

Aus dem Institut für Klinische und Experimentelle
Transfusionsmedizin
der Universität Tübingen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. Northoff

Kardiomyogene Differenzierungspotenz und
Wachstumskinetik von adulten humanen mesenchymalen
Stammzellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Stefanie Wöhrle

aus

Stuttgart

2012

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. H. Northoff

2. Berichterstatter:

Professor Dr. H. P. Wendel

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Übersicht	1
1.2	Stammzellen	2
1.2.1	Mesenchymale Stammzellen	4
1.3	Transplantation von Stammzellen zur Therapie des Myokardinfarkts	6
1.4	Kardiomyogene Differenzierung in vitro	8
1.5	Fragestellung und Ziele dieser Arbeit	11
2	Material und Methoden	12
2.1	Material	12
2.1.1	Humanes Zellmaterial	12
2.1.2	Instrumente und labortechnische Apparate	12
2.1.3	Chemikalien, Reagenzien, Medien, Antikörper	13
2.2	Methoden	15
2.2.1	Studienaufbau.....	16
2.2.2	Zellkultur	17
2.2.2.1	Herstellung des Kulturmediums	17
2.2.2.2	Gewinnung der Zellen.....	18
2.2.2.3	Kultivierung der Zellen	19
2.2.2.4	Medienwechsel	19
2.2.2.5	Subkultivierung	19
2.2.2.6	Zellzahlbestimmung.....	20
2.2.2.7	Kryokonservierung.....	21
2.2.3	Three-lineage-Differentiation	21
2.2.3.1	Zellkultivierung.....	21
2.2.3.2	Adipogene Differenzierung	22
2.2.3.3	Osteogene Differenzierung	23
2.2.3.4	Chondrogene Differenzierung.....	24
2.2.3.5	Auswertung.....	25
2.2.4	Kardiomyogene Differenzierung.....	25
2.2.4.1	Aza	25
2.2.4.2	Noggin	26
2.2.4.3	DMSO	26
2.2.4.4	FGF+BMP	26
2.2.4.5	VEGF	26
2.2.4.6	ITAD	27
2.2.5	Immunzytochemie.....	27
2.2.5.1	Versuchaufbau.....	27
2.2.5.2	Prinzip der immunzytochemischen Färbung.....	29
2.2.5.3	Prinzip der Fluoreszenz	30
2.2.5.4	Zellkultivierung.....	30
2.2.5.5	Herstellung der Fixierungslösung	30

2.2.5.6	Herstellung der Permeabilisierungs- und Blocking Lösung..	30
2.2.5.7	Immunzytochemische Färbung.....	31
2.2.5.8	Erstellung der Negativkontrolle	32
2.2.5.9	Auswertung.....	33
2.2.6	Proliferationskinetik.....	33
2.2.6.1	Zellkultivierung.....	33
2.2.6.2	Messungen der Zellzahlen sowie Erstellung der Proliferationskinetik.....	34
3	Ergebnisse	36
3.1	Three-lineage-Differentiation	36
3.2	Immunzytochemie	37
3.3	Proliferationskinetik	43
3.3.1	Populationsverdopplungszeiten.....	46
3.3.2	Zellzahlen	48
3.4	Wachstumskinetik und kardiomyogenes Differenzierungspotential	50
4	Diskussion	57
4.1	Three-lineage-Differenzierung	57
4.2	Kardiomyogene Differenzierung	58
4.3	Proliferationskinetik	63
4.4	Wachstumskinetik und kardiomyogenes Differenzierungspotential	65
5	Zusammenfassung und Ausblick	68
6	Literatur	71

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ein Modell der Entwicklung der adulten MSC.....	4
Abbildung 2: humane mesenchymale Stammzellen in Kultur (Vergrößerung x100)	5
Abbildung 3: Studienaufbau	17
Abbildung 4: Aufbau eines kardialen Sarkomeres.....	28
Abbildung 5: Indirekte immunzytochemische Färbung bearbeitet nach www.pathologieonline.de	29
Abbildung 6: adipogenes, osteogenes, chondrogenes Differenzierungspotential	37
Abbildung 7: Expression von kardialem Aktin von unbehandelten MSCs und MSCs unter kardiomyogener Differenzierung.	38
Abbildung 8: Expression von ANP von unbehandelten MSCs und MSCs unter kardiomyogener Differenzierung.	39
Abbildung 9: Expression von slow muscle myosin von unbehandelten MSCs und MSCs unter kardiomyogener Differenzierung	39
Abbildung 10: Expression von kardialem Troponin I von unbehandelten MSCs und MSCs unter kardiomyogener Differenzierung.	40
Abbildung 11: Negativkontrollen (lediglich mit dem Sekundär-AK behandelte hMSC (h20, P2))	40
Abbildung 12: interpolierte Wachstumskurve h20 Aza P4	
Abbildung 13: interpolierte Wachstumskurve h20 DMSO P3	43
Abbildung 14: interpolierte Wachstumskurve h20 FGF+BMP P6	44
Abbildung 15: Populationsverdopplungszeiten.....	47
Abbildung 16: Differenzierungsstärke und PDT in Abhängigkeit von der Passage	54

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Oberflächenmarker von hMSC	6
Tabelle 2: Immunzytochemischer Nachweis kardiomyogener Proteinexpression bei hMSC und kardiomyogen differenzierten Zellen.....	42
Tabelle 3: Wachstumsraten und Populationsverdopplungszeit	46
Tabelle 4: Signifikant unterschiedliche Differenzierungspaare in Bezug auf die maximal gemessene Zellzahl während der gesamten kinetischen Beobachtungszeit der Passage 3.....	49
Tabelle 5: Signifikant unterschiedliche Differenzierungspaare in Bezug auf die maximal gemessene Zellzahl während der gesamten kinetischen Beobachtungszeit der Passage 5.....	50
Tabelle 6: Kardiomyogene Differenzierung mit Wachstumsgeschwindigkeit....	52

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ANP	atriales natriuretisches Peptid
Aza	5-Azacytidin
BMP	Bone morphogenetic protein
BSA	Bovines Serumalbumin
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
d	Tag(e)
DAPI	4,6-Diamidinophenylindol
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMEM-LG	Dulbecco´s Modified Eagle Medium low glucose
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic Acid (dt. Desoxyribonukleinsäure)
et al.	et alii (dt. und andere)
FCS	fetales Kälberserum
FGF2	Fibroblast Growth Factor 2
FITC	Fluoreszein Iso Thio Cyanat
fl	Femtoliter
g	Gramm
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure
IMDM	Iscove´s Modified Dulbecco´s Medium
kg	Kilogramm
KMZ	Knochenmarkszelle
m	Meter
M	Mol
m ²	Quadratmeter
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
(h)MSC	(humane) mesenchymale Stammzelle(n)
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
P	Passage
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PDT	Population doubling time
Pen/Strep	100U/ml Penicillin / 100µg/ml Streptomycin Sulfat
pH	Potentia hydrogenii
RPM	rounds per minute

RT	Raumtemperatur
TGF- β 3	Transforming growth factor beta 3
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
μ g	Mikrogramm

1 Einleitung

1.1 Übersicht

Erkrankungen des Herzens, besonders die ischämische Herzmuskelschädigung auf dem Boden einer koronaren Herzerkrankung, sind die häufigsten Krankheits- und Todesursachen in den Industrienationen. (*American Heart Association. Heart and stroke statistical update. Dallas, TX: American Heart Association; 2001.*) Diese Erkrankungen verursachen die höchsten Krankheitskosten in der Bundesrepublik Deutschland. (<http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Navigatio n/Statistiken/Gesundheit/Krankheitskosten/Krankheitskosten.psml>

Stand vom 01.11.2011, 17:00h)

Beispielsweise kommt es nach einem arteriosklerotisch-bedingten Gefäßverschluss zur Minderdurchblutung des nachfolgenden Muskelareals und zur Ischämie infolge Hypoxie. Das Muskelgewebe reagiert mit Myokardnekrose. Dies führt zu einem Verlust an kontraktile Substanz sowie zu einer Abnahme der Ventrikelfunktion. Die Infarktzone selbst ist avital und zentral nekrotisch. Abhängig von der initialen Größe der Ischämie kommt es zum strukturellen Umbau des Ventrikels (Remodelling). Eine Hypertrophie der Kardiomyozyten am Rand des infarzierten Gewebes ist die initiale Antwort des Gewebes auf eine verminderte Herzleistung bedingt durch den hypoxisch-bedingten Verlust von Herzmuskelzellen (44)(80), da Herzmuskelzellen nur geringe Fähigkeiten zur Zellteilung zu besitzen scheinen (28). Diese Kardiomyozytenhypertrophie setzt eine Kaskade in Gang, die sich in eine Myozytenapoptose fortsetzt und zu einer Expansion des infarzierten Gebietes führt. Letztendlich kommt es zum Einbau von Kollagenfasern und zur Vernarbung des abgestorbenen Bereiches (2)(19)(63)(70). Somit entwickelt sich eine Ventrikeldilatation und diese führt zur weiteren Abnahme der Ventrikelfunktion (11)(18)(45).

Aber auch durch nicht-ischämische Schäden des Herzmuskelgewebes kommt es durch pathologisches Remodelling zur Bildung von Narbengewebe, das dann nicht mehr in der Lage ist, an der geordneten Herzbewegung im Rahmen

einer suffizienten Pumpfunktion teilzunehmen, da die Kontraktionsfähigkeit eingeschränkt ist. Durch diese Defektheilung kann es von einer eingeschränkten Herzmuskelfunktion bis hin zur klinisch manifesten Herzinsuffizienz kommen (27).

Trotz aller intensiver Fortschritte in der Forschung konnte durch den rechtzeitigen Einsatz pharmakotherapeutischer (Thrombolyse-Therapie) und/oder mechanischer Rekanalisationsverfahren (Ballondilatation, Stentimplantation) zwar die Zunahme der Infarktgröße vermindert werden, jedoch ist eine Rückbildung einer bereits vorhandenen Myokardnekrose nicht mehr möglich (82).

Viele Erwartungen werden deshalb in das tissue engineering gesetzt. Hier wird versucht, auf unterschiedliche Art und Weise in vitro oder in vivo Myokard-ähnliches Gewebe (Ersatzgewebe) zu kultivieren und es dann in das geschädigte Myokard zu implantieren und so die Gewebefunktion wiederherzustellen.

1.2 Stammzellen

Für diese Ersatzgewebekultivierung sind besonders Stammzellen sehr interessant.

Dabei handelt es sich um noch undifferenzierte Zellen, welche die Fähigkeit zur Differenzierung über Gewebegrenzen hinweg (Plastizität) sowie zur Selbsterneuerung besitzen. Das heißt sie können durch asymmetrische Teilung unterschiedliche Tochterzellen hervorzubringen, einerseits erneut eine identische Stammzelle und zum anderen eine nicht identische, mehr determinierte Zelle, wie beispielsweise eine linienspezifische Progenitorzelle (57). Die Progenitorzellen haben nur noch ein eingeschränktes Differenzierungspotenzial. Sie teilen sich symmetrisch und bringen bi- und tripotente Zellen hervor, die den multipotenten Stammzellen zwar morphologisch ähnlich sind, aber bereits ein abweichendes

Genexpressionsprofil aufweisen (5). (siehe Abbildung 1 Stammzellstammbaum modifiziert nach Baksh et al.)

Es werden embryonale und postembryonale (fetale, neonatale und adulte) Stammzellen unterschieden.

Embryonale Stammzellen sind pluripotente Zellen, d.h. sie können in Zellen aller drei Keimblätter sowie in Zellen der Keimbahn ausdifferenzieren. Auch können sie sich im Prinzip unbegrenzt teilen, da sie unter anderem eine erhöhte Telomeraseaktivität besitzen, welche die sich bei jeder Zellteilung verkürzende Telomerregion der DNA erneuert. Embryonale Stammzellen können im Stadium der Blastozyste aus befruchteten Eizellen gewonnen werden. Die Gewinnung dieser Zellen ist ethisch und moralisch bedenklich und in der Bundesrepublik deshalb aktuell nicht zulässig.

Andererseits ist die Isolation und Kultivierung von adulten Stammzellen ethisch unbedenklich, zum Beispiel aus Knochenmark, Fettgewebe, Blut und diversen anderen Organen (10)(34)(75)(76)(77)(96).

Dabei können adulte hämatopoetische Stammzellen, die für die ständige Regeneration der verschiedenen Blutbestandteile und des Immunsystems sorgen, und nicht-hämatopoetische Stammzellen, beispielsweise mesenchymale oder neurale Stammzellen, unterschieden werden.

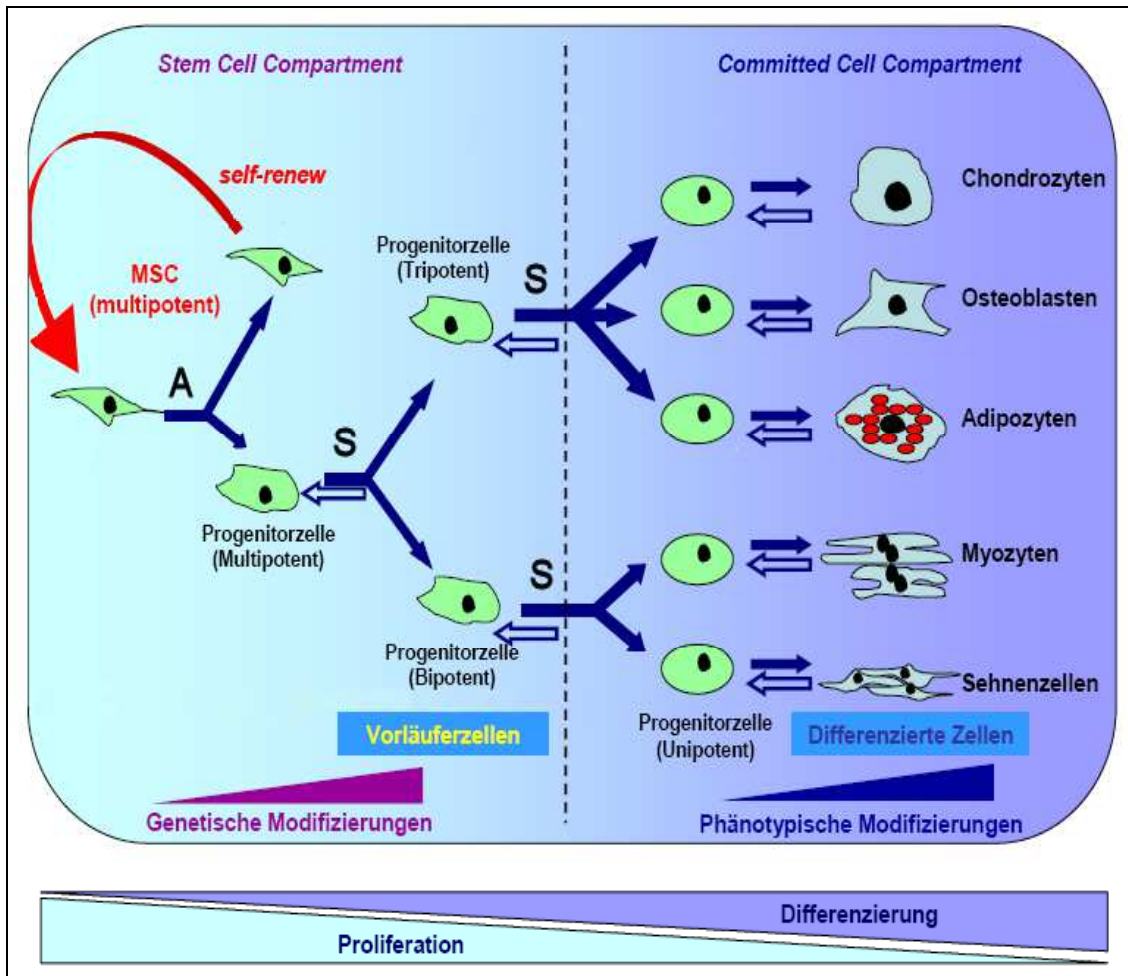


Abbildung 1: Ein Modell der Entwicklung der adulten MSC

Die multipotenten, undifferenzierten MSC teilen sich asymmetrisch. Dadurch entstehen eine identische Stammzelle und eine nicht identische Progenitorzelle. Daraufhin durchlaufen die MSC genetische Modifikationen und generieren Progenitorzellen mit vergleichbarem Phänotyp und Selbsterneuerungspotential.

A - asymmetrische Zellteilung, S - symmetrische Zellteilung.

unausgefüllte Pfeile – mögliche Dedifferenzierung von ausdifferenzierten Zellen in potentere Zellen (17)(56).

Modifizierte Darstellung nach Baksh et al. (5)

1.2.1 Mesenchymale Stammzellen

Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) sind multipotente Vorläuferzellen von nicht-hämatopoetischen Zellen, welche die Differenzierungspotenz in mesodermale Zellen, wie Adipozyten (74), Chondroblasten (7) sowie osteogene

Zellen (39) besitzen. Im Gegensatz zur mesodermalen Differenzierungspotenz von hMSCs wird deren Differenzierung in Neurone (Ektoderm) (40)(47) und entodermale Zellen (wie zum Beispiel Hepatozyten) (62)(73) kontrovers diskutiert (41). HMSC kommen in beinahe allen postnatalen Geweben vor und wurden bisher beispielsweise aus skelettalem Muskelgewebe (15)(38), Synovia (21), Periost (32), Fettgewebe (98) und Knochenmark (67) isoliert. Es wird angenommen, dass all diese Zellen gleichartig sind, trotz ihres unterschiedlichen Herkunftsgewebes, da sie alle die Eigenschaften von Stammzellen mit Selbsterneuerung und multipotenter Differenzierungspotenz gemeinsam mit gleichen Oberflächenepitopen aufweisen (22)(33). Jedoch sind die aus dem Knochenmark gewonnenen hMSC bisher am besten charakterisiert (10).

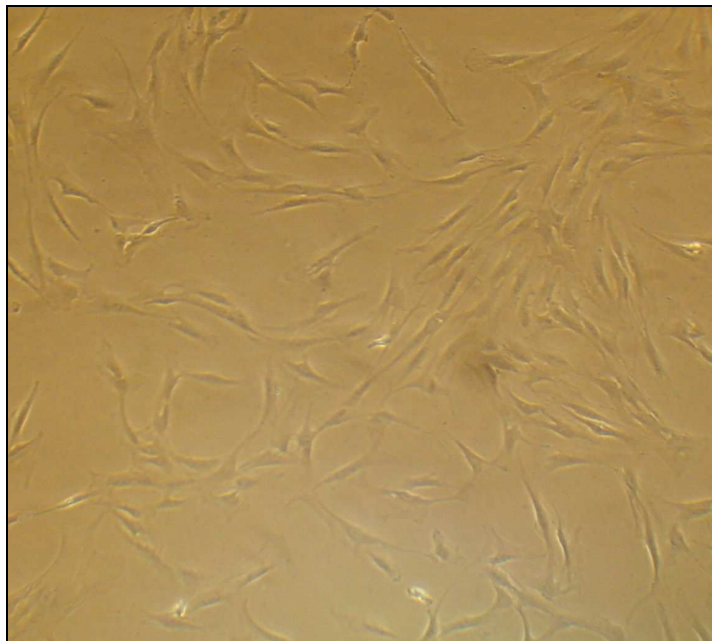


Abbildung 2: humane mesenchymale Stammzellen in Kultur (Vergrößerung x100)

HMSC sind für die Oberflächenmarker CD105, CD73 and CD90 positiv und negativ für CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a, CD19 und HLA-DR (siehe Tabelle 1). MSC werden über ihre wie oben beschriebene Differenzierungspotenz mit Fähigkeit zur Selbsterneuerung, die

Oberflächenmarker und über ihre Adhäsionsfähigkeit an Oberflächen wie zum Beispiel Plastik definiert (26)(64).

Oberflächenmarker Positiv	Oberflächenmarker Negativ
CD105 (Endoglin)	CD34
CD73 (Ecto-5'-Nucleotidase)	CD45 (Leukocyte Common Antigen)
CD90 (Thy-1)	CD14 oder CD11b
	CD79α oder CD19
	HLA-DR

Tabelle 1: Oberflächenmarker von hMSC nach Dominici et al. (26)

1.3 Transplantation von Stammzellen zur Therapie des Myokardinfarkts

Klinische und tierexperimentelle Studien zeigten protektive und regenerative Effekte

von applizierten Stammzellen oder Vorläuferzellen auf geschädigtes Myokardgewebe (13)(82). In vivo transplantierte undifferenzierte hMSCs in gesunde Herzen im Tiermodell zeigten eine kardiomyogene Differenzierung mit Ausbildung von sarcomerischer Organisation der kontraktilen Proteine. Nach über einem Monat exprimierten die hMSC Desmin, das von muskulären Progenitorzellen synthetisiert wird, α -Aktin, β -MHC und kardial spezifisches Troponin T (83).

Weitere Tierversuche zeigen einen weit reichenden funktionellen Gewinn nach Injektion von undifferenzierten MSC in das Infarktgewebe (3)(50)(83)(87) sowie nach Transplantation von MSC bei ischämischer Kardiomyopathie (79). Dabei wurden eine verminderte Narbenbildung und eine Begrenzung der Infarktgröße beschrieben, sowie eine Verbesserung der regionalen und globalen Ventrikelfunktion. Auch kam es zur Zunahme der Gefäßdichte und damit zur

verbesserten Perfusion des Myokards. Auch bei Klappenfehlern, Herzrhythmusstörungen und dilatativer und hypertensiver Kardiomyopathie gibt es Hinweise auf eine Verbesserung der klinischen Gesamtsituation nach MSC-Transplantation (4)(46)(58)(59)(65)(88).

Als Erstem gelang es Strauer et al. in einem klinischen Versuch, humane mononukleare Knochenmarkszellen (KMZ) erfolgreich über einen aufgeblasenen Niedrig-Druck-Ballonkatheter in ein Infarktgebiet zu injizieren. Zur Stammzellgewinnung wurde dem Patienten Knochenmark entnommen, aufbereitet, kultiviert und 6 Tage nach der Infarktdiagnose injiziert. Da es sich um patienteneigene Zellen handelte konnte das Problem einer immunologischen Abstoßungsreaktion umgangen werden. 10 Wochen nach Applikation verringerte sich die Infarktgröße bei dem 46-jährigen Patienten von anfangs 24,6 % auf 15,7 % und die Ejektionsfraktion (EF), der kardiale Index und das Schlagvolumen verbesserten sich um 20-30% (82).

Einen zusätzlichen Vorteil bieten die zellulären Eigenschaften der hMSC, die sie besonders attraktiv für die klinische Applikation erscheinen lassen. Erstens können leicht größere Mengen kultiviert werden, die für eine Transplantation benötigt werden und zweitens zeigen sie sowohl Potential für die Reparatur von Myokard als auch für die Revaskularisierung von Geweben (68).

Zudem besitzen weissen MSC Eigenschaften auf, die ihnen erlauben, in entzündeten Geweben zu existieren, ohne die Immunabwehr zu aktivieren (72). Dies wird darauf zurückgeführt, dass sie ruhend keine MHC Typ II Oberflächenmoleküle exprimieren, sowie keine T-Zell aktivierenden CD 40, CD 80 und CD 86 Moleküle (49).

Selbst differenzierte MSC besitzen die Fähigkeit, die Immunzellproliferation, -reifung und -funktion zu supprimieren (1)(23)(49).

Diese Mechanismen werden über Zell-zu-Zell-Kontakt mit Immunzellen und durch immunmodifizierende, lösliche Faktoren, wie TGF- β 1 (transforming growth factor beta 1), IL-10 (Interleukin 10) und PGE (Prostaglandin E) vermittelt (69)(72).

Allerdings werden auch unerwünschte Effekte nach der Zelltransplantation beobachtet: So kam es nach der Transplantation von Myoblasten durch sympathische Hyperinnervation infolge Überexpression von kardialen Tenascin zu bedrohlichen ventrikulären Arrhythmien. Außerdem gibt es Hinweise, dass transplantierte Stammzellen proarrhythmisch wirken, was zum Beispiel an der Heterogenität des Gewebes nach Transplantation liegen könnte (16)(50)(60)(66).

Auch kommt es nicht immer zu der kardiomyogenen Differenzierung bei in vivo transplantierten undifferenzierten MSC. Die MSC können in unerwünschte Gewebe wie zum Beispiel Bindegewebe oder kalzifizierende Gewebe differenzieren und so zu entsprechend schlechten Ergebnissen führen (12)(91)(94).

Außerdem besteht die Gefahr der Entwicklung eines Teratoms bei der Transplantation embryonaler undifferenzierter Stammzellen (85).

1.4 Kardiomyogene Differenzierung in vitro

All diese oben beschriebenen Ansätze konzentrierten sich auf die Transplantation von undifferenzierten Stammzellen, in der Erwartung, dass diese Zellen in vivo kardiomyogen differenzieren und somit zur Defektheilung beitragen. Um den Effekt zu steigern, wurde nach Methoden gesucht, die MSC vor Transplantation in vitro in Richtung kardiomyogener Zellen zu differenzieren.

Mit Hilfe von 5-Azacytidin gelang Wakitani et al. die Differenzierung von adulten Ratten-MSCs in kardiomyogene Zellen (89). 5-Aza ist ein synthetisches Nukleosid, das als Inhibitor der Methylierung von DNA benutzt wird.

Diese kardiomyogenen Zellen zeigen spontane Kontraktionsbewegungen sowie Kardiomyozyten-spezifische Marker wie ANP, BNP, α -Aktin, α - und β -Myosin heavy chain und Myosin light chain 2a und 2v. Die Isoformen der kontraktilen Proteine waren die gleichen, wie bei fetalen ventrikulären Kardiomyozyten. Elektronenmikroskopische Untersuchungen ergaben eine Kardiomyozyten-ähnliche Ultrastruktur mit Sarcomeren. Auch elektrophysiologische

Untersuchungen an diesen Zellen erbrachten Kardiomyozyten-ähnliche Eigenschaften wie spontane Sinusknoten- und Ventrikelmuskulatur-ähnliche Aktionspotentiale (30)(31)(53).

Nach Transplantation von mit 5-Aza vorbehandelten Zellen in Narbengewebe von insuffizienten Herzen zeigten sich eine Verbesserung der Kontraktilität des Herzens sowie eine Angiogenese. Als Kontrolle wurden frische und über 7 Tagen kultivierte Knochenmarkszellen, sowie als negativ Kontrolle reines IMDM („Iscove`s Modifiziertes Dulbecco's Medium“) injiziert. Ausschließlich die mit 5-Aza kultivierten Zellen waren positiv für Troponin I. Die Kapillardichte stieg bei allen drei KMZ-Gruppen im Vergleich zur IMDM-Gruppe signifikant an (frische KMZ: $6,29 \pm 0,58$; kultivierte KMZ: $5,93 \pm 0,33$; MSC+5-Aza: $5,74 \pm 0,57$ Kapillaren/ $0,2\text{mm}^2$ vs. IMDM: $2,12 \pm 0,38$ Kapillaren/ $0,2\text{mm}^2$; $p < 0,05$). Jedoch konnte bezüglich der Infarktgröße eine signifikante Verbesserung der 5-Aza-Gruppe im Vergleich zu den übrigen KMZ-Gruppen festgestellt werden ($P < 0,05$) (84).

Die Methode der Behandlung mit 5- Azazytidin wurde auch für die kardiomyogene Differenzierung von adulten hMSC etabliert (37).

Aber auch ohne zytotoxische Reagenzien wie 5-Aza gelang Shim et al. die kardiomyogene Differenzierung von hMSC durch Behandlung der Zellen mit einem Medium, das Insulin, Dexamethason und Ascorbinsäure enthielt. Diese so behandelten Zellen wiesen Kardiomyozyten-spezifische kontraktile Proteine (sarcomeric heavy chain myosin) und Strukturproteine, herzspezifisches Troponin I und einen typisch kardialen Phänotyp auf (78). Außerdem zeigten sich die Zellen für das atriale natriuretische Peptid positiv nach 4 bis 5 Passagen.

Yuasa et al. zeigten mit der vorübergehenden Inhibierung des BMP (bone morphogenetic protein) Signalwegs mit dem Antagonisten Noggin, wie es auch während der Kardiomyogenese für kurze Zeit stattfindet, eine kardiomyogene Differenzierung embryonaler Stammzellen (95).

Einen anderen Weg schlugen Kawai et al. ein, indem sie mit FGF und BMP, die als Wachstumsfaktoren in der frühen Kardiomyogenese eine wichtige Rolle spielen, embryonale Stammzellen für 3 Tage behandelten und auch eine kardiomyogene Differenzierung anhand von kardiomyozytenspezifischer mRNA und Proteinen zeigen konnten (43).

Paquin et al. erreichten mit DMSO eine Differenzierung von embryonalen Stammzellen von P19 Mäusen in schlagende Kardiomyozyten durch Erhöhung von Oxytocinrezeptorproteinen und Oxytocin-mRNA in den Zellen bereits nach 12 Tagen Kultur (61).

Eine weitere Methode zur kardiomyogenen Differenzierung stellt die Behandlung von Stammzellen mit VEGF, FGF2 und PDGF-AB dar. Auch hier zeigten sich spontan schlagende Zellformationen sowie die Expression von Troponin I (93).

In derselben Studie wurde auch die in vivo Distribution von kardiomyogendifferenzierten Knochenmarkszellen (KMZ) untersucht. Diese KMZ wurden wie MSC aus dem Knochenmark gewonnen und durch Plastikoberflächenadhärenz isoliert. Es wurden jedoch keine Analysen der Oberflächenepitope oder andere Differenzierungswege zum Nachweis aller Kriterien von MSCs durchgeführt. Dafür wurden KMZ +/- PDGF-AB als Koinjektion, PDGF-AB alleine und PBS als Negativkontrolle vor Infarzierung von Myokardgewebe in Rattenherzen injiziert. 2 Wochen nach Infarzierung wurde das Narbengewebe auf Kardiomyozytenbündel hin untersucht. In der Auswertung zeigten sich keine Kardiomyozyten in der Narbe bei der PBS Negativkontrolle, dafür Kardiomyozyteninseln in allen anderen Gruppen, wobei in der Gruppe KMZ plus PDGF-AB zweimal mehr Kardiomyozytenbündel gefunden wurden als in der Gruppe mit KMZ alleine und viermal mehr als in der PDGF-AB Gruppe.

Die kardiomyogene Differenzierungspotenz ist aber nicht nur von dem eingesetzten Differenzierungsmedium abhängig, sondern auch von der Passagenanzahl und der Proliferationsgeschwindigkeit der Zellen, wie Zhang et

al. zeigten (97). Sie stellten fest, dass MSC mittlerer Passagenummern unter 5-Aza Behandlung in Kardiomyozyten differenzierten, wohingegen MSC niedriger und hoher Passagen eine hohe Teilungsrate, aber keine Differenzierung zeigten. Erst nach Inhibition der Teilungsgeschwindigkeit mit einem Mitosehemmer differenzierten auch Zellen der Passage 1. Deshalb erscheint es wichtig, den besten Zeitpunkt für die Differenzierung der Stammzellen zu finden.

1.5 Fragestellung und Ziele dieser Arbeit

Ziel dieser vorliegenden Studie ist es, einen Vergleich unterschiedlicher kardiomyogener Differenzierungsstrategien mit Hilfe von verschiedenen Kulturmedien in Abhängigkeit von der Passage hinsichtlich der Differenzierungspotenz von hMSC zu erbringen. Auch soll die Proliferationsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Passage und dem Differenzierungsmedium ermittelt und verglichen werden.

Im Rahmen dieser Studie wurden 3 hMSC Populationen von 3 Spendern miteinander verglichen.

Im Besonderen wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

Gibt es Unterschiede in der Differenzierungspotenz zwischen den verschiedenen Differenzierungsprotokollen?

Gibt es Unterschiede im Zellwachstum und der Wachstumskinetik von unterschiedlich behandelten hMSC?

Zeigen sich Divergenzen im Wachstumsverhalten innerhalb einer Differenzierungsreihe in Abhängigkeit von der Passage?

Zeigen sich Abweichungen der Differenzierungspotenz in Abhängigkeit der Passagenzahl einzelner Differenzierungsreihen?

Lassen sich Abweichungen zwischen den verschiedenen Populationen hinsichtlich des Wachstumsverhaltens und der Differenzierungspotenz erkennen?

2 Material und Methoden

2.1 Material

Im Folgenden sind alle bei den Versuchen verwendeten Substanzen und Materialien alphabetisch aufgelistet.

2.1.1 Humanes Zellmaterial

Für alle durchgeführten Versuche wurden adulte humane mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark des Femurs verwendet. Die Zellen wurden bei Operationen an der Hüfte durch Auffangen des Knochenmarks gewonnen. Alle Proben stammen von Patienten/-innen im Alter von durchschnittlich 40,5 Jahren (\pm 2,5 Jahre) der orthopädischen Klinik des Universitätsklinikums Tübingen, die vor der Operation der Weiterverwendung ihrer Zellen zur klinischen Forschung zustimmten. Dabei wurden Systemerkrankungen inklusive malignen Erkrankungen als Ausschlusskriterien gewertet. Für das Projekt liegt ein positives Votum der Ethik-Kommission der medizinischen Fakultät des Universitätsklinikums Tübingen vor (Projektnummer 95/2005V).

Die im nachfolgenden genannten Populationsnummern 20, 21 und 38 beziehen sich auf die Reihenfolge des Zugangs der Proben im Labor.

2.1.2 Instrumente und labortechnische Apparate

Alkoholeinfrierbehälter	Fa. Nalgene
Blue max 15ml polystyrene conical tube	Fa. Falcon
Blue max 50ml polypropylene conical tube	Fa. Falcon
Brutschrank Hera Cell	Fa. Heraeus
Casy Cell Counter + Analyser System Model TT	Fa. Schärfe System
Cell scraper 25cm handle	Fa. Costar
Cryo. S Kryoröhrchen	Fa. Greiner Bio-One
Deckgläser 24x60mm	Fa. R. Langenbrinck

Eppendorf Research Pipetten	Fa. Eppendorf
Feinwaage AS 200	Fa. Ohaus
Filterpapier Whatman No1	Whatman Int. Ltd.
Kamera	Zeiss Axio Cam ICc3
Lab Tek II chamber slide System	Fa. Nalge Nunc Int.
Laminar Flow	Fa. Heraeus
Lichtmikroskop	Fa. Zeiss
Lichtmikroskopfilter EX BP 450-490, 09 shift free	Fa. Zeiss
Lichtmikroskopfilter EX G 365, 02 shift free	Fa. Zeiss
Magnetrührer Variomag monotherm	Fa. Aldrich
Multi dish 6 wells Nunclon delta SI	Fa. Nalge Nunc Int.
Neubauer Zählkammer	Fa. Assistent
Pasteur capillary pipettes	Fa. WU Mainz
pH-Meter	Fa. Schott instruments
Pipettenspitzen ep T.I.P.S. Nanotips 2,5µl	Fa. Eppendorf
Pipettenspitzen ep T.I.P.S. standard 2-200µl	Fa. Eppendorf
Pipettenspitzen ep T.I.P.S. standard 50-1000µl	Fa. Eppendorf
Pipettierhilfe Pipetus akku	Fa. Hirschmann
Solo Flash 600ml Zellkulturflaschen	Fa. Nalge Nunc Int.
Stripette 10ml	Fa. Costar
Stripette 25ml	Fa. Costar
Stripette 5ml	Fa. Costar
Zentrifuge Z51JK	Fa. Hermle

2.1.3 Chemikalien, Reagenzien, Medien, Antikörper

10% Formalin, neutral gepuffert	Apotheke UKT
10000U/ml Penicillin/10000µg/ml Streptomycin Sulfat	Fa. Lonza
4% Paraformaldehydlösung in PBS	Apotheke UKT
5-Azacytidin	Fa. Sigma
60% Isopropanol	Fa. Sigma
99% Isopropanol	Fa. Sigma

Accumax	Fa. PAA Laboratories
Accutase	Fa. PAA Laboratories
Aceton	Fa. Merck
Alcianblau 8GX	Apotheke UKT
Alkaline Phosphatase Kit	Fa. Sigma
Ampuwa Aqua dest.	Fa. Fresenius Kabi
Anti Mouse IgG ALEXA Flour488	Fa. Molecular Probes
Anti Mouse IgM ALEXA Flour488	Fa. Molecular Probes
Anti Rabbit IgG ALEXA Flour488	Fa. Molecular Probes
BioWhittaker AlphaMEM	Fa. Lonza
Bovines Insulin	Fa. Sigma
Bovines Serum Albumin	Fa. Sigma
Casyton	Fa. Schärfe System
Dexamethason	Fa. Sigma
Dimethylsulfoxid	Fa. Merck
Dulbecco´s Modified Eagle Medium high glucose	Fa. Gibco
Dulbecco´s Modified Eagle Medium low glucose	Fa. Gibco
Endothelial cell basal medium	Fa. PromoCell
Essigsäure	Apotheke UKT
Ethanol	Apotheke UKT
Fetal Calf Serum	Fa. Lonza
Formaldehyd Lösung 37%	Apotheke UKT
Glycerol 2-phosphate disodium salt hydrate	Fa. Sigma
HCL (Salzsäure)	Apotheke UKT
Hematoxylin	Fa. Sigma
Heparin Natrium 25.000I.E./5ml	Fa. Braun
Humanes Transferrin	Fa. Sigma
Indometacin	Fa. Sigma
Insulin-Selen-Transferrin+1	Fa. Sigma
Iscove´s Modified Dulbecco´s Medium	Fa. Gibco
Isobutylmethylxanthin	Fa. Sigma
Klarlack	Fa. L´Oreal

L-Ascorbic acid 2 Phosphate	Fa. Sigma
Linoleic acid	Fa. Sigma
Lymphoflot	Fa. Biotest AG
MCBD-201	Fa. Sigma
Mouse alpha sarcomeric Aktin IgM	Fa. Biozol
Mouse anti cardiac Troponin I IgG2b	Fa. Biozol
Mouse anti heavy chain cardiac Myosin IgG1	Fa. Biozol
Mouse anti human cardiac Troponin I IgG2b	Fa. Chemicon
Mouse anti slow muscle Myosin IgG1	Fa. Chemicon
Natrium Pyruvat	Fa. Sigma
Oil Red O Pulver	Fa. Sigma
Phosphat-gepufferte Saline	Fa. Lonza
Rabbit anti alpha ANP IgG	Fa. Chemicon
Recombinant human BMP2	Fa. R&D Systems
Recombinant human PDGF – AB	Fa. R&D Systems
Recombinant human VEGF 165	Fa. R&D Systems
Recombinant bovine FGF basic	Fa. R&D Systems
Recombinant mouse Noggin	Fa. R&D Systems
Sodium (Natrium) Selenite	Fa. Sigma
Sucrose	Fa. Sigma
TGF- β 3	Fa. Strathmann Biotec
Triton X-100	Fa. Sigma
Tryptanblau	Fa. Biochrom AG
Vectashield Mountain Medium with DAPI	Fa. Vector

2.2 Methoden

Alle im Weiteren beschriebenen Arbeitsschritte wurden unter einer Laminar-Flow-Sterilbank durchgeführt, deren Ablagen zuvor mit 70%igem Alkohol desinfiziert wurden. Es wurden für entsprechende Arbeitsschritte ausschließlich sterile Einmalmaterialien verwendet.

2.2.1 Studienaufbau

Um einen Vergleich unterschiedlicher kardiomyogener Differenzierungsstrategien mit Hilfe von verschiedenen Kulturmedien in Abhängigkeit von der Passage hinsichtlich der Differenzierungspotenz von hMSC zu erbringen, mussten zunächst hMSC isoliert werden und zweifelsfrei als solche identifiziert werden (Phenotypisierung). Dazu wurden die Kriterien der Adhäsionsfähigkeit und des Differenzierungspotentials in verschiedene Gewebe für hMSCs herangezogen. Diese definierende Differenzierungspotenz wurde mit der three-lineage-differentiation zu Beginn der Isolation (P0), sowie im weiteren Verlauf der Versuche immer wieder gezeigt. Dazu wurden die MSC mit verschiedenen Medien in adipogene, chondrogene, und osteogene Zellen differenziert. Die Adhärenz der Stammzellen an Plastik wurde durch Kulturflaschen mit speziellen Kunststoffoberflächen ausgenutzt, um sie so von anderen Zellen, wie zum Beispiel Fibrozyten, zu trennen.

Die aus dem Knochenmark isolierten hMSCs wurden als Passage 0 ausgesät und, zur Trennung von anderen Zelltypen, in Kulturflaschen vermehrt. Auch wurde nach 24 Stunden eine adipogene, chondrogene und osteogene Differenzierungsreihe gestartet. Nachdem die Zellen einen fast kompletten Zellrasen bildeten (Konfluenz von ca. 80%) wurden sie passagiert. Bei dieser P1 wurden die Zellen auf 7 Kulturflaschen verteilt und die kardiomyogene Differenzierung mit Hilfe von unterschiedlichen Medien begonnen. Die Zellen wurden 48 – 96 h entweder mit den Medien Aza, DMSO, FGF+BMP oder Noggin inkubiert, welche danach jeweils entfernt und für die folgende Zeit durch Kulturmedium ersetzt wurden. Mit den Medien ITAD und VEGF wurden die jeweiligen Zellen dagegen permanent behandelt. Bei jeder Passage wurden von allen 3 Populationen zu den Kulturflaschen noch chamber slides angelegt, die auch der kardiomyogenen Differenzierung unterworfen wurden. Diese wurden später immunzytochemisch gefärbt und ausgewertet. Zudem wurden Zellen zu Versuchen zur Zellkinetik eingefroren.

Zeigten die Zellen im Verlauf so gut wie kein Wachstum über mehrere Wochen, wurde der Versuch beendet.

Bei allen Versuchen stellten die nur mit Kulturmedium ohne weitere Zusätze behandelten MSC die Negativkontrolle da.

Mit zwei weiteren Stammzellpopulationen von anderen Spendern wurde gleich Im Rahmen dieser Studie wurden 3 hMSC Populationen von 3 Spendern miteinander verglichen.

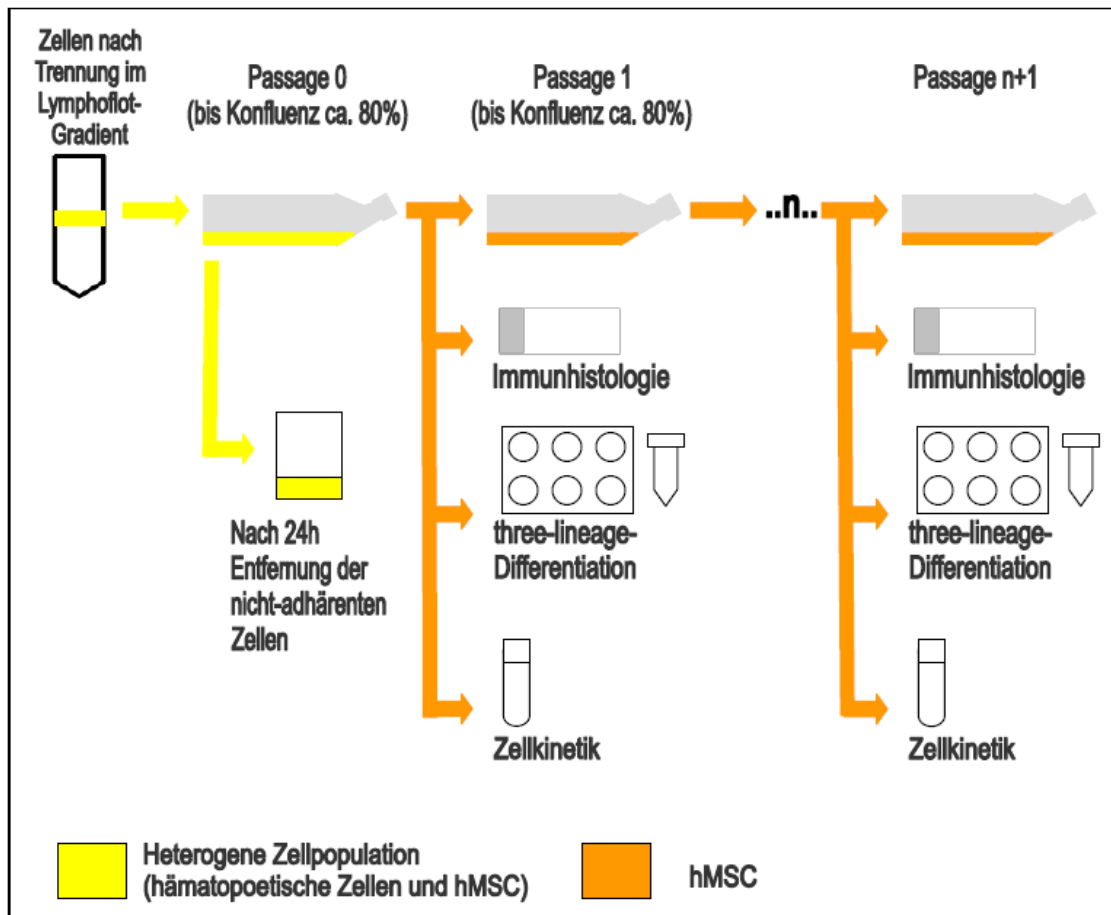


Abbildung 3: Studienaufbau

2.2.2 Zellkultur

2.2.2.1 Herstellung des Kulturmediums

Für die Zellkultur wurde als Kulturmedium, im Folgenden „Normalmedium“ genannt, 89% AlphaMEM, 10% inaktiviertes FCS und 1% Penicillin/Streptomycin als Antibiotikum verwendet, welches bei 4°C gelagert

wurde und das zur Ernährung und Neutralisation von Abfallprodukten der Zellen diente.

AlphaMEM als Grundmedium enthält Aminosäuren, die als Kohlenstoffquelle, Energielieferanten und als Ausgangsstoff für weitere Biomolekülsynthesen dienen, Vitamine, sowie Phenolrot als pH Indikator. Dieser schlägt bei z.B. Verkeimung oder Nährstoffmangel, also Azidität, von Rosa nach Orange und bei z.B. ungenügender CO₂ Versorgung, also Alkalisierung, nach Violett um.

Im FCS sind unter anderem wachstums- und proliferationsstimulierende Substanzen, Polypeptide, Lipide und Spurenelemente enthalten (29). Zur Inaktivierung von Komplementfaktoren musste das FCS zunächst für 30 min bei 56°C erhitzt werden. Daraufhin wurde das FCS aliquotiert und zusammen mit dem ebenfalls aliquotiertem 1%em Penicillin/Streptomycin bei -20°C gelagert. Das FCS sowie das 1%e Penicillin/Streptomycin wurden unmittelbar vor Gebrauch aufgetaut und dem Grundmedium hinzugefügt.

2.2.2.2 Gewinnung der Zellen

Die hMSC wurden aus dem Knochenmarksblut mittels Lymphoflot isoliert. Dafür wurde das Knochenmarksblut in ein PP-Röhrchen pipettiert. Das mit 20 ml PBS aufgefüllte Knochenmarksblut wurde dann in ein zweites PP-Röhrchen, in das 20 ml Lymphoflot vorgelegt waren, überführt und vorsichtig über das Lymphoflot geschichtet. Nach dem Zentrifugieren bei 2000 RPM ohne Bremse für 20 min wurde ein gelblicher Ring zwischen zwei Phasen erkennbar. Dieser wurde vorsichtig mit einer Glaspipette und dem Pipettierball abgenommen und in ein weiteres PP-Röhrchen gegeben. Wieder wurde mit 20 ml PBS aufgefüllt und bei 1500 RPM und diesmal maximaler Bremse für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet durch Schütteln und Vibration aufgelockert und wieder mit PBS aufgefüllt und erneut abzentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde noch ein drittes Mal wiederholt.

Daraufhin wurden die Zellen in Normalmedium resuspendiert und in Kulturflaschen überführt, um sie dort als Passage 0 adhären und wachsen zu lassen.

2.2.2.3 Kultivierung der Zellen

Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit spezieller Oberfläche für Zelladhäsion, sowie chamber slides (für die immunzytochemischen Experimente) ausgesät und bei 37°C im Brutschrank mit 5% CO₂ bei >98% Luftfeuchtigkeit (Wasserdampf gesättigt) mit Normalmedium bzw. den entsprechenden Differenzierungsmedien kultiviert.

2.2.2.4 Medienwechsel

Vor dem Medienwechsel wurden die Zellen unter dem Durchlichtmikroskop auf Kontaminationen, degenerative Veränderungen und Zelldichte inspiziert.

Der erste Medienwechsel erfolgte zwischen dem 3. – 6. Tag nach der Aussaat, um eine optimale Adhärenz der Zellen zu gewährleisten. Dazu wurde das Medium mit einer Pasteurpipette und der Saugpumpe unter der Sterilbank vorsichtig abgezogen, um die adhärennten Zellen nicht zu beschädigen.

Hier schloss sich ein Waschschriff mit PBS an, um Stoffwechselabfallprodukte und altes Medium vollständig zu entfernen. Auch dieses wurde wieder mit einer Pasteurpipette abgezogen.

Daraufhin folgte die Zugabe frischen Mediums, 25 ml je 185 cm² Zellkulturflasche sowie 2 ml je 9,6 cm² well und 8,6 cm² chamber slide.

Alle folgenden Medienwechsel wurden zweimal wöchentlich durchgeführt, um konstante pH- und Nährstoffbedingungen für das Zellwachstum zu schaffen und die Konzentration von Zellabfallprodukten bzw. Zellgiften (z. B. Ammoniak, dem Abbauprodukt der Aminosäuren), die das Zellwachstum beeinträchtigen können, gering zu halten.

2.2.2.5 Subkultivierung

War der Zellrasen in den Kulturflaschen oder chamber slides zu 80% konfluent, wurde eine Passage (Subkultivierung) durchgeführt, um die Zellen in neuen Kulturflaschen und chamber slides auszusäen, sowie um für die Zellkinetik, die

zu einem späteren Zeitpunkt stattfand, Zellen bei -196°C in flüssigem Stickstoff zu konservieren. Dazu wurde das Kulturmedium mit Pasteurpipetten unter der Sterilbank abgezogen und die Flaschen einmal mit PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen nach 15-minütiger Inkubation mit 12 ml Accutase (75 cm^2 Flasche) bei 37°C abgelöst.

Zu dieser Einzelzelllösung wurden 10 ml AlphaMEM zur Inaktivierung der Accutase beigefügt und der Boden der Kulturflaschen mit dieser Lösung mehrmals abgespült, um auch die letzten Zellen abzulösen und abgelöste Zellklumpen zu vereinzeln. Die Lösung wurde danach mit den Zellen in PP-Röhrchen überführt und die Flaschen nochmals mit 10 ml Medium gespült, welches ebenso in die PP-Röhrchen überführt wurde. Diese wurden bei 1200 U/min für 5 min mit maximaler Bremse zentrifugiert, der Überstand mit einer Pasteurpipette abgenommen und je nach Zellpelletgröße wurden die Zellen in 3-10 ml AlphaMEM resuspendiert. Dann wurden 100 μl Zellsuspension für die Zellzahlbestimmung entnommen.

Danach wurden die Zellen auf die verschiedenen Flaschen aufgeteilt. 2×10^5 Zellen je 185 cm^2 Kulturflasche und 1×10^4 Zellen je chamber slide (8,6 cm^2). Darüber hinaus wurden 1×10^4 Zellen je 6-well-Mulde für die adipogene und osteogene und $2,5 \times 10^5$ Zellen in ein 15 ml PP-Röhrchen für die chondrogene Differenzierung ausgesät. Die restlichen Zellen wurden bei -196°C in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.2.2.6 Zellzahlbestimmung

Für die Zellzahlbestimmung wurden 100 μl Zellsuspension in 100 μl Accumax gelöst, um die Zellen zu vereinzeln. Davon wurden wieder 100 μl entnommen und mit 100 μl Trypanblau vermischt. Sofort wurde diese Mischung in eine Neubauer Zählkammer überführt und unter dem Lichtmikroskop die Zellen ausgezählt. Vitale Zellen erscheinen dabei weiß und kugelig, bei den toten Zellen kann das Trypanblau ungehindert in die Zelle eindringen, so dass diese blau erscheinen. Es wurden jeweils die 4 großen Eckquadrate ausgezählt.

Die Zellzahl (je nach Volumen) wurde wie folgt berechnet:

Zellzahl $\times 10^5$ = gezählte Zellen aus 4 großen Eckquadraten \times Volumen (in ml) / 10.

2.2.2.7 Kryokonservierung

Zellen, die erst zu einem späteren Zeitpunkt weiter untersucht wurden, wurden zur Konservierung bei -196°C in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Dazu wurde die Zellsuspensionslösung bei 1200 U/min und maximaler Bremse zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in reinem AlphaMEM resuspendiert. Dann wurde je 1 ml Zellsuspension und 1 ml Einfriermedium, das aus zu 5% DMSO, 20% FCS und 75% AlphaMEM Grundmedium bestand, in ein Cryo.S Röhrchen pipettiert und sofort in einem mit Isopropanol gefüllten Einfrierbehälter zuerst für 24 h bei -80°C zwischengelagert, bevor sie dann in den Stickstofftank überführt wurden.

DMSO reduziert den Wassergehalt der Zelle, dadurch können sich keine Eiskristalle bilden, welche die Membran der Zelle zerstören und damit deren Lyse herbeiführen würden.

Wurden die Zellen benötigt, wurden sie sofort nach dem Entnehmen aus dem Stickstofftank mit Handwärme aufgetaut und mit mehreren Millilitern Kulturmedium verdünnt in ein PP-Röhrchen überführt. Diese wurden bei 1200 U/min mit maximaler Bremse für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in Kulturmedium resuspendiert. Davon wurden 100 μl für eine Zellzahlbestimmung entnommen, um die Anzahl der vitalen Zellen zu bestimmen.

2.2.3 Three-lineage-Differentiation

2.2.3.1 Zellkultivierung

In 6-well Platten wurden jeweils 1×10^4 Zellen für die adipogene und osteogene Differenzierung in 2 wells ausgesät, wobei ein well als Negativkontrolle diente, d.h. die Zellen in diesem well wurden nur mit Normalmedium behandelt. Die

Zellen im anderen well wurden mit dem jeweiligen Differenzierungsmedium behandelt. Nachdem die Zellen zu ca. 80% konfluent den Boden der wells bedeckten, wurde mit der Differenzierung begonnen, indem die Differenzierungsmedien permanent bei jedem Medienwechsel zweimal die Woche gewechselt wurden. Die Behandlung der MSC zur adipogenen und osteogenen Differenzierung dauerte jeweils 21 Tage.

Für die chondrogene Differenzierung wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen in einem 15 ml PP-Röhrchen mit chondrogenem Differenzierungsmedium behandelt. Auch hier wurde zweimal die Woche ein Medienwechsel durchgeführt. Da sich die Zellen nach einer Woche zu einem kleinen Kügelchen zusammengelagert haben, konnte das ohne Zellverlust geschehen. Die Zellen wurden für 28 Tage dem Differenzierungsmedium ausgesetzt.

2.2.3.2 Adipogene Differenzierung

Zur Herstellung des adipogenen Differenzierungsmediums wurden 390 ml AlphaMEM, 100 ml inaktiviertes FCS, 5 ml 1% Penicillin/Streptomycin, 196 µl Dexamethason Stocklösung (Konzentration: 1 µM), 716 µl Indometacin Stocklösung (Konzentration: 0,2 mM), 50 µl Insulin Stocklösung (Konzentration: 0,01 mg/ml) und 5,56 ml Isobutylmethylxanthin Stocklösung (Konzentration: 0,5 mM) verwendet.

Die Dexamethason Stocklösung bestand aus 1 mg Dexamethason in 1 ml Ethanol, für die Indometacin Stocklösung wurden 5 g Indometacin in 100 ml Ethanol gelöst, die Insulin Stocklösung bestand aus 1 g Insulin in 10 ml PBS und die Isobutylmethylxanthin Stocklösung wurde mit 100 mg Isobutylmethylxanthin und 10 ml Ethanol hergestellt.

Zum Nachweis der Adipogenese wurde die Oil-Red-O Färbung eingesetzt, bei welcher Lipide nachgewiesen werden, die sich nach der Färbung rot darstellen, die Zellkerne erscheinen durch die Hematoxylingegenfärbung blau. Für die Stocklösung der Red Oil Färbelösung wurden 150 mg Ölrötpulver mit 99% Isopropanol auf 50 ml aufgefüllt. Zur Herstellung der fertigen Gebrauchslösung wurden 3 Teile Ölröt Stocklösung mit 2 Teilen Aqua dest. gemischt, bei RT 10

min inkubiert und anschließend durch Filterpapier filtriert. Diese Lösung ist nur 2 Stunden haltbar und musste direkt vor Gebrauch angesetzt werden.

Nach der 21-tägigen Differenzierung wurde zuerst das Medium aus den 6-well Platten entfernt und die Zellen zweimal mit PBS gespült. Dann wurden 2 ml Formalin in das well gegeben, welches für 30 – 60 min bei Raumtemperatur einwirkte. Nach dem Abziehen der Formalinlösung schloss sich ein Waschschrift mit 2 ml sterilem Aqua dest. an. Anschließend wurden 2 ml 60% Isopropanol pro well pipettiert, welches nach 2 -5 minütiger Inkubationszeit abgezogen wurde. Daraufhin wurden 2 ml Ölrot Gebrauchslösung in jedes well gegeben und die Platten bei RT 5 min stehen gelassen. Das Ölrot wurde durch Waschen mit Leitungswasser entfernt, wobei darauf geachtet wurde, dass der Monolayer der Zellen nicht zerstört wurde. Zur Gegenfärbung wurden dann 2 ml Hematoxylin Lösung pro well pipettiert, welche nach 1 min durch Spülen mit Leitungswasser ausgewaschen wurde. Auch hier wurde am Ende noch genug Wasser in den wells belassen, um alle Zellen zu bedecken.

2.2.3.3 Osteogene Differenzierung

Das osteogene Differenzierungsmedium bestand aus 387 ml AlphaMEM, 100 ml inaktiviertem FCS, 5 ml 1% Penicillin/Streptomycin, 196 µl Dexamethason Stocklösung (Konzentration: 1 µM), 1 ml Glycerolphosphat Stocklösung (Konzentration: 10 mM) und 7,24 ml Ascorbinsäure Stocklösung (Konzentration: 50 µM).

Die Dexamethason Stocklösung bestand aus 1 mg Dexamethason in 1 ml Ethanol, die Glycerolphosphat Stocklösung wurde aus 1,08 g Glycerolphosphat und 1 ml H₂O hergestellt und für die Ascorbinsäure Stocklösung wurden 10 mg Ascorbinsäure in 10 ml H₂O gelöst.

Der Nachweis der Osteogenese wurde mit Hilfe einer zytochemischen Färbung mit einem Alkalifarbstoffgemisch für alkalische Phosphatase erbracht. Dieses wurde immer kurz vor Gebrauch angesetzt. Dazu wurden zu 22,5 ml Aqua dest. 0,5 ml Natriumnitrit Lösung und 0,5 ml FRV Alkalilösung gegeben. Das Gemisch wurde 2 min stehen gelassen und dann mit 0,5 ml Naphtol AS-BI

Alkalilösung versetzt. Nach dem Mischen war die Lösung gebrauchsfertig. Die Reagenzien entstammten dem Alkaline Phosphatase Kit der Firma Sigma. Nach 21 Tagen Differenzierung wurde zuerst das Medium aus den 6-well Platten entfernt und die Zellen zweimal mit PBS gespült. Aus 12,5 ml Citratlösung, 32,5 ml Aceton und 4 ml 37% Formaldehyd wurde die Citrat-Fixierungslösung hergestellt, von welcher 2 ml in das well gegeben wurde und unter vorsichtigem Schwenken 1 min einwirkte. Nach dem Abziehen der Citrat-Fixierungslösung folgte ein einminütiger Waschschrift mit 4 ml sterilem Aqua dest. Danach wurden 2 ml Alkalifarbstoffgemisch pro well pipettiert, die Platte wurde mit Aluminiumfolie zum Schutz vor direktem Licht abgedeckt, bei Raumtemperatur 30 min inkubiert und die Lösung dann abgezogen. Wieder folgte ein Waschschrift mit 4 ml Aqua dest. Als Gegenfärbelösung wurden dann 2 ml Hematoxylin für 2 min in jedes well gegeben. Zuletzt wurden die wells gut mit Leitungswasser ausgespült, wobei am Ende genug Wasser in den wells belassen wurde, um die Zellen zu bedecken.

2.2.3.4 Chondrogene Differenzierung

DMEM mit 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Insulin-Selen-Transferrin+1 und 1% FCS stellten das Grundmedium des chondrogenen Differenzierungsmediums dar. Diesem wurden noch 0,1 mM Ascorbinsäure-2-Phosphat, 1 mM Natrium Pyruvat und 10 ng/ml TGF- β 3 hinzugefügt.

Zur Herstellung der Alcianblaulösung zum Nachweis der Chondrogenese wurden 1% Alcianblau 8GX in 3%iger Essigsäure gelöst. Alcianblau färbt selektiv saure Mukosubstanzen (Glykosaminoglykane) grünlich-blau an. Diese kommen in den Kohlenhydratseitenketten von Proteoglykane vor, welche zusammen mit den Kollagenen Hauptbestandteile der extrazellulären Grundsubstanz des Gelenknorpels sind.

2.2.3.5 Auswertung

Die adipogene und osteogene Differenzierungen wurden in den Passagen P0, 2, 4 und 6 gezeigt, die chondrogene Differenzierung nur in P2.

Die Platten wurden unter dem Lichtmikroskop beurteilt. Dazu wurden ganze wells der Differenzierungsreihe und der Negativkontrolle (mit Normalmedium behandelte hMSC) untersucht und die Prozentzahl der differenzierten (positiven) Zellen festgehalten und verglichen. Positive Zellen bei der osteogenen Differenzierung erschienen als pink-violett gefärbte Zellen, schwach positive als hell pink und negative Zellen imponierten durch die Gegenfärbung blau.

Bei positiven Zellen der Adipogenese zeigten sich stark rote Vakuolen im Zellplasma, wohingegen negative Zellen durch die Gegenfärbung nur bläulich erschienen.

Chondrogene Zellen imponierten grün-bläulich.

Die Daten wurden fotografisch dokumentiert.

2.2.4 Kardiomyogene Differenzierung

Die hMSC wurden in den jeweiligen Passagen mit den kardiomyogenen Differenzierungsmedien sowie mit Normalmedium kultiviert.

2.2.4.1 Aza

Das Differenzierungsmedium 5-Azacytidin („Aza“) bestand aus AlphaMEM Kulturmedium mit einer Konzentration von 10 μ M 5-Azacytidin.

Die Zellen wurden zunächst in Passage P1 48 h mit diesem Differenzierungsmedium behandelt und danach durch Kulturmedium ohne Zusätze ersetzt.

2.2.4.2 Noggin

Nach Yuasa et al. wurde das kardiomyogene Differenzierungsmedium Noggin aus 445 ml AlphaMEM, 50 ml inaktiviertem FCS, 5 ml 1% Penicillin/Streptomycin und 75 µl >90% recombinant mouse Noggin, das in 7,5 ml PBS und 7,5 mg BSA gelöst war, hergestellt.

Das Noggin-Medium blieb 72 h auf den Zellen. Danach wurden die Zellen nur noch mit reinem Kulturmedium kultiviert.

2.2.4.3 DMSO

Für das DMSO Medium wurden zu 89% AlphaMEM, 10% inaktiviertes FCS, 1% Penicillin/Streptomycin und 2% DMSO gegeben.

Das Noggin-Medium blieb 96 h auf den Zellen. Danach wurden die Zellen nur noch mit reinem Kulturmedium kultiviert.

2.2.4.4 FGF+BMP

Das Medium FGF2+BMP2 nach Kawai et al. setzte sich aus 445 ml AlphaMEM, 50 ml inaktiviertem FCS und 5 ml 1% Penicillin/Streptomycin zusammen. Diesem wurden 0,5 µg >97%iges FGF2 in 50 µl PBS + 0,1% BSA-Lösung und 0,1 µg >95%iges BMP2 in 10 µl 4 mM HCl + 0,1% BSA-Lösung beigefügt und gut geschüttelt.

Die Zellen wurden für 72 h mit diesem Medium und dann für die übrige Zeit mit Kulturmedium inkubiert.

2.2.4.5 VEGF

Für das kardiomyogene Differenzierungsmedium nach Xaymardan et al. VEGF + FGF2 + PDGF, das im Folgenden kurz „VEGF“ genannt wird, wurde zunächst zu 444 ml IMDM 50 ml inaktiviertes FCS, 5 ml 1% Penicillin/Streptomycin und 25 mg hochmolekulares Heparin gegeben. 5 µg >97%iges VEGF wurden in 500

µl PBS mit 0,1% BSA gelöst und zum IMDM zugegeben. Um die gewünschte Konzentration im fertigen Medium von 2,5 µg pro 500 ml zu erhalten, wurden 2,5 µg >97%iges FGF2 in 50 µl PBS und 0,1% BSA gelöst und wieder dem IMDM hinzugefügt. Zuletzt wurden noch 5 µg >97%iges PDGF in 500 µl 4 mM HCL und 0,1% BSA Lösung dem Medium hinzu gegeben.

Die MSC wurden permanent mit dem VEGF-Medium kultiviert.

2.2.4.6 ITAD

Das Medium wurde nach Shim et al. angesetzt: 300 ml DMEM-LG wurden mit 140 ml MCBD-201, 500 mg bovinem Insulin (≥ 27 USP units/mg) in 2 ml PBS, 275 mg > 90%iges humanem Transferrin in 2,75 ml PBS, 250 µg Natrium (Natrium) Selenite in 250 µl PBS, 25 g BSA, 235 µg Linoleic acid in 235 µl PBS, 10^{-4} M L-Ascorbic acid 2 Phosphate in 1,5 ml PBS (frisch angesetzt), 10^{-9} M Dexamethason, 5 ml 1% Penicillin/Streptomycin und 50 ml inaktiviertem FCS ergänzt.

Zur Herstellung des MCBD-201 wurde zuerst der pH-Wert des DMEM gemessen. Dann wurde das MCBD in 900 ml Ampuwa gemischt und unter Rühren der pH-Wert mit NaOH oder HCL 0,1 bis 0,3 Einheiten unter den pH-Wert des Mediums eingestellt. Diese Lösung wurde mit Ampuwa auf 1 l aufgefüllt und steril filtriert.

Auch dieses Medium wurde während der gesamten Zeit auf die zu differenzierenden Zellen gegeben.

2.2.5 Immunzytochemie

2.2.5.1 Versuchsaufbau

Die von jeder Passage aller 3 Populationen in chamber slides angezüchteten hMSCs und Zellen der kardiomyogenen Differenzierungslinien wurden bei 80%iger Konfluenz immunzytochemisch gefärbt. Dafür wurden Antikörper benutzt, die spezifisch für Proteine in Muskelzellen und Kardiomyozyten sind,

nämlich sarcomerisches Aktin, slow muscle cardiac myosin, heavy chain cardiac myosin, cardiac Troponin I und alpha ANP.

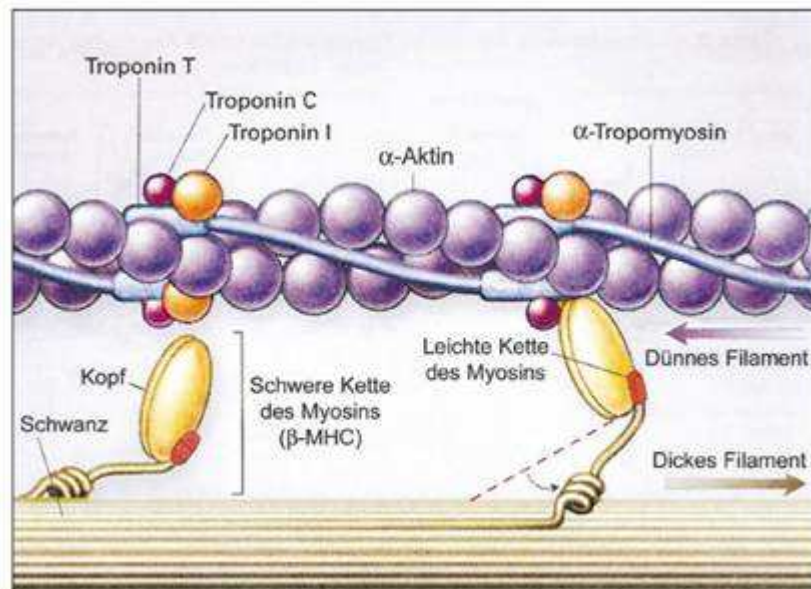


Abbildung 4: Aufbau eines kardialen Sarkomers

Bearbeitet nach Spirito et al. (81)

Aktin ist ein Zytoskelettprotein und kommt in allen Muskelzellen vor. Das Troponin I-Protein bindet speziell in Herzmuskelzellen Aktin und bildet so zusammen mit Myosin den kontraktile Teil der Myokardzellen. Myosin, ein ATP verbrauchendes Motorprotein, besteht aus Aminosäureketten, die in mehrere leichte Ketten und eine schwere Kette unterteilt werden. Weiterhin werden verschiedene Isoformen unterschieden, das slow muscle und fast muscle Myosin. Myozyten, die slow muscle Myosin enthalten, sind weniger schnell ermüdbar und gewinnen oxidativ ihre Energie, was für die Herztätigkeit unentbehrlich ist.

ANP als ein Peptidhormon wird bei einem Dehnungsreiz des Herzvorhofs (z. B. bei Hypervolämie) von dort lokalisierten Myozyten ausgeschüttet und bewirkt eine Steigerung der Harnausscheidung, um so das im Körper zirkulierende Volumen zu vermindern.

Als Sekundärantikörper wurden mit dem Farbstoff Alexa Fluor 488 konjugierte Antikörper verwendet, die bei Anregung grünes Licht emittieren.

Um die Zellkerne farblich abzugrenzen, wurde noch ein Mounting Medium mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) benutzt. DAPI wird zur Markierung von DNA eingesetzt, da es sich an Adenin/Thymin-reiche Regionen in der DNA anlagert und bei Anregung mit ultraviolettem Licht blau fluoresziert.

2.2.5.2 Prinzip der immunzytochemischen Färbung

Bei der immunzytochemischen Färbung werden mit Hilfe von Antikörpern (AK) intrazelluläre sowie extrazelluläre, membranständige Strukturen bei in vitro kultivierten Zellen nachgewiesen. In dieser Studie wurde diese Methode zum Nachweis von intrazellulären Proteinen benutzt. Das Prinzip beruht auf einer AK-Antigen-Reaktion, wobei der eingesetzte Primär-AK eine Affinität für ein ganz spezifisches Epitop (Gewebeeigenschaft oder auch Antigen) aufweist und mit diesem eine Bindung eingeht. Um diese Reaktion sichtbar zu machen, wurde ein für den Primär-AK spezifischer Sekundär-AK, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist, verwendet. Durch Bindung des Sekundär-AKs an den Fc-Teil des Primär-AKs wird das gesuchte Antigen indirekt detektiert. Die Immunfluoreszenz-Mikroskopie ermöglicht dann die spezifische Darstellung des Sekundär-AK – Primär-AK – Antigen – Komplexes.

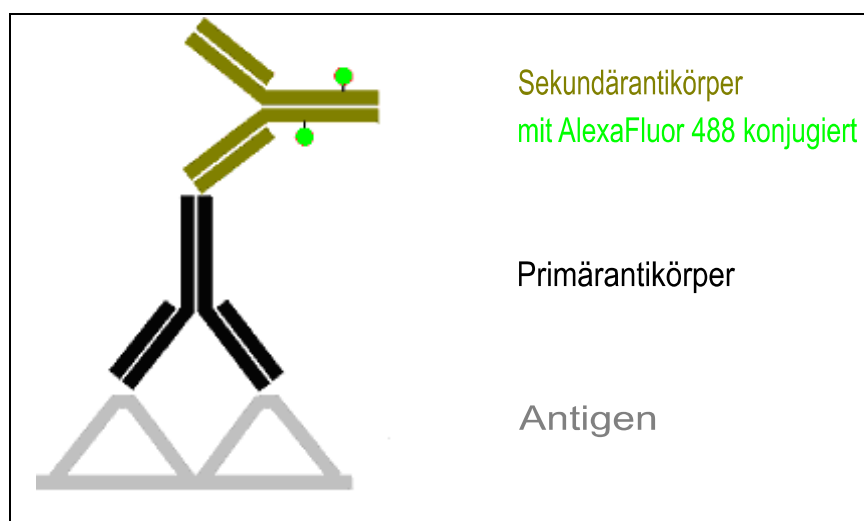


Abbildung 5: Indirekte immunzytochemische Färbung bearbeitet nach www.pathologieonline.de

2.2.5.3 Prinzip der Fluoreszenz

Unter Fluoreszenz versteht man die Erscheinung, dass ein Molekül (Fluorochrom) durch Absorption von Licht spezifischer Wellenlänge (Photonen) in einen angeregten Zustand versetzt wird und durch Emission von längerwelligem Licht in seinen Grundzustand zurückkehrt. Dieses längerwellige Licht kann dann sichtbar gemacht werden.

2.2.5.4 Zellkultivierung

Die Zellen wurden in chamber slides mit dem jeweiligen Differenzierungsmedium bzw. mit Kulturmedium im Inkubator bei 37°C mit 5% CO₂ bei >98% Luftfeuchtigkeit kultiviert bis die Zellen etwa 80% der Objektträgeroberfläche bedeckten.

Pro chamber slide wurden dazu 1×10^4 Zellen in 2 ml Medium bei jeder Passage ausgesät. Der erste Medienwechsel wurde nach 5 Tagen durchgeführt, die weiteren alle 3 Tage. Dabei wurde das alte Medium vorsichtig mit einer Glaspipette abgezogen, einmal mit 1 ml PBS gespült und dann 2 ml frisches Medium langsam in die Kammern gegeben.

2.2.5.5 Herstellung der Fixierungslösung

Zur Erhaltung des Zellgerüsts und der Form der dann nicht mehr vitalen Zellen bei der Färbung wurde eine 4%ige Paraformaldehydlösung in PBS mit 4% Sucrose als Fixierungslösung verwendet.

2.2.5.6 Herstellung der Permeabilisierungs- und Blocking Lösung

Um das Eindringen der AK in die Zelle zu erleichtern wurde eine Permeabilisierungs- und Blocking Lösung verwendet. Dazu wurden PBS, 1% BSA und 0,1% Triton X-100 gemischt und anschließend gut geschüttelt.

2.2.5.7 Immunzytochemische Färbung

Zuerst wurde das Medium mit einer Glaspipette abgezogen und ein- bis zweimal mit PBS gespült. Dann wurden 2 ml Fixierungsreagenz zugegeben und die chamber slides 20-40 min bei RT inkubiert. Das Reagenz wurde wieder mit einer Glaspipette abgezogen und es folgte ein weiterer Waschschrift, bei dem die chamber slides dreimal je 10 min mit PBS gespült wurden. Darauf schloss sich die Inkubation mit 2 ml Permeabilisierungs- und Blocking Lösung mit 5 µl des jeweiligen Primär-AKs (1:400 Verdünnung) für 24 – 48 h bei 4°C im Dunkeln an.

Wieder wurde danach die Lösung abgezogen und dreimal je 10 min mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 2 ml PBS und 5 µl des zugehörigen Sekundär-AKs (1:400 Verdünnung) in die chamber slides gegeben und dann für 1-2 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Nachdem diese Lösung abgezogen und erneut dreimal je 10 min mit PBS gewaschen worden war, wurden die Kammeraufsätze von den Objektträgern mittels einer Abhebehilfe entfernt. Zuletzt wurden 2 Tropfen DAPI-Eindeckmedium und das Deckglas auf die Objektträger aufgebracht und mit klarem Nagellack versiegelt, um die Fluoreszenz besser zu konservieren und das Austrocknen des Präparats zu verhindern. Die fertigen Präparate wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop bei durch die entsprechenden Filter (450-490 nm (ALEXA Fluor488) bzw. 365 nm (DAPI)) ausgewertet.

Folgende AK wurden verwendet:

a) Primärantikörper:

- | | |
|--------------------|--|
| Population h21: | Rabbit anti alpha ANP IgG |
| | Mouse anti slow muscle Myosin IgG1 |
| | Mouse anti human cardiac Troponin I IgG2b |
| Population h20+38: | Mouse alpha sarcomeric Aktin IgM |
| | Mouse anti heavy chain cardiac Myosin IgG1 |
| | Mouse anti cardiac Troponin I IgG2b |

b) Sekundärantikörper:

Aktin	→	anti Mouse IgM ALEXA Fluor488
ANP	→	anti Rabbit IgG ALEXA Fluor488
Myosin	→	anti Mouse IgG ALEXA Fluor488
Troponin I	→	anti Mouse IgG ALEXA Fluor488

2.2.5.8 Erstellung der Negativkontrolle

Zur Erstellung der Negativkontrollen für die kardiomyogene Differenzierung wurden hMSC lediglich mit den Sekundär-AK ohne vorherige Zugabe der Primär-AK behandelt. So wurde gezeigt, dass eine Fluoreszenz nur dann nachgewiesen wurde, wenn der Sekundär-AK an ein Primär-AK, der an ein Antigen gebunden ist, binden kann.

Hierfür wurde das Medium aus den chamber slides, in die bisher unbehandelten MSC der Passage 2 ausgesät wurden, abgezogen und ein- bis zweimal mit PBS gespült. Daraufhin wurden 2 ml Fixierungsreagenz zugegeben und die chamber slides 20-40 min bei RT inkubiert. Das Reagenz wurde danach aus den chambers slides abgezogen und nochmals dreimal je 10 min mit PBS gespült. Dann schloss sich die Inkubation mit 2 ml Permeabilisierungs- und Blocking Lösung diesmal ohne Primär-AK für 24 – 48 h bei 4°C im Dunkeln an. Wieder wurde danach die Lösung abgezogen und dreimal je 10 min mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 2 ml PBS und 5 µl jedes der 4 Sekundär-AK (anti Rabbit IgG ALEXA Fluor488, anti Mouse IgG ALEXA Fluor488, anti Mouse IgG ALEXA Fluor488, anti Mouse IgM ALEXA Fluor488) in die chamber slides gegeben und dann für 1-2 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Nachdem diese Lösung abgezogen und erneut dreimal je 10 min mit PBS gewaschen worden war, wurden, wie oben schon beschrieben, die Kammeraufsätze von den Objektträgern mittels einer Abhebehilfe entfernt und die Objektträger mit 2 Tropfen DAPI-Eindeckmedium betropft. Das Deckglas wurde anschließend aufgebracht und der gesamte Objektträger mit klarem Nagellack versiegelt. Die

fertigen Präparate wurden wieder unter dem Fluoreszenzmikroskop bei verschiedenen Vergrößerungen durch die entsprechenden Filter (450-490 nm (ALEXA Fluor488) bzw. 365 nm (DAPI)) ausgewertet.

2.2.5.9 Auswertung

Zur Auswertung wurden die Objektträger unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt. Dabei galten die Zellen als positiv für den angewendeten Marker, die sie sich klar in ihrer Leuchtintensität vom Grundrauschen abhoben und nicht mit der Negativkontrolle übereinstimmten.

2.2.6 Proliferationskinetik

2.2.6.1 Zellkultivierung

Die Zellen wurden sofort nach dem Entnehmen aus dem Stickstofftank mit Handwärme aufgetaut und mit 4 ml Kulturmedium verdünnt in ein PP-Röhrchen überführt. Dieses wurde bei 1200 U/min mit maximaler Bremse für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen, um so das Einfriermedium, hochkonzentriertes DMSO enthaltend, zu eliminieren. Die Zellen wurden anschließend in 3 ml Kulturmedium resuspendiert. Für die Zellzahlbestimmung mit dem Cell Counter Casy wurden dann 100 µl Zellsuspension entnommen und im Messröhrchen mit 5 ml Casyton vermischt, welches anschließend mit weiteren 5 ml Casyton bedeckt wurde. Bis auf 3×10^5 Zellen wurde der Rest der Zellen verworfen und diese in 60 ml Kulturmedium gelöst. Davon wurden je 2 ml pro well auf insgesamt 30 wells verteilt, um in jedem well 1×10^4 Zellen auszusäen. Mit ITAD und VEGF differenzierte Zellen wurden bei allen Schritten nicht mit Kulturmedium, sondern mit dem jeweiligen Differenzierungsmedium behandelt.

Anschließend wurden die Zellen bei 37°C mit einem CO₂ Anteil von 5% im Inkubator bei >98%iger Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Der Medienwechsel wurde alle 3 Tage ohne PBS Spülung durchgeführt, der erste nach 3 Tagen. Dazu wurde das Medium mit einer Pasteurpipette und der Saugpumpe unter der Sterilbank vorsichtig abgezogen um die adhärenen Zellen nicht zu beschädigen. Daraufhin folgte die Zugabe von 2 ml frischen Kulturmedium bzw. Differenzierungsmedium pro well.

2.2.6.2 Messungen der Zellzahlen sowie Erstellung der Proliferationskinetik

Je 2 Proben aus je 2 wells wurden pro Differenzierung, Passage und Population alle 3 Tage gemessen. Dafür wurde zuerst das Medium abgezogen und die wells mit PBS gespült. Dann wurden die Zellen mit 500 µl auf etwa 30°C angewärmter Accutase abgelöst (7 – 10 min Einwirkzeit im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂) und in PP-Röhrchen gegeben. Die wells wurden mit 3 ml AlphaMEM nachgespült um auch mögliche Rest-Zellen zu entnehmen. Die Zellsuspension wurde abzentrifugiert (1200 U/min 5 min lang mit voller Bremse) und der Überstand mit Pasteurpipetten abgesaugt. Die Zellen wurden dann in 250 µl (bzw. in 500 µl bis 3 ml Medium bei späteren Messungen mit größeren Zellpellets) AlphaMEM resuspendiert.

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit dem Cell Counter Casy, indem im Messröhrchen zu 5 ml Casyton 100 µl Zellsuspension gegeben wurde und diese Mischung nochmals mit 5 ml Casyton bedeckt wurde. Von jedem well wurden 2 solcher Messungen durchgeführt.

Aus jeder Probe wurde die Gesamtzahl der vitalen Zellen pro Milliliter bestimmt. Der Cell Counter Casy bestimmt den Durchschnitt aus 3 Einzelmessungen pro Probe. Demnach kommt man auf insgesamt 6 Messungen pro well, was die Genauigkeit der Ergebnisse erhöht.

Die Ergebnisse wurden mittels eines Seriell/USB Kabels über eine serielle Schnittstelle auf dem Notebook mit HyperTerminal direkt vom Cell Counter Casy empfangen.

Die Auswertung der Proliferationskinetik umfasst 3 Zellpopulationen (h20, h21, h38), mit bis zu 7 Differenzierungsschemata inklusive den unbehandelten

hMSC (Aza, DMSO, FGF+BMP, MSC, Noggin, ITAD, VEGF) und bis zu 8 Passagen (P1 – P8), was insgesamt 76 Zellreihen ergibt.

Zunächst wurden die arithmetischen Mittelwerte der absoluten Zellzahlwerte aller 4 Proben für jede Population, jedes Differenzierungsschema und jede Passage berechnet. Die Zellzahlwerte wurden in den Messungen ermittelt, welche alle drei Tage stattfanden.

Diese Mittelwerte wurden logarithmiert und dann als Wachstumskurve gegen die Zeit aufgetragen.

Zur Charakterisierung der Proliferationskinetik eignet sich die Populationsverdoppelungszeit (PDT). Sie benennt die benötigte Zeit, um innerhalb exponentiellen Wachstums die Zellzahl zu verdoppeln. Hierfür wurde aus der Steigung der einzelnen Wachstumskurven die PDT wie folgt berechnet:

$$PDT = \text{Log}2/m_1$$

m_1 : Wachstumsrate in 1/d

PDT: in Tagen (d)

Zur Prüfung auf statistisch signifikante Unterschiede der Wachstumsgeschwindigkeit zwischen den verschiedenen Zellreihen wurde der Tukey-Kramer-Test eingesetzt. Die statistischen Berechnungen sowie die Auswertungen erfolgten mit freundlicher Unterstützung durch Herrn Professor em. K. Dietz, ehem. Direktor des Instituts für Biometrie der Universität Tübingen.

3 Ergebnisse

3.1 Three-lineage-Differentiation

Nach 21 Tagen unter Bedingungen der adipogenen Differenzierung (s. 2.2.3.2) ließen sich die in den Zellen gebildeten typischen, Fett enthaltenden Vesikel mit der Red O-Färbung (s. 2.2.3.9) einfärben (Abbildung 6). Ebenso gelang nach 21 Tagen unter Bedingungen osteogener Differenzierung (s. 2.2.3.1) mit der Färbung für alkalische Phosphatase (s. 2.2.3.8) der Nachweis dieses osteogenen Markers (Abbildung 6). 28 Tage nach Start der chondrogenen Differenzierung konnte man knorpel-typische saure Mukopolysaccharide mit der Alcianblau-Färbung lichtmikroskopisch zeigen (Abbildung 6).

In jeder getesteten Passage (für die adipogene und osteogene Differenzierung in P0, 2, 4, 6 und für die chondrogene Differenzierung in P2) fiel die three-lineage Differentiation deutlich positiv für die spezifischen adipogenen, chondrogenen und osteogenen Marker bei den behandelten Zellen aus.

Bei den Negativkontrollen kam es in höheren Passagen (P4 und P6) zu einer gering erhöhten adipogenen und osteogenen Spontandifferenzierung (Nachweis von Fettvakuolen bzw. alkalischer Phosphatase bei einzelnen Zellnestern) der nur mit reinem Kulturmedium behandelten hMSC ohne dass die Kulturen als positiv gewertet werden konnten. Bei der chondrogenen Differenzierung gab es keine Negativkontrolle, da hier die Pelletmethode angewendet wurde.

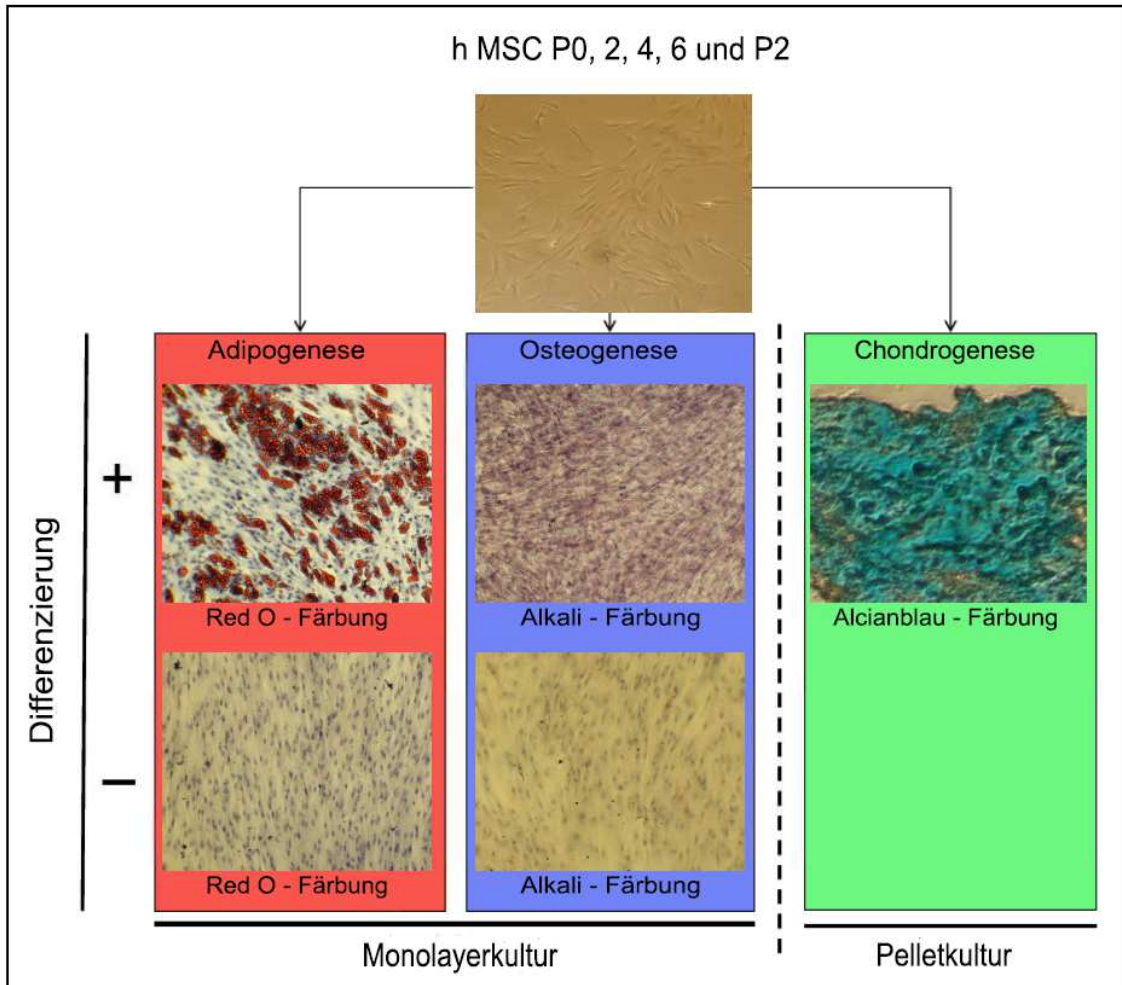


Abbildung 6: adipogenes, osteogenes, chondrogenes Differenzierungspotential

Darstellung der nativen MSC vor Differenzierung.
 Negativkontrollen: MSC ohne Behandlung mit Differenzierungsmedium.
 Bei positiver Adipogenese sind deutlich Fettvakuolen in den Zellen zu erkennen, nicht jedoch in der Negativ-Kontrolle.
 Auch zeigt sich bei erfolgreicher Osteogenese eine violette Anfärbung der alkalischen Phosphatase, die in der Negativ-Kontrolle nicht sichtbar ist.
 Der Nachweis der positiven Chondrogenese konnte mir einer grün-blauen Anfärbung der sauren Mukopolysaccharide der Matrix in der Pelletkultur gezeigt werden.
 (Vergrößerung x100)

3.2 Immunzytochemie

Um festzustellen, ob die hMSC unter den entsprechenden Medien eine kardiomyogene Differenzierung zeigen, wurden die Zellen mit Antikörpern

gegen kardiomyozytenspezifische Antigene behandelt, welche dann mit der indirekten Immunzytochemie nachgewiesen wurden. Die als Negativkontrolle dienenden hMSC wurden lediglich mit den Sekundär-AK behandelt, welche keine strukturierte, auf die Zellen beschränkte Fluoreszenz zeigten (Abbildung 11).

Die auf Objektträgern ausgesäten Zellen aller Populationen jeder Passage und jedes Differenzierungsschemata wurden nach der Färbung im Fluoreszenzmikroskop komplett durchgemustert und negative oder gegebenenfalls positive Zellen fotografisch dokumentiert. Die drei unterschiedlichen Populationen wurden dabei zusammengekommen und als eine Einheit dargestellt.

Abbildungen 7 – 10:

Gegenüber verschiedenen Differenzierungsmedien exponierte hMSCs mit MSC Stark strukturiert grün: positiver Antigennachweis, blau: Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI.

Maßskala: 20 µm

a) Aktin

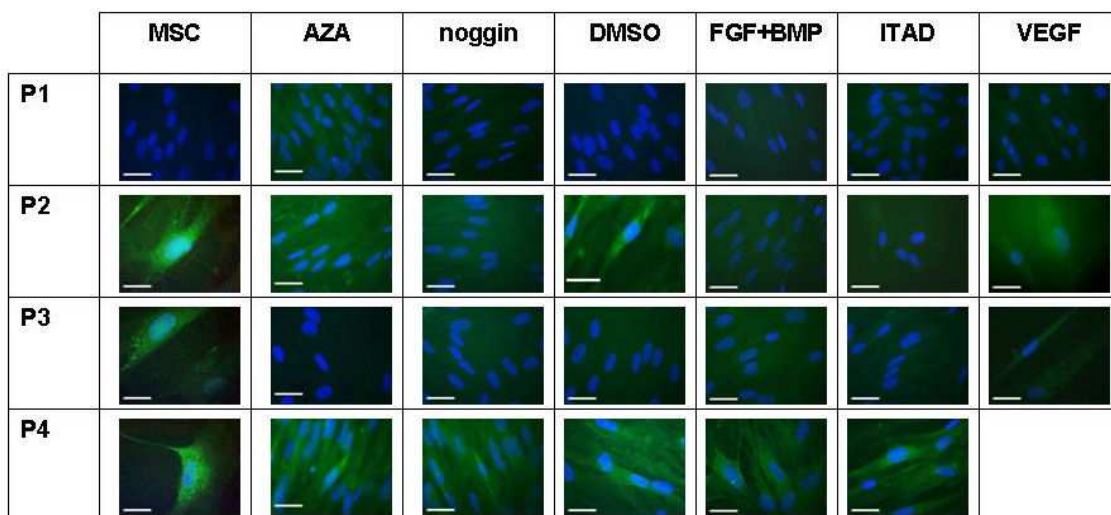


Abbildung 7: Expression von kardialem Aktin von unbehandelten MSCs und MSCs unter kardiomyogener Differenzierung.

b) Atriales natriuretisches Peptid (ANP)

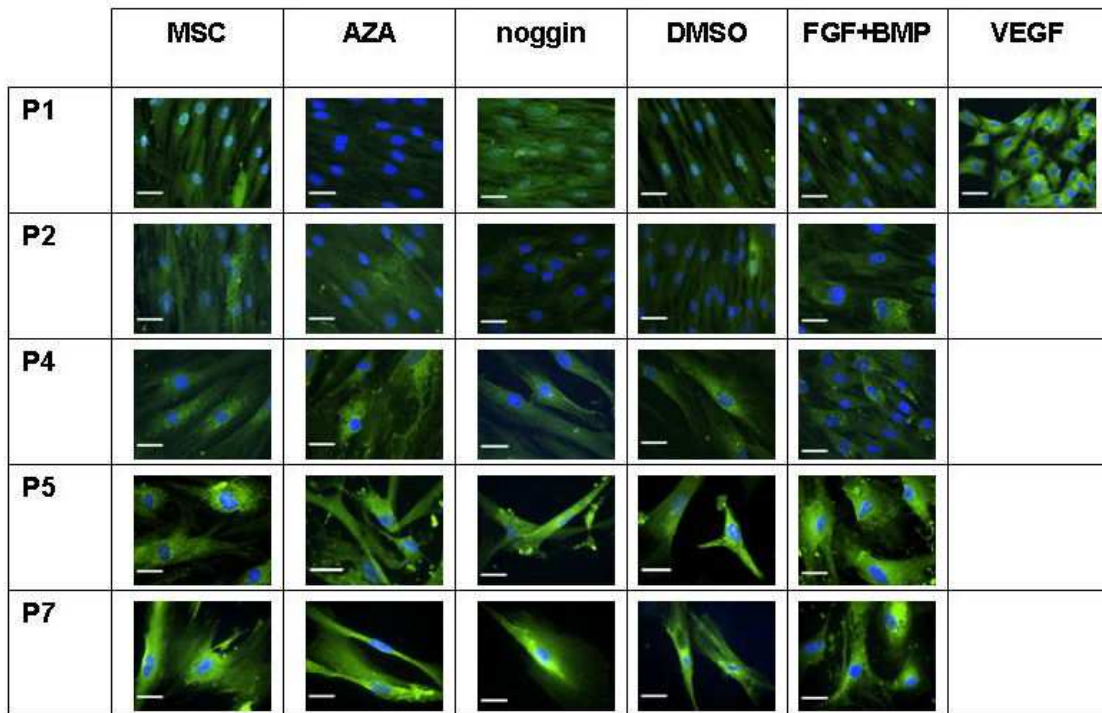


Abbildung 8: Expression von ANP von unbehandelten MSCs und MSCs unter kardiomyogener Differenzierung.

c) Slow muscle Myosin

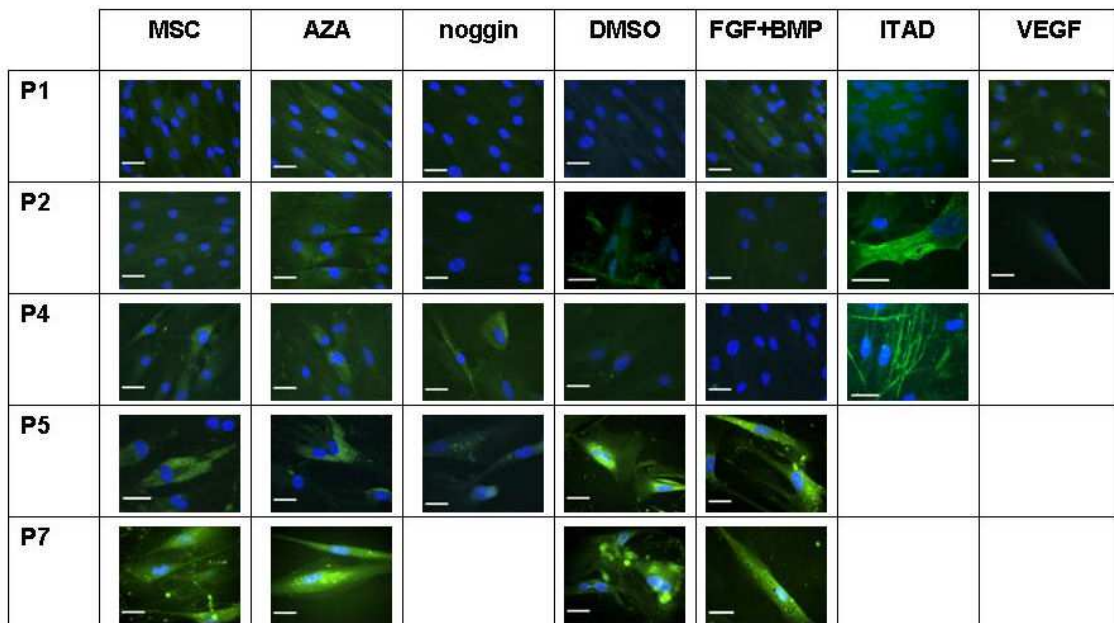


Abbildung 9: Expression von slow muscle myosin von unbehandelten MSCs und MSCs unter kardiomyogener Differenzierung

d) Troponin I

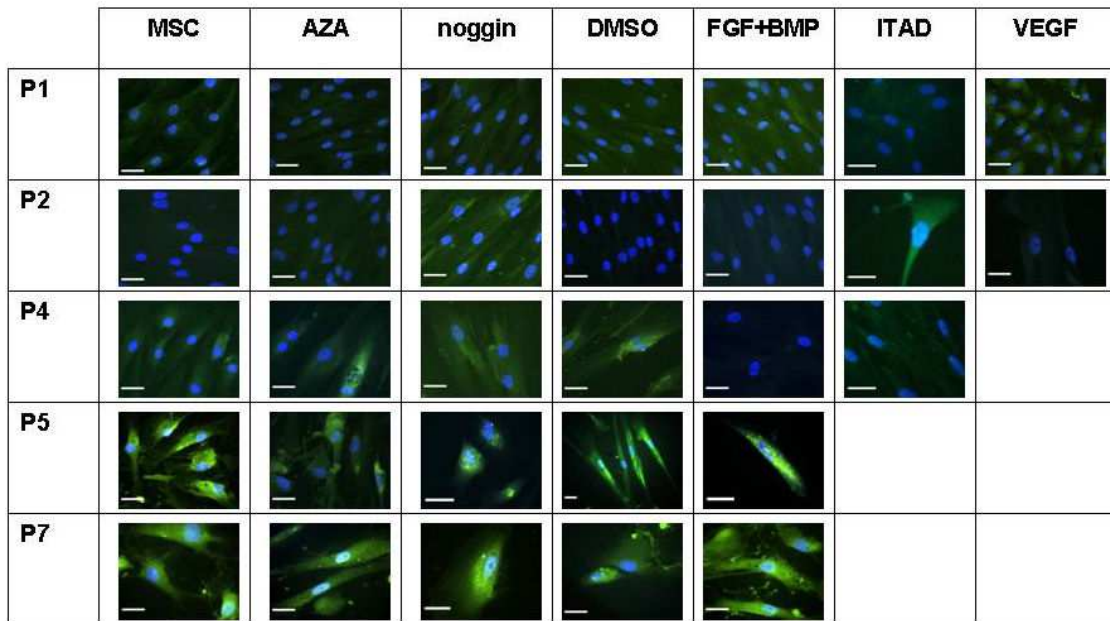


Abbildung 10: Expression von kardialem Troponin I von unbehandelten MSCs und MSCs unter kardiomyogener Differenzierung.

e) Negativkontrollen

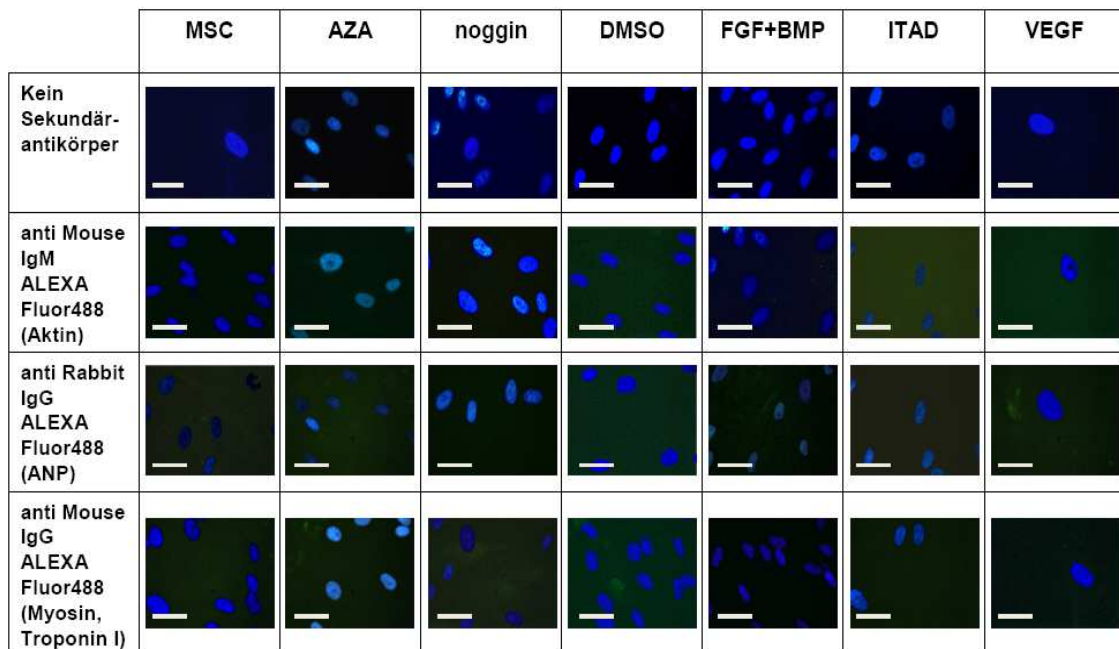


Abbildung 11: Negativkontrollen der mit kardiomyogenen Zusätzen behandelten hMSC (lediglich mit dem Sekundär-AK gefärbte hMSC (h20, P2))

In der folgenden Tabelle 2 sind die detaillierten Ergebnisse der immunzytochemischen Färbung dargestellt, nach Differenzierungsschemata geordnet. Die Intensität der Antigenexpression wird dabei für den jeweiligen Marker quantitativ mit einer Skala von negativ (-) über eingeschränkt positiv ((+)) bis deutlich positiv (+) bewertet.

MSC	P1	P2	P3	P4	P5	P7
Aktin	-	+	+	+		
ANP	(+)	(+)		(+)	+	+
Myosin	-	-		-	(+)	(+)
Troponin I	-	-		-	+	(+)
Aza						
Aktin	-	(+)	-	(+)		
ANP	-	(+)		(+)	+	+
Myosin	-	-		-	(+)	+
Troponin I	-	-		(+)	(+)	(+)
Noggin						
Aktin	-	-	-	(+)		
ANP	(+)	-		(+)	+	++
Myosin	-	-		-	-	
Troponin I	-	(+)		(+)	+	+
DMSO						
Aktin	-	(+)	-	(+)		
ANP	-	-		(+)	+	+
Myosin	-	-		-	+	+
Troponin I	-	-		(+)	+	(+)
FGF+BMP						
Aktin	-	-	-	(+)		
ANP	-	(+)		(+)	+	++
Myosin	-	-		-	+	+
Troponin I	-	-		-	+	+
ITAD						
Aktin	-	-	-	(+)		
ANP						
Myosin	-	+		+		
Troponin I	-	(+)		-		

VEGF	P1	P2	P3	P4	P5	P7
Aktin	-	-	-			
ANP	+					
Myosin	-	-				
Troponin I	-	-				

Tabelle 2: Immunzytochemischer Nachweis kardiomyogener Proteinexpression bei hMSC und kardiomyogen differenzierten Zellen

(+) eingeschränkt positiv, + positiv, ++ deutlich positiv, - negativ für die Marker ANP, Aktin, Myosin und Troponin I

grau hinterlegte Flächen: zu geringes Zellmaterial für Färbung

Aufgrund von zum Teil mangelndem Zellwachstum auf den Objektträgern oder Verlust von Zellen bei den Färbeschritten nicht jede Differenzierungsreihe zu jeder Passage ausgewertet beziehungsweise fotografisch dokumentiert werden.

ANP zeigte die Tendenz, bei allen Differenzierungsprotokollen in den höheren Passagen (P4 – P7) positiv bis deutlich positiv zu erscheinen (ausgenommen ITAD, wo kein ANP-AK zur Verfügung stand). Bei der Gruppe VEGF konnte nur Passage 1 wegen mangelndem Zellwachstum untersucht werden, allerdings waren die mit VEGF behandelten hMSCs in dieser Passage, im Gegensatz zu allen anderen Differenzierungsmedien bzw. dem Normalmedium, deutlich ANP positiv. Die mit Normalmedium behandelten Kontroll-MSC waren ab Passage 1 schwach, ab P5 deutlich ANP positiv.

Mit dem AK gegen Aktin zeigten sich in Passage 4 schwach positive Ergebnisse bei allen Ansätzen (Ausnahme wieder in der VEGF Gruppe, da hier keine Passage 4 erreicht wurde), bei DMSO und Aza auch in P2, jedoch nicht in P3. MSC mit Normalmedium waren jedoch in P2 bis P4 durchgehend positiv.

Myosin konnte bei ITAD schon ab P2 als streifig angefärbte Struktur im Zytoplasma nachgewiesen werden. Unter der Behandlung mit Aza, DMSO und FGF+BMP waren ab P5 Myosin positive Zellen nachweisbar. Unter der Behandlung mit Noggin und VEGF waren keine Myosin positiven Zellen nachweisbar. Die mit Normalmedium behandelten Kontroll-hMSC waren ab P5 eingeschränkt positiv für Myosin.

Troponin I konnte ab P4 eingeschränkt bis deutlich positiv unter den Bedingungen mit Aza und DMSO nachgewiesen werden, bei Zellen der Noggin-Gruppe bereits ab P2 und bei den mit FGF+BMP behandelten Zellen erst ab P5. Bei ITAD-Zellen zeigte sich eine Positivität lediglich in P2, bei VEGF fiel in den untersuchten Passagen P1 und 2 keinen positiven Nachweis auf. Auch hier fiel bei den mit Normalmedium behandelten hMSCs ein positiver Nachweis für Troponin I ab P5 auf.

3.3 Proliferationskinetik

Die mit den kardiomyogenen Differenzierungsmedien bzw. mit Normalmedium behandelten hMSCs zeigten teilweise unterschiedliche interpolierte Wachstumskurven, die aus den arithmetischen Mittelwerten der gemessenen Zellzahlwerten, die im Anschluss logarithmiert wurden, aufgetragen wurden: Meist waren mehrphasige Wachstumskurven, die zuerst ein Plateau bildeten, dann ein lineares Wachstum und gegen Ende entweder wieder ein Plateau oder einen linearen Abfall zeigten, zu beobachten. Seltener lagen einphasige Wachstumskurven vor.

Abbildung 12, 13, 14: Exemplarische Darstellung dreier Wachstumsverläufe:

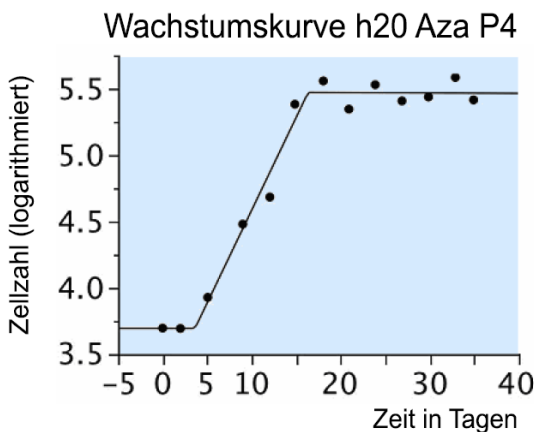


Abbildung 12: interpolierte Wachstumskurve h20 Aza P4

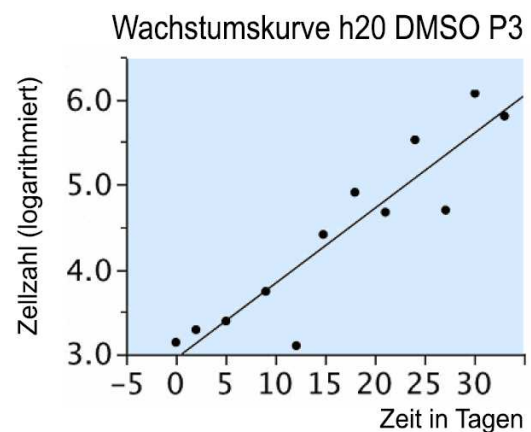


Abbildung 13: interpolierte Wachstumskurve h20 DMSO P3

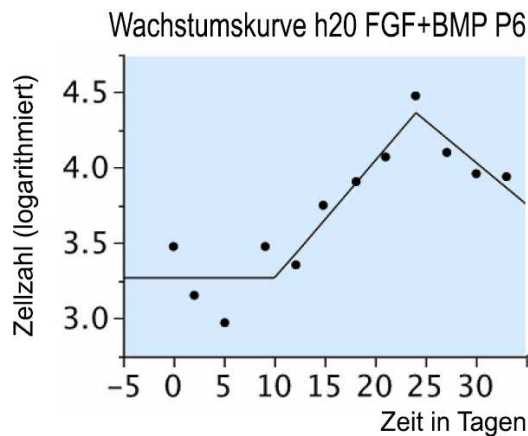


Abbildung 14: interpolierte Wachstumskurve h20 FGF+BMP P6

Die Wachstumsrate, die der Steigung der logarithmierten Wachstumsverläufe entspricht, gibt an, wie viele Zellen pro Tag neu zur Kolonie hinzugekommen sind, die prozentuale Wachstumsrate gibt wiederum das prozentuale Hinzukommen einer Zellzahl pro Tag an.

Die wie oben beschriebene aus den Steigungen der Wachstumsverläufe berechnete Populationsverdopplungszeit (PDT) eignet sich zur Darstellung der Proliferationskinetik. Dabei handelt es sich um die Zeit in Tagen, die eine Zellpopulation benötigt um sich in ihrer Zellzahl zu verdoppeln. Nachfolgend sind die Ergebnisse tabellarisch dargestellt.

Differenzierungs-schemata	Populations-nummer	Pas-sage	$m_1 =$ Wachstumsrate in 1/d	Prozentuale Wachstumsrate in %/d ($m_1 \cdot 100$)	PDT in d (\log_2/m_1)
Aza	20	2	0,0423099831	4,23099831	7,114869201
Aza	20	3	0,409020382	40,90203817	0,735977983
Aza	20	4	0,139778872	13,9778872	2,15361586
Aza	20	5	0,309452089	30,94520893	0,972783853
Aza	20	6	0,073791517	7,37915174	4,079466127
Aza	21	2	0,130903098	13,09030976	2,299639972
Aza	21	3	0,081813574	8,1813574	3,679462722
Aza	21	4	0,072151242	7,21512419	4,172208097
Aza	21	5	0,077414819	7,74148187	3,888531947
Aza	21	7	0,029203032	2,92030315	10,30817625
Aza	21	8	0,027645141	2,76451405	10,88907454

Aza	38	2	0,044918212	4,49182118	6,701735969
Aza	38	3	0,027907847	2,79078471	10,78657177
DMSO	20	2	0,043616583	4,36165831	6,90173265
DMSO	20	3	0,088373861	8,83738609	3,406323913
DMSO	20	4	0,078462559	7,84625591	3,8366069
DMSO	20	5	0,065481483	6,54814829	4,597177436
DMSO	21	2	0,214726078	21,47260778	1,401925648
DMSO	21	3	0,105588418	10,55884177	2,850975535
DMSO	21	4	0,028793544	2,87935444	10,45477387
DMSO	21	5	0,05390217	5,39021697	5,584747281
DMSO	21	7	0,012975724	1,29757241	23,19947568
DMSO	21	8	0,024001354	2,40013543	12,54220874
DMSO	38	2	0,027824258	2,78242576	10,81897674
DMSO	38	3	0,057326959	5,73269594	5,251106963
FGF+BMP	20	2	0,154442138	15,44421382	1,949144185
FGF+BMP	20	3	0,150271615	15,02716154	2,003239234
FGF+BMP	20	4	0,082856116	8,28561164	3,633165646
FGF+BMP	20	5	0,045744362	4,57443615	6,58070166
FGF+BMP	20	6	0,078862303	7,88623033	3,817159569
FGF+BMP	21	2	0,173423979	17,34239788	1,735803767
FGF+BMP	21	3	0,081923408	8,19234079	3,674529703
FGF+BMP	21	4	0,072738159	7,27381594	4,138542935
FGF+BMP	21	5	0,127299234	12,72992336	2,364743189
FGF+BMP	21	7	0,062358945	6,23589449	4,827374744
FGF+BMP	21	8	0,077780511	7,77805113	3,870249638
FGF+BMP	38	2	0,053423797	5,34237965	5,634754836
FGF+BMP	38	3	0,038813852	3,88138524	7,755736085
FGF+BMP	38	4	0,067883265	6,78832646	4,434524436
MSC	20	2	0,267102066	26,71020659	1,127022341
MSC	20	3	0,11897893	11,89789302	2,530111803
MSC	20	4	0,091624426	9,16244257	3,285477572
MSC	20	5	0,29680901	29,68090101	1,014221218
MSC	20	6	0,136386964	13,63869644	2,207175715
MSC	21	2	0,200237878	20,02378778	1,503361896
MSC	21	3	0,306406455	30,6406455	0,982453179
MSC	21	4	0,041793719	4,17937188	7,202756881
MSC	21	5	0,125494184	12,54941843	2,398756543
MSC	21	8	0,017450773	1,74507727	17,25023876
MSC	38	1	0,128145321	12,81453212	2,349129823
MSC	38	2	0,092182026	9,21820257	3,265604041
MSC	38	3	0,033084617	3,30846166	9,098790514
MSC	38	4	0,037239016	3,72390164	8,083725747
Noggin	20	2	0,053180565	5,31805653	5,660526434
Noggin	20	3	0,15365133	15,36513302	1,959175982
Noggin	20	4	0,112915486	11,29154857	2,665976184
Noggin	20	5	0,051781241	5,17812408	5,813495216

Noggin	20	6	0,015052275	1,5052275	19,99896997
Noggin	21	2	0,181532007	18,15320066	1,658275041
Noggin	21	3	0,083681424	8,36814236	3,597333586
Noggin	21	4	0,069333759	6,9333759	4,341752128
Noggin	21	5	0,131298311	13,12983114	2,292717952
Noggin	21	7	0,012828383	1,2828383	23,46593453
Noggin	38	2	0,017015462	1,70154619	17,69155592
Noggin	38	3	0,056264094	5,62640942	5,350303776
Noggin	38	4	0,050359859	5,03598594	5,977578159
ITAD	20	2	0,069692094	6,96920937	4,319428212
ITAD	20	3	0,137592091	13,75920906	2,187843751
ITAD	20	4	0,125168834	12,5168834	2,40499161
ITAD	20	5	0,051144648	5,11446478	5,885855287
ITAD	38	2	0,003687183	0,36871831	81,64226932
ITAD	38	3	0,069503269	6,95032686	4,331163149
VEGF	20	2	0,017278225	1,72782253	17,42250668
VEGF	20	3	0,074405115	7,44051148	4,045823953
VEGF	21	2	0,037275798	3,72757983	8,075749129
VEGF	38	2	0,097198141	9,7198141	3,097075649

Tabelle 3: Wachstumsraten und Populationsverdopplungszeit

Zur Prüfung auf statistisch signifikante Unterschiede der Wachstumsgeschwindigkeit, die durch die PDT dargestellt wird, zwischen den verschiedenen Zellreihen wurde der Tukey-Kramer-Test eingesetzt.

3.3.1 Populationsverdopplungszeiten

Zur statistischen Auswertung wurden die Populationen der jeweiligen Differenzierungsprotokolle bzw. der undifferenzierten Kontrolle (hMSC) nach Passage zusammengefasst. Hierbei ergaben sich folgende Populationsverdopplungszeiten (PDT) für die einzelnen Bedingungen je Passage:

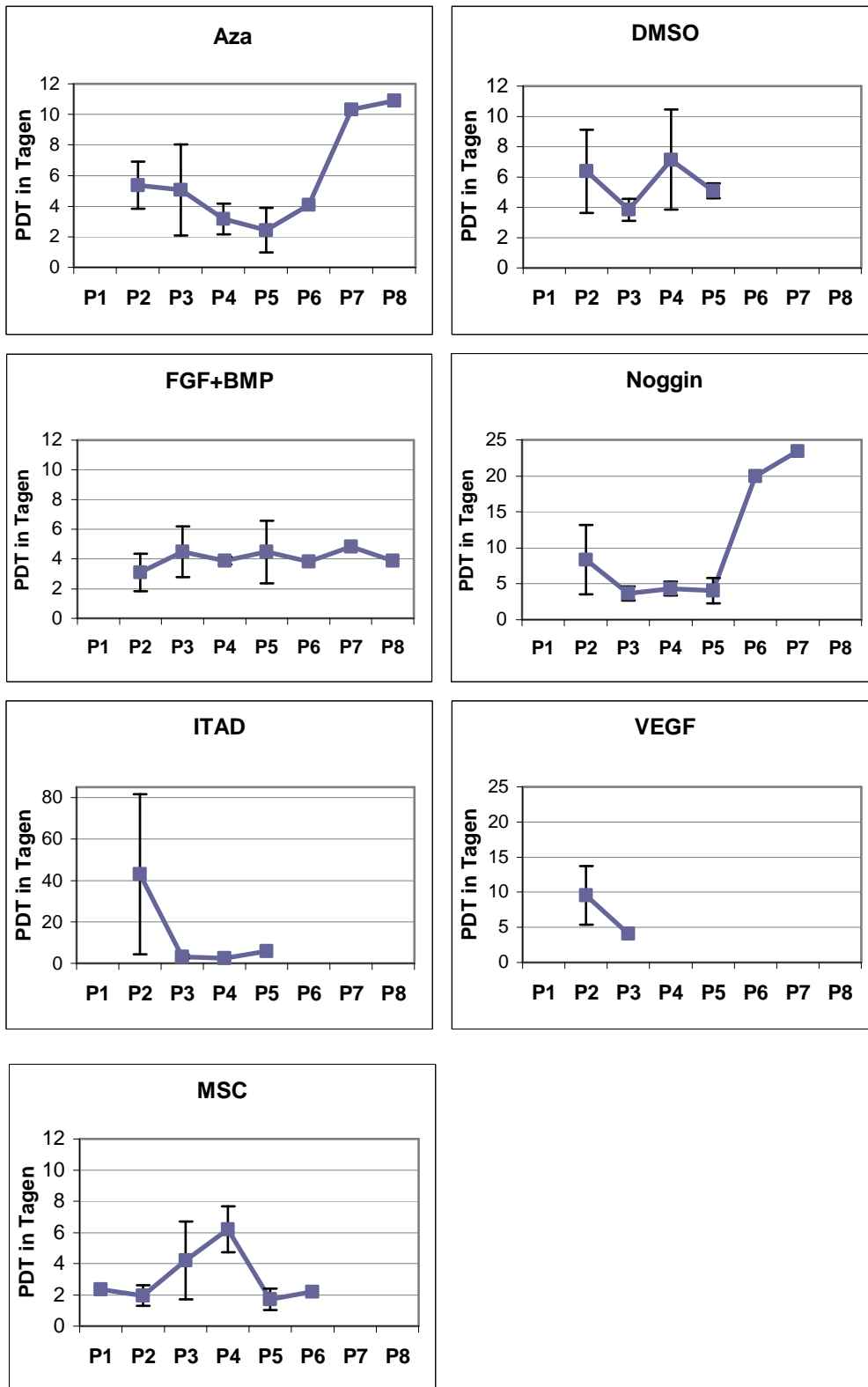


Abbildung 15: Populationsverdopplungszeiten

Aufgetragen sind hier die Populationsverdopplungszeiten in Tagen gegen die Passagen getrennt nach Differenzierungsschemata mit der Standardabweichung der Mittelwerte.

In den Passagen P2 und teilweise P3 wurde, mit Ausnahme bei der Behandlung mit FGF+BMP, ein leichter bis stärkerer Abfall der Populationsverdopplungszeit, also ein Anstieg der Wachstumsgeschwindigkeit beobachtet.

Ab P5 stieg die PDT bei der Differenzierung mit Aza und Noggin stark an, was einer stark verlangsamten Wachstumsgeschwindigkeit entspricht. Nach einer initial schnellen Wachstumsphase in beiden Differenzierungsschemata lag das Wachstumsgeschwindigkeitsmaximum in P5 für Zellen unter Aza und in P3 für Zellen unter Noggin.

Die Zellen unter FGF+BMP zeigten im Gegensatz dazu einen nahezu konstanten Wachstumsverlauf über alle Passagen (P2 bis P8) mit einer mittleren Populationsverdopplungszeit von $4,1 \pm 0,57$ Tagen.

Die Differenzierungsreihe mit DMSO zeigte nach dem Abfall zu Beginn, zunächst einen Anstieg der PDT in P4, woraufhin ein erneuter Abfall in P5 folgte.

Die unbehandelten MSCs zeigten ab P2 bis P4 eine stetige Zunahme der PDT, danach einen Abfall in P5 und eine minimale Zunahme in P6.

Bei unter ITAD-Behandlung stehenden Zellen folgte dem initialen Abfall keine merkliche Zunahme der PDT bis P5.

Die Zellen unter VEGF-Behandlung stellten bereits nach 2 bis spätestens 3 Passagen (P2-3) ihr Wachstum ein und konnten daher nicht weiter untersucht werden.

Trotz der aufgeführten unterschiedlichen Tendenzen ergaben sich zwischen den einzelnen Differenzierungsschemata und Passagen keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich den PDTs ($p > 0,05$).

3.3.2 Zellzahlen

Weiterhin wurde auch die erreichte maximale Zellzahl in den jeweils 2 untersuchten wells jeder Passage jeder Differenzierungsreihe bei gleicher initialer Aussaat-Zellzahl betrachtet.

Die maximalen Zellzahlwerte, die während der gesamten kinetischen Beobachtungszeit (bis maximal 40 Tage Beobachtungszeit, auch bei schon konfluentem Zellrasen) gemessen werden konnte, wurden logarithmiert und mit dem Tukey-Kramer-Test auf Signifikanz geprüft.

Zunächst wurden die Populationen zusammengefasst und je Passage die Differenzierungsschemata untereinander verglichen. Hier ergaben sich folgende statistisch signifikanten Unterschiede ($p < 0,05$) in P3 und P5, alle anderen Passagen zeigten keine signifikanten Differenzen.

In P3 zeigt die Differenzierung mit VEGF signifikante Differenzen zu allen anderen Differenzierungsschemata genauso wie zu undifferenzierten hMSCs in Bezug auf die erreichte maximale Gesamtzellzahl im Verlauf der beobachteten Wachstumsphase.

P3:

Differenzierungsschema Dekadisch logarithmierte maximal gemessene Zellzahl (lg (max. Zellzahl))

ITAD	5,6787248
Noggin	5,6163202
FGF+BMP	5,5680997
MSC	5,4838044
DMSO	5,4592752
Aza	5,1506488
VEGF	3,7484617*

* markiert statistisch signifikant unterschiedliche Zellzahlen

		Konfidenzintervall			
Signifikant untersch. Diff.-Paare		Abweichung der log. max. Zellzahlen	Untere Grenze	Obere Grenze	Abweichung (graphisch)
ITAD	VEGF	1,930263	1,00635	2,854180	
Noggin	VEGF	1,867858	0,98357	2,752151	
FGF+BMP	VEGF	1,819638	0,93535	2,703930	
MSC	VEGF	1,735343	0,85105	2,619635	
DMSO	VEGF	1,710814	0,82652	2,595106	
Aza	VEGF	1,402187	0,51790	2,286479	

Tabelle 4: Signifikant unterschiedliche Differenzierungspaare in Bezug auf die maximal gemessene Zellzahl während der gesamten kinetischen Beobachtungszeit der Passage 3

In P5 zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen ITAD zu den anderen Zelllinien ausgenommen zu DMSO und von DMSO im Vergleich zu den ohne Differenzierungsmedium behandelten hMSC.

P5:

Differenzierungsschema Dekadisch logarithmierte maximal gemessene Zellzahl (lg (max. Zellzahl))

MSC	5,4729470
FGF+BMP	5,2396208
Noggin	5,2281550
Aza	5,1513880
DMSO	5,0649380*
ITAD	4,6261674*

* markiert statistisch signifikant unterschiedliche Zellzahlen

		Konfidenzintervall			
Signifikant	Abweichung	Untere	Obere	Abweichung (graphisch)	
untersch. Diff.-	der log. max.	Grenze	Grenze		
Paare	Zellzahlen				
MSC ITAD	0,846780	0,35548	2,854180		
FGF+ ITAD	0,613453	0,12215	2,752151		
BMP					
Noggin ITAD	0,601988	0,11069	2,703930		
Aza ITAD	0,525221	0,03392	2,619635		
MSC DMSO	0,408009	0,01978	2,595106		

Tabelle 5: Signifikant unterschiedliche Differenzierungspaare in Bezug auf die maximal gemessene Zellzahl während der gesamten kinetischen Beobachtungszeit der Passage 5

3.4 Wachstumskinetik und kardiomyogenes Differenzierungspotential

Nachfolgend sind in der Tabelle 6 die verschiedenen Differenzierungsmarker in Zusammenhang mit der Wachstumsgeschwindigkeit getrennt nach Passagen und Differenzierungsschema dargestellt.

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
MSC								
Aktin	-	+	+	+				
ANP	(+)	(+)		(+)	+		+	
Myosin	-	-		-	(+)		(+)	
Troponin I	-	-		-	+		(+)	
PDT in d	2.35	1.97	4.20	6.19	1.71	2.21		17.25
Aza								
Aktin	-	(+)	-	(+)				
ANP	-	(+)		(+)	+		+	
Myosin	-	-		-	(+)		+	
Troponin I	-	-		(+)	(+)		(+)	
PDT in d		5.37	5.07	3.16	2.43	4.08	10.31	10.89
Noggin								
Aktin	-	-	-	(+)				
ANP	(+)	-		(+)	+		++	
Myosin	-	-		-	-			
Troponin I	-	(+)		(+)	+		+	
PDT in d		8.34	3.64	4.33	4.05	20.00	23.47	
DMSO								
Aktin	-	(+)	-	(+)				
ANP	-	-		(+)	+		+	
Myosin	-	-		-	+		+	
Troponin I	-	-		(+)	+		(+)	
PDT in d		6.37	3.84	7.15	5.09		23.20	12.54
FGF+BMP								
Aktin	-	-	-	(+)				
ANP	-	(+)		(+)	+		++	
Myosin	-	-		-	+		+	
Troponin I	-	-		-	+		+	
PDT in d		3.11	4.48	4.07	4.47	3.82	4.83	3.87
ITAD								
Aktin	-	-	-	(+)				
ANP								
Myosin	-	+		+				
Troponin I	-	(+)		-				
PDT in d		42.98	3.26	2.40	5.89			

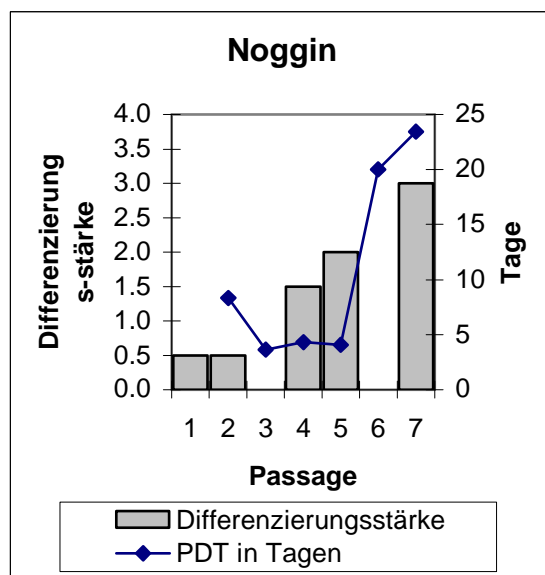
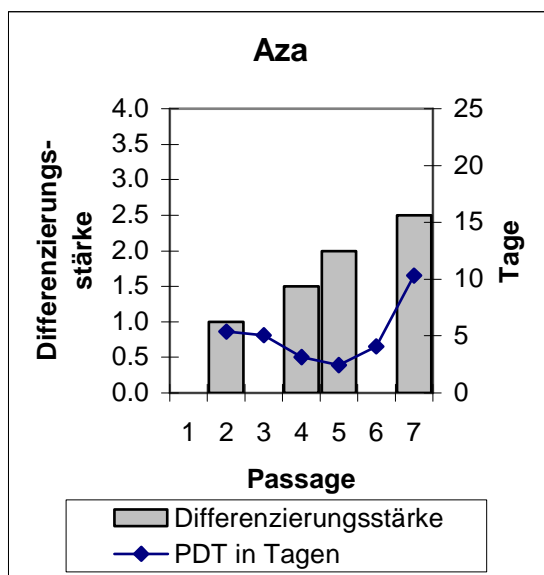
VEGF								
Aktin	-	-	-					
ANP	+							
Myosin	-	-						
Troponin I	-	-						
PDT in d		9.53	4.05					

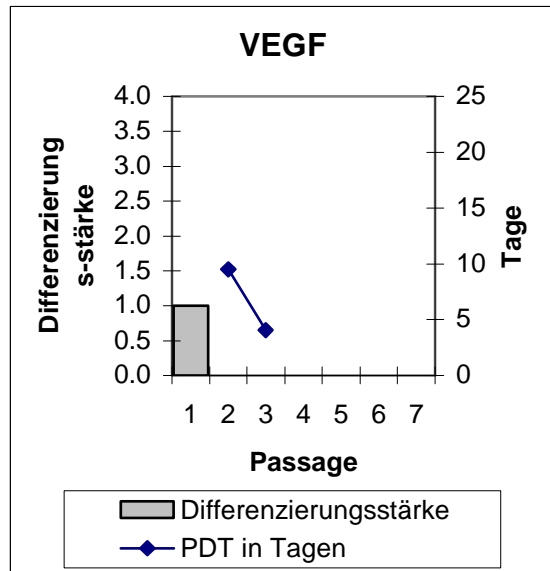
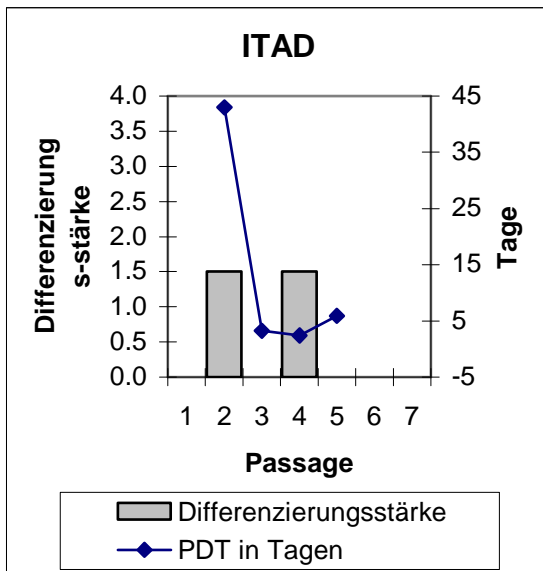
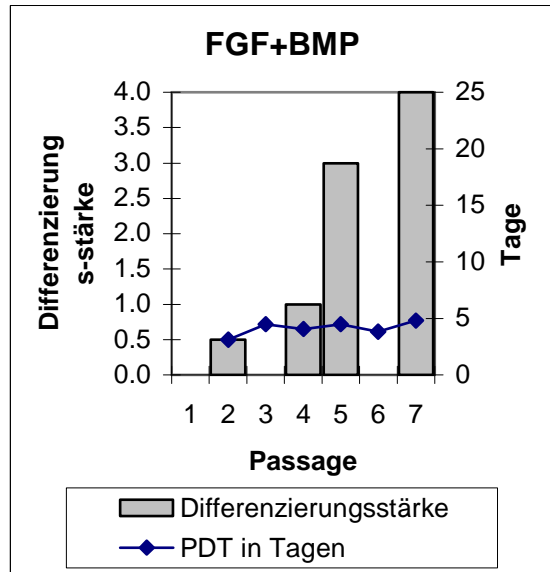
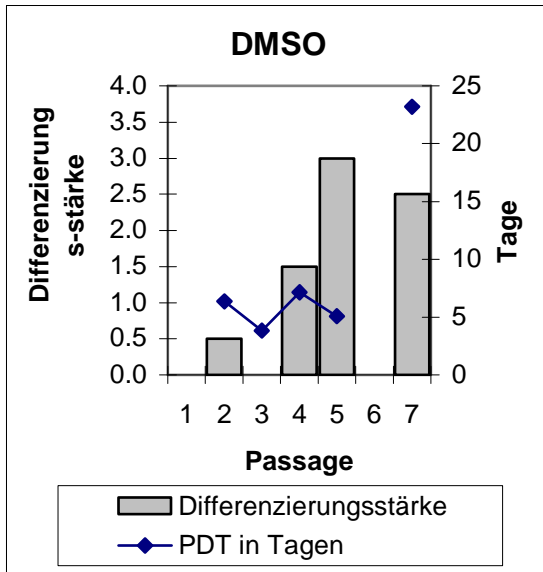
Tabelle 6: Kardiomyogene Differenzierung mit Wachstumsgeschwindigkeit

grau hinterlegte Flächen: keine/zu geringe Datenmenge

(+) eingeschränkt positiv, + positiv, ++ deutlich positiv, - negativ für die Marker ANP, Aktin, Myosin und Troponin I

Um eine mögliche Korrelation zwischen der Wachstumsgeschwindigkeit und dem Differenzierungspotential besser kenntlich zu machen, wurden diese gegeneinander aufgetragen.





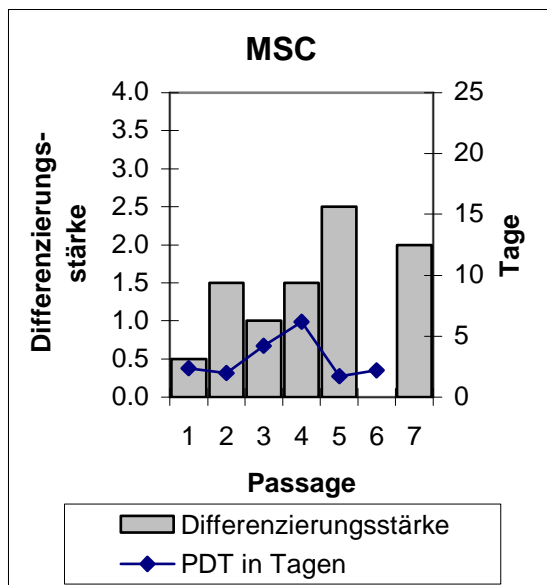


Abbildung 16: Differenzierungsstärke und PDT in Abhängigkeit von der Passage

Differenzierungsstärke: 0,0: kein Nachweis eines positiven Markers oder fehlendes Zellmaterial, 1,0: ein Marker positiv, 2,0: 2 Marker positiv, 3,0: 3 Marker positiv, 4,0: alle Marker positiv, Zwischenstufen: eingeschränkt positiver Marker

Bei den nur mit Normalmedium behandelten Kontroll-MSCs zeigt sich in den mittleren Passagen wie P3 und P4 zunächst ein sich verlangsamendes Wachstum (PDT P3: 4,2 d, PDT P4: 6,2 d) mit zunehmender Expression von kardiomyogenen Markern (jeweils positiver Nachweis von Aktin ab P2, zusätzlich leicht positiver ANP-Nachweis ab P1). In Passage 5 findet sich dann das schnellste Wachstum mit einer PDT von 1,7 Tagen und zudem kommt es zur stärksten Expression von kardiomyogenen Markern mit positivem Troponin I- und ANP-Nachweis und leicht positivem Myosin. Der Troponinnachweis fällt dann in P7 wieder etwas schwächer aus, wobei keine Daten zur Wachstumsgeschwindigkeit vorliegen. Initial fällt in P1 und P2 zunächst eine zunehmende Expression von Markern (P1 ANP schwach positiv, in P2 zusätzlich positiver Nachweis von Aktin) auf, gleichzeitig nimmt die Wachstumsgeschwindigkeit minimal zu (PDT von 2.35 d in P1 auf 1.97 d in P2), um in P3 wieder anzusteigen.

Initial fallen bei mit Aza behandelten MSCs hohe PDTs mit 5,4 und 5,1 Tagen in P2 bzw. P3 auf bei mässigem Nachweis von ANP und Aktin in P2 und ohne Aktinnachweis in P3. In den anschließenden Passagen steigt die Geschwindigkeit des Zellwachstums (PDT P4: 3,2 d und PDT P5: 2,4 d), wobei die Expression von kardiomyogenen Markern zunimmt mit erstmaligem leichtem Troponinnachweis in P4 und zusätzlich zunehmender Expression von Myosin (ab P5) und ANP. In den Passagen ab P6 kommt es dann zur Verlangsamung des Wachstums mit PDTs in P6 von 4,1 d, in P7 von 10,3 d und in P8 von 10,9 d bei positivem Nachweis von ANP und Myosin und leicht positivem Nachweis von Troponin I in P7 (keine Daten für P6 und P8).

Mit Noggin behandelte MSCs zeigen zunächst PDTs von 8,3 d, 3,6 d, 4,3 d und 4,1 d in P2 - P5 bei einem leicht positiven Nachweis von Troponin in P2 und P4, zunehmend in P5, sowie bei temporärem leichtem Nachweis von ANP in P1, der ab P4 bis P5 wieder zunimmt. Zusätzlich kann in P4 Aktin leicht positiv nachgewiesen werden. Später in den hohen Passagen P6 und P7 fällt ein stark verlangsamtes Wachstum mit PDTs von 20 und 23,5 Tagen auf mit zudem deutlichem Nachweis von ANP und Troponin in P7.

Das Wachstum von mit DMSO behandelten MSCs zeigt folgende PDTs: P2: 6,4 d, P3: 3,8 d, P4: 7,1 d und P5: 5,1 d. In P7 fällt die PDT auf 23,5 Tage (keine Daten für P6). Gleichzeitig zeigt sich die Differenzierungspotenz ab P2 mit leicht positivem Nachweis von Aktin (in P3 liegt eine zu geringe Datenmenge zur Auswertung vor). Erst in P4 kommt es zu stärker ausgeprägtem Nachweis kardiomyogener Marker wie Troponin, Aktin und ANP, die leicht positiv detektiert werden konnten. In den höheren Passagen wie P5 und P7 zeigen sich die drei Marker ANP, Troponin und Myosin positiv bis leicht positiv (leicht positives Troponin in P7).

MSCs, die nach dem FGF+BMP Schema behandelt wurden, wiesen eine eher konstante Wachstumsgeschwindigkeit mit einer mittleren PDT von $4,1 \pm 0,57$ Tagen (Passage 2 - 8) auf mit gleichzeitig langsam steigender

Differenzierungsstärke bei initial leichtem Nachweis von ANP (P2), darauf folgendem leicht positiven Nachweis von ANP und Aktin in P4 und späterem positivem bis deutlich positivem Nachweis von ANP, Troponin I und Myosin ab P5.

Bei Zellen, die mit ITAD behandelt wurden, zeigt sich zu Beginn in P2 eine deutlich verlangsamte Wachstumsgeschwindigkeit mit einer PDT von 43 Tagen, die sich ab P3 auf durchschnittlich $3,9 \pm 1,8$ Tage beschleunigt, wohingegen die Differenzierungsstärke eher über die Zeit konstant bleibt (in P2 positives Myosin und leicht positives Troponin, in P4 positives Myosin und leicht positives Aktin).

Beim Vergleich der Wachstumsgeschwindigkeit mit der Differenzierungspotenz bei MSCs, die unter VEGF-Behandlung standen, konnte aufgrund der geringen Datenmenge keine Korrelationsaussage gemacht werden. Hier kam es lediglich zu einem kurzfristigen, jedoch deutlichen, Nachweis von ANP in P1 ohne Nachweis eines weiteren positiven Differenzierungsmarkers im Verlauf, bei ab P2 leicht beschleunigtem Wachstumsverhalten (PDT P2: 9,5 d; PDT P3: 4,0 d).

4 Diskussion

4.1 Three-lineage-Differenzierung

Um den Nachweis zu erbringen, dass es sich bei den verwendeten Zellen um hMSCs handelt, wurden die oben beschriebenen Minimalkriterien nach Dominici et al. angewendet.

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wird, können hMSCs reproduzierbar nach Isolation aus dem Knochenmark (KM) adulter Spender in vitro expandiert werden. Die mononukleären Zellen aus dem KM wurden in Plastikkulturflaschen ausgesät und die nach 24h Tagen adhären MSCs konnten für weitere Versuche verwendet werden, womit das Kriterium der Adhärenz der MSCs an Oberflächen erfüllt war.

Die isolierten MSCs konnten zum Nachweis ihres multipotenten Charakters in Zellen der adipogenen, chondrogenen und osteogenen Entwicklungslinie differenziert werden: Alle drei MSC-Populationen wurde mit adipogenen, osteogen und chondrogenen Differenzierungsmedien das Differenzierungspotential der MSCs in mesenchymale Zellreihen überprüft und mit spezifischen immunzytochemischen Färbungen gezeigt.

Durch die Behandlung mit Indometacin, Dexamethason, Insulin und Isobutylmethylxanthin ließ sich eine adipogene Differenzierung erreichen (64), weshalb rot angefärbte Lipidansammlungen im Zytoplasma der adipogen differenzierten Zellen nachgewiesen werden konnten.

Das Glukokortikoid Dexamethason induziert bei undifferenzierten Stammzellen die osteogene Differenzierung (8)(9), was durch den Nachweis von alkalischer Phosphatase in den mit osteogenem Differenzierungsmedium behandelten Zellen gezeigt wurde. Die mit chondrogenem Medium, das Insulin-Selen-Transferrin+1 beinhaltet, behandelten Zellen synthetisierten nach kurzer Zeit saure Mukosubstanzen, die typisch für die extrazelluläre Matrix von Knorpelgewebe sind.

Auch im weiteren Verlauf, nachgewiesen in den Passagen P0, 2, 4 und 6 (adipogene und osteogene Differenzierung), bzw. in P2 (chondrogene

Differenzierung) behielten die Zellen ihre multipotente Differenzierungspotenz bei, wobei die unbehandelten hMSCs, die als Negativkontrollen dienten, in hohen Passagen nur eine gering erhöhte Spontandifferenzierung zeigten. Da es sich bei der chondrogenen Differenzierung nicht um eine Monolayerkultur sondern um eine Pelletmethode handelte, konnte hier keine Negativkontrolle erstellt werden.

Diese positiven Anfärbungen zeigen, dass sich die Zellen zu jedem Zeitpunkt adipogen, osteogen und chondrogen differenzieren ließen. Somit war das zweite Charakterisierungskriterium, das Differenzierungspotential, nachgewiesen.

Die Erfüllung der MSC-Minimalkriterien mit diesen Versuchen belegt, dass es sich bei diesen verwendeten Zellen um multipotente mesenchymale Stammzellen handelt. Die Expression MSC-typischer Oberflächenmarker wurde in einer gesonderten Arbeit nachgewiesen.

In sehr seltenen Fällen kam es zur spontan induzierten adipogenen (erkennbar durch eine Bildung von Fetttropfchen) und osteogenen (erkennbar durch einen leicht positiven Nachweis von alkalischer Phosphatase) Differenzierung. Dies kann als Ausdruck des multipotenten Potentials und der Plastizität mesenchymaler Stammzellen gedeutet werden, aber auch durch eine mögliche Heterogenität der MSC-Präparationen bedingt sein. Beispielsweise könnte die starke adipogene Differenzierungspotenz einer MSC-Präparation durch den Anteil von MSC-Subpopulation(en) mit besonders starker adipogener Differenzierungspotenz bedingt sein.

4.2 Kardiomyogene Differenzierung

Das Hauptaugenmerk dieser Studie stellt das kardiomyogene Differenzierungspotential der hMSCs in vitro dar. Aufgrund der heterogenen Datenlage wurden verschiedene Differenzierungsprotokolle (Wakitani et al. (Aza), Shim et al. (ITAD), Kawai et al. (FGF+BMP), Paquin et al. (DMSO), Yuasa et al. (Noggin) und Xaymardan et al. (VEGF)) bei allen untersuchten MSC-Populationen angewandt.

Mit Kardiomyozytenantigen-spezifischen Antikörpern, die mit fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpern detektiert wurden, sollten kardiomyogen differenzierte Zellen nachgewiesen werden. Dabei ergaben sich sehr unterschiedliche Ergebnisse.

In dieser vorliegenden Arbeit zeigten sich nur bedingt als kardiomyogene Differenzierung zu wertende Ergebnisse der einzelnen unter Differenzierung stehenden hMSC.

In höheren Passagen (meist ab P5, zum Teil aber auch schon ab P4) zeigte sich bei allen mit Differenzierungsmedien behandelten MSC-Kulturen, aber auch bei den unbehandelten Kontroll-MSCs ein positiver Nachweis aller in der Passage verwendeten kardiomyogener Marker (Ausnahme die Noggin- Gruppe, in der kein positiver Nachweis für Myosin gelang). Hiervon sind die Zellen unter ITAD und VEGF ausgenommen, da es hier nur bis zu einem maximalen Zellwachstum in P4 bzw. P3 kam.

In den niedrigeren Passagen (ausgenommen P1) wurden nur vereinzelt positive Nachweise für die zu untersuchenden Proteine detektiert. In Passage 1 zeigten sich noch keine positiven Ergebnisse mit Ausnahme des isolierten Nachweises von ANP bei mit Noggin und VEGF differenzierten Zellen.

In vorausgegangenen Studien wurde das kardiomyogene Differenzierungspotential von MSCs dadurch gezeigt, dass adulte MSCs von Ratten mit dem DNA-Methylierungsinhibitor 5-Azacytidin behandelt wurden und kardiomyogene Zellen beschrieben wurden, die in fast allen Strukturproteinen, sowie dem Aussehen und im Verhalten fetalen Kardiomyozyten ähnelten (89). In der vorliegenden Arbeit konnten Strukturproteine in mit Aza behandelten hMSCs ab P2 nachgewiesen werden. In P2 waren zuerst ANP und Aktin schwach positiv, in P4 folgt auch Troponin I. Myosin konnte jedoch erst ab P5 detektiert werden. In P7 zeigten sich dann alle untersuchten Marker schwach bis normal positiv. Möglicherweise sind die beschriebenen Ergebnisse Hinweis auf eine beginnende Differenzierung der hMSCs in die kardiomyogene

Richtung, da der herzmuskelspezifische Marker Troponin I eingeschränkt positiv ist.

Aktin für sich alleine genommen liefert erste Hinweise auf eine myogene Differenzierung der Zellen. Aber erst in Kombination mit Troponin I gibt es einen Hinweis auf eine kardiomyogene Differenzierung, da nur das an Troponin gekoppelte Aktin in Herzmuskelzellen spezifisch vorkommt (42)(52)(86). Auch Myosin kommt in allen Myozyten vor und kann nur in Beisein von dem kardiomyogenspezifischen Troponin I die kardiomyogene Differenzierung erhärten. ANP, als endokrines Hormon, kommt nur in der Vorhofsmuskulatur des Herzens vor, nicht jedoch im Ventrikel. Ein fehlender Nachweis muss also eine kardiomyogene Differenzierung nicht ausschließen.

HMSCs, die in der vorliegenden Studie mit Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2) und Platelet-derived growth factor-AB (PDGF-AB) behandelt wurden, die in älteren Studien (93) schon eine erfolgreiche kardiomyogene Differenzierung von adulten Stammzellen von Schweinen erbrachten, zeigten außer dem in P1 positiv nachgewiesenem Marker ANP keinerlei positive Reaktionen für kardiomyozytenspezifische Proteine über den gesamten Versuchsverlauf. Leider konnten keine höheren Passagen untersucht werden, da die Zellen ab P3 ihr Wachstum einstellten.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich in diesem Versuchsaufbau wahrscheinlich eine nicht zu diesen Zeitpunkten (<P3) ablaufende kardiomyogene Differenzierung der humanen adulten Stammzellen unter VEGF + FGF2 + PDGF-AB ableiten, eine in höheren Passagen folgende späte Differenzierung lässt sich nicht ausschließen.

Andere Ergebnisse zeigte der Einfluss von ITAD auf die hMSCs: In früheren Studien

gelang mit Hilfe der Mediumszusätze Dexamethason, Insulin und Ascorbinsäure die Differenzierung humaner adulter MSCs aus dem Sternum in kardiomyozyten-ähnliche Zellen, die nach ca. 4 Passagen positiv waren bezüglich α -Aktin und Troponin I (78). In der vorliegenden Studie gelang dieser

Nachweis von α -Aktin ebenso in P4, sowie eingeschränkt schon der Nachweis von Troponin I in P2 (jedoch kein Troponin I Nachweis in P4). Diese Erkenntnisse ähneln denen, die aus dieser Arbeit vorangehenden Experimenten gewonnen werden konnten. Zudem war Myosin ab P2 positiv detektiert worden, was als weiterer Hinweis auf eine kardiomyogene Differenzierung nach einer bestimmten Passagenanzahl gewertet werden könnte.

Auch für ein mit DMSO versetztes Medium, mit welchem die MSCs behandelt wurden, wurde in vorangegangenen Studien gezeigt, dass hiermit prinzipiell eine kardiomyogene Differenzierung induziert werden kann (61). Dort kam es nach Kultivierung von fetalen P19 Stammzellen der Maus zuerst mit DMSO und später mit reinem Medium nach 12 Tagen zu schlagenden Zellkolonien. Allerdings fehlen bisher Untersuchungen bezüglich der DMSO-Wirkung auf hMSCs. In unserer Arbeit konnte bei hMSCs ab P4 Troponin I, ANP und Aktin in den mit DMSO behandelten Zellen detektiert werden. Ab P5 konnte auch Myosin nachgewiesen werden. Zu spontan schlagende Zellformationen kam es jedoch in keinem der Fälle. Da es sich in der vorangegangenen Arbeit um fetale Stammzellen handelt, könnten die fehlenden Muskelkontraktionen eventuell auf eine langsamere und nicht so vollständige kardiomyogene Differenzierung der adulten Stammzellen in vitro im Vergleich zur Differenzierung noch nicht ausgereifter und wahrscheinlich auch potenteren fetalen Stammzellen zurückzuführen sein.

Für Zellen, die unter einer Differenzierung mit dem Medium Noggin standen, ergaben sich bereits ab P2 für Troponin I eingeschränkt positive Nachweis, ab P4 waren dann auch zusätzlich ANP und Aktin positiv. Hier lässt sich am ehesten eine kardiomyogene Entwicklung vermuten, da die Marker auch konstant positiv blieben, soweit es sich bei der begrenzten Passagezeit beurteilen lässt. Andererseits konnte in der gesamten Versuchszeit kein Myosin nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse lassen sich auch mit vorherigen Studien untermauern, die zwar an embryonalen Stammzellen durchgeführt

wurden, aber auch durch Hemmung der BMP-Signalkaskade eine kardiomyogene Entwicklung der behandelten Zellen zeigten (55)(95)(97). Neuer Studien belegen erneut die erfolgreiche Differenzierung in Herzmuskelzellen aus embryonalen Stammzellen durch andere Inhibitoren des BMP-Signalwegs, wie zum Beispiel mittels Dorsomorphin (35).

Bei der Behandlung mit FGF+BMP gelang ein positiver Nachweis kardiomyogener Marker ab P4 zuerst mit Aktin und ANP, ab P5 zeigten sich alle spezifischen Marker positiv bis P7. Diese Ergebnisse könnten darauf hinweisen, dass diese Differenzierungsmethode eine Entwicklung in die kardiomyogene Richtung der Stammzellen bewirkt, wie schon von Kawai et al. in anderen Studien mittels Nachweis von spezifischer mRNA nach Behandlung von embryonalen Stammzellen mit FGF+BNP beschrieben wurde.

Dem positiven Nachweis kardiomyogener Proteine bei den mit Normalmedium behandelten Kontroll-MSCs könnten unterschiedliche Ursachen zu Grunde liegen:

Zum einen wäre eine hohes „Spontan“differenzierungspotential der hMSCs in kardiomyogene Richtung bei zunehmender in-vitro-Kulturdauer denkbar. Hierbei stellt sich die Frage, ob beispielsweise ein/mehrere differenzierungsfördernde(r) Stoff(e) im verwendeten FCS hierfür ursächlich sein könnte(n). Weiterhin ist unklar, ob alle MSCs der jeweiligen Präparation oder bestimmte Subpopulationen, die ihrerseits während der in-vitro-Kultur selektiert werden könnten, die kardiomyogenen Markerproteine exprimieren. Diese Fragen könnten in Folgestudien untersucht werden.

Zum anderen werfen diese Ergebnisse die Frage auf, wie linien-spezifisch die bislang als spezifisch für die kardiomyogene Linie angesehenen Proteine wie Troponin I oder kardiales Aktin tatsächlich sind. Diese Frage könnte mit zukünftigen, umfangreichen entwicklungsbiologischen Untersuchungen beantwortet werden.

Betrachtet man die oben erläuterten Ergebnisse in diesem Zusammenhang, ergibt sich eine mögliche kardiomyogene Entwicklung in den höheren Passagen unter den Differenzierungsprotokollen Aza, ITAD, DMSO, sowie FGF+BMP.

Leider war meist aus technischen Gründen keine P3 der Differenzierungsreihen vorhanden, dieses Bindeglied fehlt also, da meistens ab P4 eine stärkere Differenzierung einsetzte.

Trotz einiger Übereinstimmungen mit den vorbeschriebenen Ergebnissen anderer Studien, können keine validen Beweise für eine kardiomyogene Differenzierung der untersuchten hMSCs unter den in der Studie gegebenen Bedingungen geführt werden.

4.3 Proliferationskinetik

Die aus den oben beschriebenen Versuchen ermittelten Wachstumsraten und Populationsverdopplungszeiten jeder Passage und Differenzierungsreihe der drei zusammengefassten hMSC-Populationen wurden gegen die Zeit aufgetragen.

Auf diese Weise konnte das Wachstumsverhalten der humanen Zellen unter verschiedenen Differenzierungsbedingungen analysiert werden (Abb. 12):

Zu Beginn der Kulturzeit (Passagen 2 - 3) bestand ein ansteigendes und somit höheres Wachstumspotenzial der Zellen unter Aza, Noggin, ITAD, VEGF und DMSO Differenzierung. Zellen, die unter Aza- und Noggin- Einfluss standen, verdoppelten sich immer langsamer in der nachfolgenden Kulturzeit ab P5 und zeigten damit einen klassischen Verlauf, da bekannt ist, dass die hMSC mit fortgesetzter Passagierung allmählich ihre Fähigkeit zu Proliferieren verlieren. Dieses Phänomen wird schon 2003 von Liu et al. (51) beschrieben, zusätzlich gestützt auf die Aussagen anderer Autoren, die der Meinung sind, dass die Proliferationsmöglichkeit der MSCs als Population begrenzt ist (6)(14)(25).

Ganz im Gegensatz dazu präsentierte sich der Wachstumsverlauf von MSCs, die mit ITAD behandelt wurden. Hier fällt ein zunächst sehr langsames Wachstum mit einer PDT von über 40 Tagen auf, das dann rapide ab P2 zunahm und auch bis in Passage 5 anhielt. Ob es sich nun um einen falsch abweichenden Wert bei der ersten Messung handelt (die Standardabweichung ist bei dieser Messung sehr hoch) und es sich somit ein der FGF+BNP-Behandlung ähnlicher Wachstumsverlauf (wie unten beschrieben) ergibt, lässt sich nicht ausschließen. Hier hätte eine weitere Fortführung der Kultur eventuell Aufschluss gebracht.

Zellen unter FGF+BNP-Behandlung zeigten im gesamten Verlauf ein nahezu stabiles Wachstumsverhalten mit einer fast gleich bleibenden PDT von ca. 4 Tagen. Das könnte darauf hinweisen, dass diese Zellen unter diesem Medieumfluss noch nicht am Ende ihrer Proliferation angekommen waren und noch länger hätten kultiviert werden müssen um einen typischen Abfall der Wachstumsgeschwindigkeit nachweisen zu können. Die Zusätze in diesem Medium (Wachstumsfaktoren für Fibroblasten) könnten auch eine im Vergleich zu MSCs, die mit den anderen Medien behandelt wurden, länger erhaltene Zellteilungspotenz in vitro bewirkt haben.

Ein ähnlicher Wachstumsverlauf zeigte sich auch bei Zellen, die mit DMSO behandelt wurden. Hier kam es zu einem etwas schwankenden Verlauf, bei dem die PDT zwischen 3,5 und 8 Tagen variierte. Es zeigten sich bei den etwas langsameren Wachstumszeiten auch größere Standardabweichungen, was dafür sprechen könnte, dass hier ein teilweise schnelleres Wachstum wie bei Zellen unter FGF+BNP und ITAD vorliegen könnte. Weiterhin ist nicht auszuschließen, dass die bekannten zytotoxischen Effekte von DMSO (48)(90) eine Rolle bei den teilweise erheblichen Standardabweichungen gespielt haben könnten.

Die mit VEGF behandelten MSCs zeigten sich schnell (ab P3) am Ende ihrer Proliferationskapazität, da in Passage 3 bei stetig gleich bleibender und im Verlauf sogar abnehmender Zellzahl ein Wachstumsstillstand eintrat ohne dass ein konfluenter Zellrasen beobachtet werden konnte. Somit ist eine eventuelle Kontaktinhibition infolge Zell-Zell-Kontakten infolge Konfluenz (24)(36)(92) als

Ursache des Proliferationsstillstands unwahrscheinlich. Vielmehr ist eine verminderte Proliferationsmöglichkeit der Population liegen, deren Gründe jedoch unklar sind.

Unbehandelte hMSCs zeigten in der Kultur eine Verlangsamung der Zellteilungsgeschwindigkeit zunehmend ab P2, wobei das Wachstumsminimum in P4 lag. Im weiteren Verlauf kam es jedoch zu keinem signifikanten Abfall der Wachstumsraten bei einem insgesamt eher schnellen Wachstum, allerdings waren die Wachstumskinetiken der mit Kontroll-Medium behandelten MSC-Populationen sehr unterschiedlich.

Die Verläufe der Populationsverdopplungszeiten zeigen keine einheitlichen Verläufe. Hierbei zeigten sich zudem keine signifikanten Unterschiede, im Gegensatz zu der maximalen Anzahl an Zellen, die sich bei unter VEGF-Differenzierung stehenden Zellen signifikant von den anderen Zellzahlmaxima in Passage 3 unterschied. Dies kann als Hinweis auf eine sehr unterschiedliche Wachstumspotenz der einzelnen zusammengefassten Populationen gewertet werden, die von unterschiedlichen Spendern unterschiedlichen Alters und Geschlechts stammen. Auch ein unterschiedliches Differenzierungspotential innerhalb der anders behandelten Kulturschemata bei jeder Passage kann ausschlaggebend für die uneinheitlichen Wachstumsgeschwindigkeiten sein.

Diese Arbeit zeigt, dass die Wachstumskinetik der unter verschiedenen Differenzierungsmedien mit unterschiedlichen Zusätzen (zum Teil mit wachstumsstimulierenden Substanzen) behandelten hMSCs sehr unterschiedlich ist. Durchgehende signifikante Unterschiede konnten nicht festgestellt werden.

4.4 Wachstumskinetik und kardiomyogenes Differenzierungspotential

Im Vergleich der Wachstumsgeschwindigkeiten mit dem Differenzierungspotential kann wiederum keine einheitliche Aussage getroffen werden.

Vergleicht man die Schnelligkeit des Zellwachstums mit der Expression der kardiomyogenen Marker, ist nur bei MSCs, die unter Noggin-Behandlung standen eine Korrelation der Parameter Wachstumsgeschwindigkeit und Differenzierungspotential erkennbar. Hier kommt es zu einer Verlangsamung des Zellwachstums während der positive Nachweis von kardiomyozyten-spezifischen Proteinen zunimmt. Dies wäre mit der bekannten Regression der Proliferationskapazität unter Differenzierung vereinbar (5)(97).

Die Ergebnisse dieser Kulturen sind jedoch nur zurückhaltend zu interpretieren, da bei den übrigen Bedingungen die Teilungsraten nicht im erwarteten typischen Verlauf mit dem Differenzierungsgrad korreliert.

Bei den MSCs ohne differenzierungsfördernde Zusätze zeigte sich keine Korrelation zwischen Differenzierungsgrad und Wachstumsgeschwindigkeit. In den mittleren Passagen wie P3 und P4 fällt zunächst ein langsamer werdendes Wachstum auf mit zunehmender Expression der kardiomyogenen Marker. In Passage 5 kommt es dann zu dem schnellsten beobachteten Wachstum und zudem stärkster Expression der kardiomyogenen Marker mit positivem Troponinnachweis ohne spezielle differenzierungsinduzierende Mediumszusätze.

Zunächst fielen bei mit Aza behandelten Zellen hohe Populationsverdopplungszeiten bei geringer Expression der kardiomyogenen Marker auf. Im Anschluss daran stieg jedoch die Wachstumsgeschwindigkeit bei zunehmenden möglichen Differenzierungszeichen. In höheren Passagen (ab P6) kam es dann zu einer Wachstumsverlangsamung bei stärkstem positivem Nachweis von differenzierungsrelevanten Proteinen, was wieder eher für eine Korrelation im Sinne der Wachstumsinhibition durch Differenzierung spricht.

Ein initial eher gleichmässiges Wachstum mit einer PDT von ca. 6 Tagen fällt bei MSC unter der Behandlung mit DMSO auf. Die Expression der kardiomyogenen Marker war auch in den Passagen 4 und 5 schon ausgeprägt. In der hohen Passage P7 kam es dann zur massiven Verlangsamung der Wachstumsgeschwindigkeit und einer gesteigerten Expression der

kardiomyogenen Marker. Möglicherweise liegt auch hier eine Korrelation der Teilungsgeschwindigkeit und der Differenzierungsstärke vor.

Ein insgesamt konstant schnelles Wachstum mit gleichzeitig steigender Expression der kardiomyogenen Marker zeigte sich bei FGF+BMP ausgesetzten Zellen. Nur in P7, wo eine deutliche Expression der kardiomyogenen Marker vorlag, wurde das Wachstum minimal verlangsamt von einer durchschnittlichen PDT von 4 auf 4,8 Tage. Möglicherweise kommt es durch wachstumsfördernde und zugleich differenzierungsinduzierende Proteine im Nährmedium zu einer unwesentlichen Verlangsamung der Teilungsrate trotz einsetzender Differenzierung.

ITAD Zellen können bei geringer Datenmenge nur eingeschränkt beurteilt werden. Sie zeigten ein sehr langsames Wachstum in P2, im weiteren Verlauf steigerte sich das Wachstumsverhalten schnell, bei initial steigenden Differenzierungsstärken. Mit Ausnahme des hohen PDT Werts bei der ersten Messung, lässt der Wachstums- und Differenzierungsverlauf eine ähnliche Überlegung wie bei mit FGF+BMP-behandelten MSCs zu.

Beim Vergleich der Wachstumsgeschwindigkeit mit der Differenzierungspotenz bei Zellen, die unter VEGF-Behandlung standen, konnte aufgrund der geringen Datenmenge keine Korrelationsaussage gemacht werden.

Insgesamt spielen für die Wachstumsgeschwindigkeit sowie die kardiomyogene Differenzierungsfähigkeit multiple Faktoren eine Rolle. Die vielen unterschiedlichen Proteine in den jeweiligen Differenzierungsmedien und auch des FCS, bei dem in jeder Charge natürlicherweise diskrete Unterschiede in der Zusammensetzung möglich sind, könnten die Wachstumsgeschwindigkeit fördern oder auch bremsen ohne dass die durch den Differenzierungsgrad induziert wird.

5 Zusammenfassung und Ausblick

In den Industrienationen sind kardiale Erkrankungen die häufigsten Krankheitsursachen und durch sie und ihre Folgen entstehen jedes Jahr sehr hohe Kosten für das Gesundheitswesen sowie bleibende oder nur zum Teil reversible Einschränkungen des Gesundheitszustandes des Patienten. Durch das entstehende Narbengewebe nach einem Herzmuskelschaden kann die Herzmuskeltätigkeit insuffizient werden. Bislang wurden noch keinen effektiven Methoden zur Regeneration von hypoxisch geschädigten Kardiomyozyten etabliert.

Tissue engineering und Stammzellforschung könnten viel versprechende Therapiensätze bei nicht regenerierbaren Gewebsdefekten, zum Beispiel nach Myokardinfarkten, bieten.

Im Besonderen könnten hMSCs aus Knochenmark und anderen Geweben aufgrund ihrer relativ einfachen Gewinnung sowie ihrer möglichen Kapazität zur kardiomyogenen Regeneration attraktive Kandidaten darstellen.

In einigen Studien wurden zum Teil sehr unterschiedliche Methoden zur kardiomyogenen Differenzierung von hMSC in vivo und in vitro beschrieben.

Dabei wurde neben der Transplantation von undifferenzierten hMSC insbesondere auch die kardiomyogene Differenzierung der Zellen in vitro vor der Transplantation untersucht. Insgesamt ist die Datenlage hierzu sehr widersprüchlich: Zum einen zeigen einige Studien klar, dass aus dem Knochenmark gewonnene Zellen und auch MSC nicht zu funktionsfähigen Herzmuskelzellen differenzieren, sondern lediglich immunzytochemische Marker wie Aktin, Myosin und Troponin I exprimieren und sogar kardiomyozytenspezifische mRNA nachgewiesen werden kann, es jedoch nicht zur Bildung eines Aktionspotentials (selbst in der Co-Kultur) und damit nicht zur Kontraktion kommt (71). Ein Einsatz als Gewebersatz von Herzmuskelzellen scheint hiernach fraglich, die beschriebenen positiven Effekte auf eine Gewebserneuerung werden eher auf eine parakrine Beeinflussung durch die MSC zurückgeführt (54).

Zum anderen konnten jedoch im Vorfeld auch mit den in dieser Studie verwendeten Mediumszusätzen deutlichere Nachweise einer kardiomyogenen Differenzierung inklusive kontrahierender Bewegungen (bei Ratten-MSC) gezeigt werden (78)(93).

In der vorliegenden Arbeit wurde das Differenzierungs- und Wachstumspotential von hMSCs analysiert. Hierbei standen Fragestellungen im Vordergrund, die vor der Durchführung von präklinischen in situ Tissue Engineering Studien in vitro relevant sind.

In der vorliegenden Dissertation wurden vorbeschriebene Methoden zur kardiomyogenen Differenzierung von unterschiedlichen Stammzell-Entitäten in vitro bzgl. ihrer möglichen kardiomyogenen Differenzierungspotenz auf hMSCs miteinander verglichen und sowohl die Proliferationsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Passagenummer bestimmt und mit der Differenzierungspotenz in Beziehung gesetzt.

Ferner gilt festzuhalten, dass die molekularen Effekte der zugesetzten Induktoren auf die kardiomyogene Differenzierung noch bei weitem zu wenig verstanden sind.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die untersuchten Protokolle zur kardiomyogenen Differenzierung von hMSCs unterschiedliche Effekte auf die untersuchten MSC-Populationen haben. Eine deutliche Steigerung der Expression der kardiomyogenen Marker konnte jedoch, vor allem in Hinblick auf die auch bei Kontroll-MSCs beobachtete „endogene“ Expression der kardiomyogenen Marker, nicht verzeichnet werden. Möglicherweise ist eine funktionelle kardiomyogene Differenzierung von hMSCs aus dem KM nicht effizient und reproduzierbar durchführbar. Dennoch sind weitere grundlegende Forschungen vonnöten, besonders im Bereich der molekularen Zellmechanismen, um die Techniken der Stammzellisolation, -kultivierung und -differenzierung in vitro zu optimieren um so ihre Kultivierung, ihr Überleben und ihre Transplantatfunktion in vivo zu verbessern. Die in dieser Arbeit etablierten Zellkultur- und Analyseverfahren sind geeignet, um die mögliche

Einflussnahme unterschiedlicher exogener Faktoren, wie Wachstums- und Differenzierungsfaktoren und von Chemokinen, auf hMSCs zu untersuchen. Es sollten weiterhin Untersuchungen in vitro, aber auch in vivo unternommen werden, um dem Ziel der Regeneration von infarziertem Herzmuskelgewebe näher zu kommen.

Zudem ist noch ungeklärt, ob die in vitro Differenzierung von hMSC in Kardiomyozten den reparativen Effekt dieser Zellen verstärkt oder nicht.

Es müssen noch viele Hürden überwunden werden, bevor die Stammzelltherapie mit hMSCs die an sie gestellten Erwartungen erfüllen kann.

6 Literatur

- (1) Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005;105:1815-1822.
- (2) Agocha A, Lee HW, Eghbali-Webb M. Hypoxia regulates basal and induced DNA synthesis and collagen type I production in human cardiac fibroblasts: effects of transforming growth factor-beta1, thyroid hormone, angiotensin II and basic fibroblast growth factor. *J Mol Cell Cardiol*. 1997;29: 2233-2244.
- (3) Amado LC, Saliaris AP, Schuleri KH, et al. Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:11474-11479.
- (4) Aupperle H, Garbade J, Schubert A, et al. Effects of autologous stem cells on immunohistochemical patterns and gene expression of metalloproteinases and their tissue inhibitors in doxorubicin cardiomyopathy in a rabbit model. *Vet Pathol*. 2007;44:494-503.
- (5) Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med*. 2004 Jul-Sep;8(3):301-16.
- (6) Banfi A, Muraglia A, Dozin B, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Quarto R. Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: implications for their use in cell therapy. *Exp Hematol*. 2000;28:707-15.
- (7) Barry F, Boynton RE, Liu B, Murphy JM. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Exp Cell Res*. 2001 Aug 15;268(2):189-200.
- (8) Bellows CG, Heersche JN, Aubin JE. Determination of the capacity for proliferation and differentiation of osteoprogenitor cells in the presence and absence of dexamethasone. *Dev Biol*. 1990 Jul;140(1):132-8.
- (9) Beresford JN, Joyner CJ, Devlin C, Triffitt JT. The effects of dexamethasone and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on osteogenic differentiation of human marrow stromal cells in vitro. *Arch Oral Biol*. 1994 Nov;39(11):941-7.
- (10) Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, et al. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2001;19:180-192.
- (11) Bolognese L, Cerisano G, Buonamici P, Santini A, Santoro GM, Antonucci D, Fazzini PF. Influence of infarct-zone viability on left ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *Circulation*. 1997;96, 3353-3359.
- (12) Breitbach M, Bostani T, Roell W, et al. Potential risks of bone marrow cell transplantation into infarcted hearts. *Blood*. 2007;110:1362-1369.
- (13) Britten MB, Abolmaali ND, Assmus B, Lehmann R, Honold J, Schmitt J, Vogl TJ, Martin H, Schächinger V, Dimmeler S, Zeiher AM. Infarct remodeling after intracoronary progenitor cell treatment in patients with acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): mechanistic insights from serial contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Circulation*. 2003 Nov 4;108(18):2212-8.
- (14) Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, Kadiyala S. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am*. 1998;80(7):985-96.
- (15) Cao B, Zheng B, Jankowski RJ, Kimura S, Ikezawa M, Deasy B, Cummins J, Epperly M, Qu-Petersen Z, Huard J. Muscle stem cells differentiate into hematopoietic lineages but retain myogenic potential. *Nat Cell Biol*. 2003 Jul;5(7):640-6.
- (16) Chang MG, Tung L, Sekar RB, et al. Proarrhythmic potential of mesenchymal stem cell transplantation revealed in an in vitro coculture model. *Circulation*. 2006;113:1832-1841.
- (17) Chen S, Zhang Q, Wu X, Schultz PG, Ding S. Dedifferentiation of lineage-committed cells by a small molecule. *J Am Chem Soc*. 2004 Jan 21;126(2):410-1.
- (18) Christian TF, Schwartz RS, Gibbons RJ. Determinants of infarct size in reperfusion therapy for acute myocardial infarction. *Circulation*. 1992;86, 81-90.
- (19) Colucci WS. Molecular and cellular mechanisms of myocardial failure. *Am J Cardiol*. 1997;80, 15L-25L.

- (20) Cristofalo VJ, Allen RG, Pignolo RJ et al. Relationship between donor age and the replicative lifespan of human cells in culture: A reevaluation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:10614–10619.
- (21) De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum* 2001;44:1928–42.
- (22) 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. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs*. 2003;174(3):101-9.
- (23) Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*. 2002;99:3838-3843.
- (24) Dietrich C, Wallenfang K, Oesch F, Wieser R. Differences in the mechanisms of growth control in contact-inhibited and serum-deprived human fibroblasts. *Oncogene*. 1997;15(22):2743-7.
- (25) Digirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R Prockop DJ. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol*. 1999;107(2):275-81.
- (26) Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, Deans RJ, A Keating A, Prockop DJ and Horwitz EM. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement; *Cytotherapy* Vol. 8. 2006;4:315-317.
- (27) Fedak PW, Verma S, Weisel RD, et al. Cardiac remodeling and failure: from molecules to man (Part I). *Cardiovasc Pathol*. 2005;14:1-11.
- (28) Fonarow GC. Heart failure: recent advances in prevention and treatment. *Rev Cardiovasc Med*. 2000;1:25-33, 54.
- (29) Freshney RI. Kulturbedingungen. 1990;59-87, In: Freshney RI. Ein Methoden-Handbuch. De Gruyter-Verlag, New York, Berlin.
- (30) Fukuda K. Development of Regenerative Cardiomyocytes from Mesenchymal Stem Cells for Cardiovascular Tissue Engineering. *Artificial Organs* 2001;25(3):187–193.
- (31) Fukuda K. Use of adult marrow mesenchymal stem cells for regeneration of cardiomyocytes; *Bone marrow Transplantation*. 2003;(32): 25-27.
- (32) Fukumoto T, Sperling JW, Sanyal A, Fitzsimmons JS, Reinholz GG, Conover CA, O'Driscoll SW. Combined effects of insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1 on periosteal mesenchymal cells during chondrogenesis in vitro. *Osteoarthritis Cartilage*. 2003 Jan;11(1):55-64.
- (33) Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol* 2001;189:54–63.
- (34) Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:13625-13630.
- (35) Hao J, Daleo MA, Murphy CK, Yu PB, Ho JN, Hu J, Peterson RT, Hatzopoulos AK, Hong CC. Dorsomorphin, a selective small molecule inhibitor of BMP signaling, promotes cardiomyogenesis in embryonic stem cells. *PLoS One*. 2008 Aug 6;3(8):e2904.
- (36) Heit I, Wieser R, Hergert T, Faust D, Borchert-Stuhlträger M, Oesch F, Dietrich C. Involvement of protein kinase Cdelta in contact-dependent inhibition of growth in human and murine fibroblasts. *Oncogene*. 2001;20(37):5143-54.
- (37) Heng BC, Haider HK, Sim EKW, Cao T, Ng SC. Strategies for directing the differentiation of stem cells into the cardiomyogenic lineage in vitro. *Cardiovascular Research*. 2004;(62):34-42.
- (38) Huard J, Cao B, Qu-Petersen Z. Muscle-derived stem cells: potential for muscle regeneration. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2003 Aug;69(3):230-7. Review.
- (39) Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem*. 1997 Feb;64(2):295-312.

- (40) Jeong JA, Gang EJ, Hong SH, Hwang SH, Kim SW, Yang IH, Ahn C, Han H, Kim H. Rapid neural differentiation of human cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Neuroreport* 2004;15(11):1731-4.
- (41) Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Oritz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Linsberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002;(418): 41-49.
- (42) Katus HA, Remppis A, Neumann FJ, Scheffold T, Diederick KW, Vinar G, et al. Diagnostic efficiency of troponin T measurements in acute myocardial infarction. *Circulation* 1991;83:902-912.
- (43) Kawai T, Takahashi T, Esaki M, Ushikoshi H, Nagano S, Fujiwara H, Kosai K. Efficient cardiomyogenic differentiation of embryonic stem cell by fibroblast growth factor 2 and bone morphogenetic protein 2. *Circ J*. 2004 Jul;68(7):691-702.
- (44) Kellerman S, Moore JA, Zierhut W, Zimmer HG, Campbell J, Gerdes AM. Nuclear DNA content and nucleation patterns in rat cardiac myocytes from different models of cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*. 1992;24:497-505.
- (45) Kelm M, Strauer BE. Interventional therapy of the acute cardiac infarct. *Internist (Berl)*. 2001;42:686-698.
- (46) Knight RL, Booth C, Wilcox HE, et al. Tissue engineering of cardiac valves: re-seeding of acellular porcine aortic valve matrices with human mesenchymal progenitor cells. *J Heart Valve Dis*. 2005;14:806-813.
- (47) Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Sep 14;96(19):10711-6.
- (48) Kwak GH, Choi SH, Kim HY. Dimethyl sulfoxide elevates hydrogen peroxide-mediated cell death in *Saccharomyces cerevisiae* by inhibiting the antioxidant function of methionine sulfoxide reductase A. *BMB Rep*. 2010 Sep;43(9):622-8.
- (49) Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, et al. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol*. 2003;31:890-896.
- (50) Lee MS, Makkar RR. Stem-cell transplantation in myocardial infarction: A status report; *Annals of internal Medicine*. 2004;(140):729-737.
- (51) Liu Y, Song J, Liu W, Wan Y, Chen X und Hu C. Growth and differentiation of rat bone marrow stromal cells: Does 5-azacytidine trigger their cardiomyogenic differentiation? *Cardiovasc Res*. 2003;58(2):460-8.
- (52) Mair J, Genser N, Morandell D, Maier J, Mair P, Lechleitner P, Calzolari C, Larue C, Ambach E, Dienstl F, Pau B, Puschendorf B. Cardiac troponin I in the diagnosis of myocardial injury and infarction. *Clin Chim Acta*. 1996 Feb 9;245(1):19-38.
- (53) Makino S, Kukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A, Ogawa S. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *The journal of clinical investigation*. 1999;(103[5]):697-705.
- (54) Martin-Rendon E, Sweeney D, Lu F, Girdlestone J, Navarrete C, Watt SM. 5-Azacytidine-treated human mesenchymal stem/progenitor cells derived from umbilical cord, cord blood and bone marrow do not generate cardiomyocytes in vitro at high frequencies. *Vox Sang*. 2008 Aug;95(2):137-48. Epub 2008 Jun 28.
- (55) Matsui H, Ikeda K, Nakatani K, Sakabe M, Yamagishi T, Nakanishi T, Nakajima Y. Induction of initial cardiomyocyte alpha-actin--smooth muscle alpha-actin--in cultured avian pregastrula epiblast: a role for nodal and BMP antagonist. *Dev Dyn*. 2005 Aug;233(4):1419-29.
- (56) Matsumoto T, Kano K, Kondo D, Fukuda N, Iribe Y, Tanaka N, Matsubara Y, Sakuma T, Satomi A, Otaki M, Ryu J, Mugishima H. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol*. 2008 Apr;215(1):210-22.
- (57) Morrison, Shah et al. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell*. 1997;88: 287-298.
- (58) Nagaya N, Kangawa K, Itoh T, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 2005;112:1128-1135.

- (59) Ohnishi S, Yanagawa B, Tanaka K, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells attenuates myocardial injury and dysfunction in a rat model of acute myocarditis. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2007;42:88-97.
- (60) Pak HN, Qayyum M, Kim DT, et al. Mesenchymal stem cell injection induces cardiac nerve sprouting and increased tenascin expression in a Swine model of myocardial infarction. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2003;14:841-848.
- (61) Paquin J, Danalache BA, Jankowski M, McCann SM, Gutkowska J. Oxytocin induces differentiation of P19 embryonic stem cells to cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Jul 9;99(14):9550-5.
- (62) Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999;284(5417):1168-70.
- (63) Pfeffer JM, Pfeffer MA, Fletcher PJ, Braunwald W. Progressive ventricular remodeling in rat with myocardial infarction. *Am J Physiol*. 1991;260:H1406-1414.
- (64) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284:143-147.
- (65) Plotnikov AN, Shlapakova I, Szabolcs MJ, et al. Xenografted adult human mesenchymal stem cells provide a platform for sustained biological pacemaker function in canine heart. *Circulation*. 2007;116:706-713.
- (66) Price MJ, Chou CC, Frantzen M, et al. Intravenous mesenchymal stem cell therapy early after reperfused acute myocardial infarction improves left ventricular function and alters electrophysiologic properties. *International journal of cardiology*. 2006;111:231-239.
- (67) Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997;276:71-4.
- (68) Psaltis PJ, Zannettino A, Worthley SG, Gronthos S. Mesenchymal Stromal Cells - Potential for Cardiovascular Repair. *Stem Cells*. 2008 Jul 3.
- (69) Rasmusson I, Ringden O, Sundberg B, et al. Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms. *Exp Cell Res*. 2005;305:33-41.
- (70) Ravichandran LV, Puvanakrishnan R. In vivo labeling studies on the biosynthesis and degradation of collagen in experimental myocardial infarction. *Biochem Int*. 1991;24:405-414.
- (71) Rose RA, Jiang H, Wang X, Helke S, Tsoporis JN, Gong N, Keating SC, Parker TG, Backx PH, Keating A. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells express cardiac-specific markers, retain the stromal phenotype, and do not become functional cardiomyocytes in vitro. *Stem Cells*. 2008 Nov;26(11):2884-92. Epub 2008 Aug 7.
- (72) Ryan JM, Barry FP, Murphy JM, et al. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *Journal of inflammation (London, England)*. 2005;2:8.
- (73) Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, et al. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 2002;109(10):1291-302.
- (74) Sekiya I, Larson BL, Vuoristo JT, Cui JG, Prockop DJ. Adipogenic differentiation of human adult stem cells from bone marrow stroma (MSCs). *J Bone Miner Res*. 2004 Feb;19(2):256-64.
- (75) Seo BM, Miura M, Gronthos S, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*. 2004;364:149-155.
- (76) Seruya M, Shah A, Pedrotty D, du Laney T, Melgiri R, McKee JA, Young HE, Niklason LE. Clonal population of adult stem cells: Life span and differentiation potential. *Cell Transplantation*. 2004;(13): 93-101), 22.
- (77) Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res*. 2003;18:696-704.
- (78) Shim WS, Jiang S, Wong P, Tan J, Chua YL, Tan YS, Sin YK, Lim CH, Chua T, Teh M, Liu TC, Sim E. Ex vivo differentiation of human adult bone marrow stem cells into cardiomyocyte-like cells; *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;324(2):481-8.
- (79) Silva GV, Litovsky S, Assad JA, et al. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. *Circulation*. 2005;111:150-156.

- (80) Soonpaa MH, Field LJ. Assessment of cardiomyocyte DNA synthesis in normal and injured adult mouse hearts. *Am J Physiol.* 1997;272:H220-226.
- (81) Spirito P, Seidman CE, McKenna WJ, Maron BJ. The management of hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 1997;336(11):775-85.
- (82) Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Gattermann N, Hernandez A, Sorg RV, Kögler G, Wernet P. Intracoronary, human autologous stem cell transplantation for myocardial regeneration following myocardial infarction. *Dtsch Med Wochenschr.* 2001 Aug 24;126(34-35):932-8.
- (83) Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, et al. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation.* 2002;105:93-98.
- (84) Tomita S, Li R, Weisel RD, Mickle DAG, Kim EJ, Sakai T, Jia ZQ. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation.* 1999;(100)Suppl.II:247-256.
- (85) Trounson A. Human embryonic stem cells: mother of all cell and tissue types. *Reprod Biomed Online* 2002;4(Suppl. 1):58– 63.
- (86) Tymchak WJ, Armstrong PW. Spectrum of ischemic heart disease and the role of biochemical markers. *Clin Lab Med.* 1997 Dec;17(4):701-25.
- (87) Valina C, Pinkernell K, Song YH, et al. Intracoronary administration of autologous adipose tissue-derived stem cells improves left ventricular function, perfusion, and remodelling after acute myocardial infarction. *European heart journal.* 2007;28:2667-2677.
- (88) Vincentelli A, Wautot F, Juthier F, et al. In vivo autologous recellularization of a tissue-engineered heart valve: are bone marrow mesenchymal stem cells the best candidates? *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2007;134:424-432.
- (89) Wakitani S, Saito T, Caplan AL. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve.* 1995;18:1417-1426.
- (90) Waller FT, Tanabe CT, Paxton HD. Treatment of elevated intracranial pressure with dimethyl sulfoxide. *Ann NY Acad Sci* 1983;411;286–292.
- (91) Wang JS, Shum-Tim D, Chedrawy E, et al. The coronary delivery of marrow stromal cells for myocardial regeneration: pathophysiologic and therapeutic implications. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2001;122(4):699– 705.
- (92) Wieser RJ, Faust D, Dietrich C, Oesch F. p16INK4 mediates contAktinhibition of growth. *Oncogene.* 1999;18(1):277-81.
- (93) Xaymardan M, Tang L, Zagreda L, Pallante B, Zheng J, Chazen JL, Chin A, Duignan I, Nahirney P, Rafii S, Mikawa T, Edelberg JM. Platelet-derived growth factor-AB promotes the generation of adult bone marrow-derived cardiac myocytes. *Circ Res.* 2004 Mar 19;94(5):E39-45.
- (94) Yoon YS, Park JS, Tkebuchava T, Luedemann C, Losordo DW. Unexpected severe calcification after transplantation of bone marrow cells in acute myocardial infarction. *Circulation.* 2004;(109):3154-3157.
- (95) Yuasa S, Itabashi Y, Koshimizu U, Tanaka T, Sugimura K, Kinoshita M, Hattori F, Fukami S, Shimazaki T, Ogawa S, Okano H, Fukuda K. Transient inhibition of BMP signaling by Noggin induces cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 2005 May;23(5):607-11.
- (96) Zannettino AC, Paton S, Arthur A, et al. Multipotential human adipose-derived stromal stem cells exhibit a perivascular phenotype in vitro and in vivo. *Journal of cellular physiology.* 2008;214:413-421.
- (97) Zhang FB, Li L, Fang B, Zhu DL, Yang HT, Gao PJ. Passage-restricted differentiation potential of mesenchymal stem cells into cardiomyocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Oct 28;336(3):784-92.
- (98) Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 2002 Dec;13(12):4279-95.