antibodies to cell membrane antigens. *Cytometry* 45:187-193
75. Le Blanc K, Pittenger M (2005) Mesenchymal stem cells: progress toward promise. *Cytotherapy* 7:36-45
76. Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, Chung YF, Lin CT, Chou SH, Chen JR, Chen YP, Lee OK (2004a) In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology* 40:1275-1284
77. Lee RH, Kim B, Choi I, Kim H, Choi HS, Suh K, Bae YC, Jung JS (2004b) Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem* 14:311-324
78. Lichtman JW, Conchello JA (2005) Fluorescence microscopy. *Nat Methods* 2:910-919
79. Liu G, Hu YY, Zhao JN, Wu SJ, Xiong Z, Lu R (2004) Effect of type I collagen on the adhesion, proliferation, and osteoblastic gene expression of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Chin J Traumatol* 7:358-362
80. Lodie TA, Blickarz CE, Devarakonda TJ, He C, Dash AB, Clarke J, Gleneck K, Shihabuddin L, Tubo R (2002) Systematic analysis of reportedly distinct populations of multipotent bone marrow-derived stem cells reveals a lack of distinction. *Tissue Eng* 8:739-751
81. Long X, Olszewski M, Huang W, Kletzel M (2005) Neural cell differentiation in vitro from adult human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 14:65-69
82. Lu LL, Liu YJ, Yang SG, Zhao QJ, Wang X, Gong W, Han ZB, Xu ZS, Lu YX, Liu D, Chen ZZ, Han ZC (2006) Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. *Haematologica* 91:1017-1026
83. Macville M, Veldman T, Padilla-Nash H, Wangsa D, O'Brien P, Schrock E, Ried T (1997) Spectral karyotyping, a 24-colour FISH technique for the

- identification of chromosomal rearrangements. *Histochem Cell Biol* 108:299-305
84. Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, Moorman M, Gerson SL (1998) Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol* 176:57-66
 85. Malik Z, Dishi M, Garini Y (1996) Fourier transform multipixel spectroscopy and spectral imaging of protoporphyrin in single melanoma cells. *Photochem Photobiol* 63:608-614
 86. Mastrogiacomo M, Derubeis AR, Cancedda R (2005) Bone and cartilage formation by skeletal muscle derived cells. *J Cell Physiol* 204:594-603
 87. Minguell JJ, Erices A, Conget P (2001) Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 226:507-520
 88. Mizuno H, Zuk PA, Zhu M, Lorenz HP, Benhaim P, Hedrick MH (2002) Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells. *Plast Reconstr Surg* 109:199-209
 89. Morrison SJ, Weissman IL (1994) The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity* 1:661-673
 90. Muraglia A, Cancedda R, Quarto R (2000) Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci* 113:1161-1166
 91. Musina RA, Bekchanova ES, Belyavskii AV, Sukhikh GT (2006) Differentiation potential of mesenchymal stem cells of different origin. *Bull Exp Biol Med* 141:147-151
 92. Nakamura T, Shiojima S, Hirai Y, Iwama T, Tsuruzoe N, Hirasawa A, Katsuma S, Tsujimoto G (2003) Temporal gene expression changes during adipogenesis in human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 303:306-312

93. Niemeyer P, Krause U, Fellenberg J, Kasten P, Seckinger A, Ho AD, Simank HG (2004) Evaluation of mineralized collagen and alpha-tricalcium phosphate as scaffolds for tissue engineering of bone using human mesenchymal stem cells. *Cells Tissues Organs* 177:68-78
94. Ono M, Murakami T, Kudo A, Isshiki M, Sawada H, Segawa A (2001) Quantitative comparison of anti-fading mounting media for confocal laser scanning microscopy. *J Histochem Cytochem* 49:305-312
95. Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, Gaupp D, Baddoo M, Kaminski N, Phinney DG (2003) Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8407-8411
96. Otto WR, Rao J (2004) Tomorrow's skeleton staff: mesenchymal stem cells and the repair of bone and cartilage. *Cell Prolif* 37:97-110
97. Palermo AT, Labarge MA, Doyonnas R, Pomerantz J, Blau HM (2005) Bone marrow contribution to skeletal muscle: a physiological response to stress. *Dev Biol* 279:336-344
98. Pasco S, Ramont L, Maquart FX, Monboisse JC (2003) [Biological effects of collagen I and IV peptides]. *J Soc Biol* 197:31-39
99. Pautke C, Vogt S, Tischer T, Wexel G, Deppe H, Milz S, Schieker M, Kolk A (2005) Polychrome labeling of bone with seven different fluorochromes: enhancing fluorochrome discrimination by spectral image analysis. *Bone* 37:441-445
100. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-147
101. Pittenger MF, Martin BJ (2004) Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res* 95:9-20
102. Ponta H, Sherman L, Herrlich PA (2003) CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:33-45

103. Priller J, Persons DA, Klett FF, Kempermann G, Kreutzberg GW, Dirnagl U (2001) Neogenesis of cerebellar Purkinje neurons from gene-marked bone marrow cells in vivo. *J Cell Biol* 155:733-738
104. Prockop DJ (1997) Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276:71-74
105. Qi H, Aguiar DJ, Williams SM, La Pean A, Pan W, Verfaillie CM (2003) Identification of genes responsible for osteoblast differentiation from human mesodermal progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:3305-3310
106. Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A, Kon E, Marcacci M (2001) Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med* 344:385-386
107. Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM (2001) Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 98:2615-2625
108. Romanov YA, Darevskaya AN, Merzlikina NV, Buravkova LB (2005) Mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue: isolation, characterization, and differentiation potentialities. *Bull Exp Biol Med* 140:138-143
109. Rothmann C, Bar-Am I, Malik Z (1998) Spectral imaging for quantitative histology and cytogenetics. *Histol Histopathol* 13:921-926
110. Ryden M, Dicker A, Gotherstrom C, Astrom G, Tammik C, Arner P, Le Blanc K (2003) Functional characterization of human mesenchymal stem cell-derived adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 311:391-397
111. Satomura K, Krebsbach P, Bianco P, Gheron RP (2000) Osteogenic imprinting upstream of marrow stromal cell differentiation. *J Cell Biochem* 78:391-403
112. Schrock E, du MS, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D, Garini Y, Ried T (1996) Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 273:494-497

113. Schrock E, Padilla-Nash H (2000) Spectral karyotyping and multicolor fluorescence in situ hybridization reveal new tumor-specific chromosomal aberrations. *Semin Hematol* 37:334-347
114. Schrock E, Zscheschang P, O'Brien P, Helmrich A, Hardt T, Matthaei A, Stout-Weider K (2006) Spectral karyotyping of human, mouse, rat and ape chromosomes--applications for genetic diagnostics and research. *Cytogenet Genome Res* 114:199-221
115. Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Lenvik T, Johnson S, Hu WS, Verfaillie CM (2002) Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 109:1291-1302
116. Schwartzkopf WC, Bovik AC, Evans BL (2005) Maximum-likelihood techniques for joint segmentation-classification of multispectral chromosome images. *IEEE Trans Med Imaging* 24:1593-1610
117. Sekiya I, Larson BL, Smith JR, Pochampally R, Cui JG, Prockop DJ (2002) Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. *Stem Cells* 20:530-541
118. Sekiya I, Larson BL, Vuoristo JT, Cui JG, Prockop DJ (2004) Adipogenic differentiation of human adult stem cells from bone marrow stroma (MSCs). *J Bone Miner Res* 19:256-264
119. Shur I, Marom R, Lokiec F, Socher R, Benayahu D (2002) Identification of cultured progenitor cells from human marrow stroma. *J Cell Biochem* 87:51-57
120. Silverstein AM (1957) Contrasting fluorescent labels for two antibodies. *J Histochem Cytochem* 5:94-95
121. Sottile J, Hocking DC (2002) Fibronectin polymerization regulates the composition and stability of extracellular matrix fibrils and cell-matrix adhesions. *Mol Biol Cell* 13:3546-3559

122. Stewart K, Monk P, Walsh S, Jefferiss CM, Letchford J, Beresford JN (2003) STRO-1, HOP-26 (CD63), CD49a and SB-10 (CD166) as markers of primitive human marrow stromal cells and their more differentiated progeny: a comparative investigation in vitro. *Cell Tissue Res* 313:281-290
123. Talens-Visconti R, Bonora A, Jover R, Mirabet V, Carbonell F, Castell JV, Gomez-Lechon MJ (2006) Hepatogenic differentiation of human mesenchymal stem cells from adipose tissue in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *World J Gastroenterol* 12:5834-5845
124. Tavassoli M, Minguell JJ (1991) Homing of hemopoietic progenitor cells to the marrow. *Proc Soc Exp Biol Med* 196:367-373
125. Tocci A, Forte L (2003) Mesenchymal stem cell: use and perspectives. *Hematol J* 4:92-96
126. Tsurui H, Nishimura H, Hattori S, Hirose S, Okumura K, Shirai T (2000) Seven-color fluorescence imaging of tissue samples based on Fourier spectroscopy and singular value decomposition. *J Histochem Cytochem* 48:653-662
127. Tuli R, Seghatoleslami MR, Tuli S, Wang ML, Hozack WJ, Manner PA, Danielson KG, Tuan RS (2003) A simple, high-yield method for obtaining multipotential mesenchymal progenitor cells from trabecular bone. *Mol Biotechnol* 23:37-49
128. Viguet-Carrin S, Garnero P, Delmas PD (2006a) The role of collagen in bone strength. *Osteoporos Int* 17:319-336
129. Viguet-Carrin S, Roux JP, Arlot ME, Merabet Z, Leeming DJ, Byrjalsen I, Delmas PD, Buxsein ML (2006b) Contribution of the advanced glycation end product pentosidine and of maturation of type I collagen to compressive biomechanical properties of human lumbar vertebrae. *Bone* 39:1073-1079
130. Vogel W, Grunebach F, Messam CA, Kanz L, Brugger W, Buhning HJ (2003) Heterogeneity among human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and neural progenitor cells. *Haematologica* 88:126-133

131. Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U, Blake J, Schwager C, Eckstein V, Ansorge W, Ho AD (2005) Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol* 33:1402-1416
132. Wahlby C, Erlandsson F, Bengtsson E, Zetterberg A (2002) Sequential immunofluorescence staining and image analysis for detection of large numbers of antigens in individual cell nuclei. *Cytometry* 47:32-41
133. Watt FM, Hogan BL (2000) Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* 287:1427-1430
134. Wexler SA, Donaldson C, Denning-Kendall P, Rice C, Bradley B, Hows JM (2003) Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol* 121:368-374
135. Wulf GG, Chapuy B, Trumper L (2006) [Mesenchymal stem cells from bone marrow. Phenotype, aspects of biology, and clinical perspectives]. *Med Klin (Munich)* 101:408-413
136. Yuste R (2005) Fluorescence microscopy today. *Nat Methods* 2:902-904
137. Zeiss Deutschland. Fluoreszenzmikroskopie: Übersicht über alle Farbstoffe. 2006.
Ref Type: Internet Communication
138. Zhang S, Ge J, Sun A, Xu D, Qian J, Lin J, Zhao Y, Hu H, Li Y, Wang K, Zou Y (2006) Comparison of various kinds of bone marrow stem cells for the repair of infarcted myocardium: single clonally purified non-hematopoietic mesenchymal stem cells serve as a superior source. *J Cell Biochem* 99:1132-1147
139. Zhang Y, Li C, Jiang X, Zhang S, Wu Y, Liu B, Tang P, Mao N (2004) Human placenta-derived mesenchymal progenitor cells support culture expansion of long-term culture-initiating cells from cord blood CD34+ cells. *Exp Hematol* 32:657-664

140. Zimmermann T (2005) Spectral imaging and linear unmixing in light microscopy. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 95:245-265
141. Zohar R, Sodek J, McCulloch CA (1997) Characterization of stromal progenitor cells enriched by flow cytometry. *Blood* 90:3471-3481
142. Zola H, Neoh SH, Mantzioris BX, Webster J, Loughnan MS (1990) Detection by immunofluorescence of surface molecules present in low copy numbers. High sensitivity staining and calibration of flow cytometer. *J Immunol Methods* 135:247-255
143. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH (2002) Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13:4279-4295
144. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH (2001) Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7:211-228

8. Lebenslauf

Katharina Leske, geb. Reitz

Geburtsdatum/ -ort 11.12.1978, Landau in der Pfalz
Email katharina.leske@gmx.de

Schulische Ausbildung

1985 – 1998 Grundschule und Max Slevogt Gymnasium Landau
06/1998 Allgemeine Hochschulreife

Universitäre Ausbildung

10/1998 Beginn des Medizinstudiums an der Ruprecht-Karls-
Universität Heidelberg
10/2001 Wechsel an die Ludwig-Maximilians-Universität München
05/2005 Abschluß des Studium mit 3. Staatsexamen und Erteilung
der Approbation als Ärztin

Klinische Tätigkeit

08/2005 Beginn der klinischen Tätigkeit am Royal Shrewsbury
Hospital, Shrewsbury, Großbritannien in der Inneren
Medizin und Chirurgie

Dissertation

„Charakterisierung von humanen mesenchymalen Stammzellen durch
immuncytochemische Vierfachfärbung“

Experimentelle Arbeit bei Doktorvater Prof. W. Mutschler, Arbeitsgruppe Tissue
Engineering Knochen, Chirurgische Klinik und Poliklinik – Innenstadt,
Klinikum der LMU München

Veröffentlichungen

Schieker M; Pautke C; Reitz K; Hemraj I; Neth P; Mutschler W; Milz S

„The use of four-colour immunofluorescence techniques to identify mesenchymal stem cells“

J Anat (England), Feb 2004, 204(2) p133-9

Poster

Reitz K, Schieker M, Pautke C, Hemraj I, Milz S, Mutschler W

„Charakterisierung von humanen mesenchymalen Stammzellen durch Dreifachfluoreszenz auf einer Zelle“

80. Jahrestagung der Vereinigung der Bayerischen Chirurgen e.V., München, 17. - 19. Juli 2003

1. Posterpreis der Vereinigung der Bayerischen Chirurgen e.V.