

Aus der Universitätsklinik für Urologie Tübingen

**Differenzierung humaner Fettgewebe-abgeleiteter  
mesenchymaler Stromazellen (ADSC) in die adipogene,  
osteogene und glattmuskuläre Richtung nach Expansion  
unter GMP-konformen Bedingungen**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Müller, Bettina Maria**

**2020**

Dekan: Prof. Dr. B. Pichler  
1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. K. Aicher  
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. H. Billing

Tag der Disputation: 12.10.2020

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Problematik der Harninkontinenz.....	1
1.2 Anatomische Grundlagen der Harninkontinenz des Menschen.....	3
1.3 Zellbasierte regenerative Therapien als Lösungsansatz.....	5
1.4 Fettgewebe als vielversprechende Quelle.....	9
1.5 Ziele der Arbeit.....	9
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>10</b>
2.1 Zellkultur von humanen mesenchymalen Stromazellen (MSC).....	10
2.1.1 Isolierung aus Knochenmark (bmMSC).....	10
2.1.2 Isolierung aus Fettgewebe (ADSC).....	12
2.1.3 Einfrieren/Auftauen von MSC.....	14
2.1.4 Expansion in 3 verschiedenen GMP-konformen Medien.....	15
2.1.5 Adipogene, osteogene und myogene Differenzierung.....	18
2.2 Mikroskopie.....	20
2.2.1 Lichtmikroskopie.....	20
2.2.2 Histochemie.....	20
2.2.2.1 Von Kossa Färbung.....	20
2.2.2.2 Oil Red O Färbung.....	21
2.3 Durchflusszytometrie.....	21
2.4 qRT-PCR.....	24
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>30</b>
3.1 Analyse typischer Merkmalskriterien von definiertem humanem Biopsiematerial.....	30
3.1.1 Identifizierung von Bindungseigenschaften an Kunststoff (Kunststoff-Adhärenz).....	31
3.1.2 Identifizierung charakteristischer Differenzierungspotentiale.....	34
3.1.3 Identifizierung charakteristischer Oberflächenantigene.....	37
3.1.4 Identifizierung von charakteristischen Fibroblasten-Merkmalen	45
3.2 Analyse von osteogenen, adipogenen und myogenen Markergenen von definiertem MSC-Biopsiematerial.....	46
3.2.1 Analyse des adipogenen Markers PPAR $\gamma$ 2 nach adipogener Differenzierung der ADSC.....	47

3.2.2	Analyse von osteogenen Markern nach osteogener Differenzierung der ADSC .....	50
3.2.2.1	Osteopontin .....	51
3.2.2.2	Runx2 .....	53
3.2.3	Analyse von glattmuskulären Markern nach myogener Differenzierung der ADSC .....	55
3.2.3.1	Myh11 .....	56
3.2.3.2	Transgelin.....	59
3.2.4	Analyse von adipogenen, osteogenen und myogenen Markern nach myogener Differenzierung der ADSC.....	63
3.3	Gesamtbetrachtung .....	69
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>71</b>
4.1	Analyse typischer Merkmalskriterien von definiertem humanem Biopsiematerial .....	71
4.2	Analyse von osteogenen, adipogenen und myogenen Markergenen von definiertem MSC-Biopsiematerial .....	73
4.3	Vergleich verschiedener Expansionsmedien .....	76
4.4	Ansatz „Heterogenität unter MSC“ und Ausblick.....	77
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>82</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>83</b>
<b>7.</b>	<b>Erklärungen zum Eigenanteil.....</b>	<b>88</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AD = adipogenes Differenzierungsmedium

ADSC = adipose tissue derived stem cells / mesenchymale Stammzellen aus Fettgewebe

ANOVA = analysis of variance / Varianzanalyse

bmMSC = bone marrow MSC / mesenchymale Stammzellen aus Knochenmark

CD = cluster of differentiation (immunphänotypische Oberflächenmerkmale von Zellen)

CM = control media (Kontrollmedium für die myogene Differenzierung)

DM = Myogenes Differenzierungsmedium

DMSO = Dimethylsulfoxid (Lösungsmittel)

DMEM HG = Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose (4500 mg/L glucose)

DMEM LG = Dulbecco's Modified Eagle Medium Low Glucose (1000mg/L glucose)

FACS = fluorescence-activated cell sorting / Durchflusszytometrie

FCS = fetal calf serum / Fetales Kälberserum

GAPDH = Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase (Enzym der Glycolyse)

GMP = Good Manufacturing Practice

GMP+ P+ = GMP-konformes Medium mit Plasma + Plättchenextrakt

GMP+ S+ = GMP-konformes Medium mit Serum + Plättchenextrakt

GMP+ S- = GMP-konformes Medium mit Serum ohne Plättchenextrakt

HLA = Humanes Leukozytenantigen

MM = „Mangelmedium“ (Kontrollmedium der adipogenen u. osteogenen Diff.)

MSC = Mesenchymal stromal cell / Mesenchymale Stammzelle

Myh-11 = Myosin heavy chain 11

NIH = National Institutes of Health, USA

OD = Osteogenes Differenzierungsmedium

PBS = Phosphat buffered saline

PFEA = PBS-FCS-EDTA-Natriumazid

PPAR $\gamma$ 2 = Peroxisome proliferation-activated receptor  $\gamma$  2

PPIA = Peptidylprolyl-isomerase A

qRT-PCR = quantitative real-time polymerase chain reaction

Runx2 = Runt-related transcription factor 2

SSC-FSC-Blot = Side scatter – Forward scatter – Blot bei der Durchflusszytometrie

# **1. Einleitung**

## **1.1 Problematik der Harninkontinenz**

Kontinenz, im Sinne der Kontrolle über das Wasserlassen, ist eine Fähigkeit, die der Mensch zu Beginn seines Lebens zunächst erwerben muss und die im Alltag von großer Bedeutung ist.

Bei mangelnder Kontrolle über den Urinabgang spricht man von Harninkontinenz. Im Jahre 2002 definierte die Internationale Kontinenzgesellschaft (International Continence Society ICS) Harninkontinenz als „jeden unfreiwilligen Harnverlust“ und unterschied verschiedene Formen der Harninkontinenz.

Stressinkontinenz beschreibt unfreiwilligen Harnverlust während des Hustens oder Niesens oder bei körperlicher Anstrengung bzw. Betätigung wie zum Beispiel Heben und Tragen. Synonym wird auch der Begriff Belastungsinkontinenz verwendet.

Dranginkontinenz beschreibt unfreiwilligen Harnverlust während oder unmittelbar nach Verspüren eines Harndranges.

Des Weiteren existiert eine Mischinkontinenz, bei der sowohl Symptome der Stressinkontinenz als auch Symptome der Dranginkontinenz auftreten.

Ebenso kann ein kontinuierlicher Harnverlust auftreten sowie ein Harnverlust in bestimmten Situationen, wie zum Beispiel während des Lachens oder des Geschlechtsverkehrs.

Nächtliches Einnässen sowie ein Nachtröpfeln von Urin unmittelbar nach dem Toilettengang stellen per Definition ebenfalls Formen der Harninkontinenz dar.

Irwin et al. schätzten in ihrer Studie aus dem Jahre 2011 die weltweite Prävalenz der Harninkontinenz für das Jahr 2018 auf 21,6%, entsprechend 423 Millionen Menschen (Irwin et al., 2011). Da Harninkontinenz vor allem die älteren Bevölkerungsschichten

betrifft (Irwin et al., 2006) und gleichzeitig das Durchschnittsalter der Weltbevölkerung steigt, ist folglich ein Anstieg der Prävalenz der Harninkontinenz anzunehmen.

Eine Harninkontinenz bedeutet für die Betroffenen in der Regel eine Minderung der Lebensqualität, insbesondere junge Menschen fühlen sich beeinträchtigt (Hunskaar and Vinsnes, 1991).

Doch nicht nur für den erkrankten Patienten selbst stellt die Harninkontinenz eine Belastung dar, auch die Gesellschaft ist betroffen. So müssen die Kosten der Erkrankung getragen werden, beginnend bei den direkten Kosten für Diagnostik und Therapie, Hygieneartikel, usw. über versteckte Kosten bei krankheitsbedingtem Ausfall am Arbeitsplatz und Kosten für etwaige Folgeerkrankungen wie vermehrt auftretende Infektionen. Genaue Zahlen sind aufgrund variierender Definitionen und Häufigkeitsangaben bzgl. der Harninkontinenz sowie variierender Ausprägtheit der Symptome schwer zu bestimmen. (Milsom et al., 2014)

Milsom et al. untersuchten im Jahre 2014 die wirtschaftlichen Folgen der Drangharninkontinenz im Rahmen des Syndroms einer überaktiven Blase. Die Internationale Kontinenzgesellschaft definiert das Syndrom der überaktiven Blase als gesteigerten Harndrang und Nykturie mit oder ohne begleitende Drangharninkontinenz in Abwesenheit eines Harnwegsinfekts oder anderer eindeutiger Pathologien (Abrams et al., 2003). Die direkten Kosten für Patienten, die an einer überaktiven Blase leiden, betragen in Deutschland jährlich etwa 1,2 Milliarden Euro, die Kosten für Aufenthalte in Pflegeheimen nicht mit einbezogen (Irwin et al., 2009). Einen Großteil der Therapiekosten verursachten die Ausgaben für Hygieneartikel, insbesondere Slipeinlagen (Milsom et al., 2014).

Wie oben bereits beschrieben, ist ein Anstieg der Prävalenz der Harninkontinenz zu erwarten. Folglich muss in Zukunft auch mit einem deutlichen Anstieg der durch die Harninkontinenz verursachten Kosten gerechnet werden.

Einer Harninkontinenz können verschiedenste Ursachen zugrunde liegen. Oft lässt sich nicht ein einzelner Auslöser eruieren, vielmehr ist es ein Zusammenspiel mehrerer Faktoren – wie auch die Kontinenz ein Zusammenwirken vieler Faktoren ist.

Risikofaktoren sind beispielsweise Schwangerschaft und Geburt, insbesondere vaginale Entbindungen, ein hoher BMI (body mass index), eine positive Familienanamnese bzw. genetische Veranlagung, Operationen wie zum Beispiel die Entfernung der Gebärmutter, hohes Alter und Obstipation. Zudem besteht ein Zusammenhang zwischen Nikotinabusus und einer erhöhten Harninkontinenzrate, dasselbe trifft für hohen Koffeinkonsum zu (Wood and Anger, 2014). Beim Mann muss als einer der bedeutendsten Risikofaktoren die radikale Prostatektomie genannt werden (Nyarangi-Dix et al., 2010)

Zum besseren Verständnis sollen im Folgenden die Grundzüge der Anatomie des menschlichen Urogenitaltrakts erläutert werden.

## **1.2 Anatomische Grundlagen der Harninkontinenz des Menschen**

Im Folgenden werden die Grundzüge der Anatomie des menschlichen Urogenitaltrakts erläutert, hierbei wurde sich an dem Werk „Duale Reihe – Anatomie“ (Aumüller et al., 2010) orientiert.

Die Harnblase ist ein Hohlorgan. Sie liegt im kleinen Becken hinter der Symphyse. An die Hinterwand der Harnblase grenzt beim Mann das Rektum. Bei der Frau befindet sich zwischen Harnblase und Rektum die Gebärmutter.

Die Harnleiter, welche den von den Nieren gebildeten Harn, ableiten, münden in die Harnblase. In der Harnblase wird der kontinuierlich gebildete Harn gespeichert bis es durch die Dehnung der Harnblasenwand zum Harndrang kommt und der Vorgang des Wasserlassens, die so genannte Miktion reflektorisch, jedoch unter bewusster Kontrolle (im Falle der vollständig erhaltenen Kontinenz), ausgelöst wird.

Die Wand der Harnblase besteht aus drei Schichten. Im Inneren wird die Harnblase von Schleimhaut ausgekleidet. Die mittlere Schicht entspricht der muskulären Wand der Harnblase. Der Ober- und Rückseite der Harnblase liegt als äußerste Schicht das Bauchfell auf. Die Teile der Blase, deren äußerste Schicht nicht vom Bauchfell gebildet wird, werden stattdessen vom viszeralem Blatt der Beckenfaszie bedeckt.

Die oben erwähnte muskuläre Wand der Harnblase ist ihrerseits ebenso dreischichtig aufgebaut. Eine äußere Längsschicht, eine mittlere zirkuläre Schicht und eine innere Längsschicht bilden den sogenannten Musculus detrusor vesicae. Die Kontraktion dieses Muskels führt zur Miktion, der Harn wird über die Harnröhre nach außen abgeleitet.

Am Harnblasengrund befindet sich das so genannte Trigonum vesicae, der dreieckförmige Bereich zwischen der Einmündung der beiden Harnleiter und dem Abgang der Harnröhre. In diesem Bereich ist der Aufbau der Harnblasenwand ein anderer. Die Muskelschicht ist hier nicht, wie oben beschrieben, eindeutig in drei Schichten zu differenzieren. Besonders hervorzuheben ist die Verdichtung der Muskulatur zum Musculus sphincter urethrae internus, dem inneren Teil des Schließmuskels, der sich um den blasennahen Teil der Harnröhre legt und zur Kontinenz beiträgt. Es handelt sich hier um sogenannte „glatte Muskulatur“, die nicht bewusst kontrahiert werden kann. Eine Kontraktion oder das Erschlaffen dieser Muskulatur geschieht unwillkürlich, durch unbewusste Vorgänge.

Die Kontinenz wird weiterhin gewährleistet vom Musculus sphincter urethrae externus, dem äußeren Teil des Schließmuskels. Dieser entspricht einem Teil des Beckenbodenmuskels Musculus transversus perinei profundus, welcher die Harnröhre umfasst. Hierbei handelt es sich um quergestreifte Muskulatur, welche vom Nervus pudendus innerviert wird und willkürlich, das heißt bewusst, gesteuert werden kann. Dies bietet mit der Möglichkeit des Beckenbodentrainings einen Ansatzpunkt für die Behandlung der Harninkontinenz (s. 1.3).

Zudem wird die Kontinenz unterstützt durch einen Wulst am Abgang der Harnröhre aus der Blase. Dieser Wulst enthält ein Venengeflecht und wölbt sich durch Füllung der Venen hervor, sodass es zu einem abdichtenden Effekt kommt.

Zusammenfassend wird die Kontinenz also erreicht durch:

- Innerer Schließmuskel (M. sphincter urethrae internus als Teil der Harnblasenwand)
- Äußerer Schließmuskel (M. sphincter urethrae externus als Teil des M. transversus perinei profundus)

- Venengeflecht

Harnrang entsteht durch einen zunehmenden Druckanstieg in der Blase aufgrund ihrer zunehmenden Füllung, registriert von nach zentral laufenden Nervenfasern, den Nervi splanchnici pelvici. Hierdurch wird unwillkürlich eine Kontraktion des M. detrusor vesicae (Harnblasenmuskel, s.o.) getriggert. Diese Kontraktion der Muskelschicht der Harnblase bewirkt, dass die Mündungen der Harnleiter verschlossen werden, während der Abgang der Harnröhre erweitert wird. Der innere Schließmuskel erschlafft ebenso unwillkürlich. Das Wasserlassen wird nun durch die willkürliche, also kontrollierte Entspannung des äußeren Schließmuskels bewirkt.

Bei anatomischen Veränderungen z.B. aufgrund von Schwangerschaft und vaginaler Entbindung, Übergewicht oder Bindegewebsschwäche im Alter mit folgender Senkung des Beckenbodens kann das feine Zusammenspiel aus Verschlussmechanismen und Wasserlassen gestört sein und eine Harninkontinenz entstehen (s. 1.1). Auch hat beispielsweise eine Durchtrennung von Nervenfasern wie bei einer Querschnittslähmung oder im Rahmen einer Operation zur Folge, dass die oben beschriebenen physiologischen Mechanismen nicht mehr gewährleistet sind.

### 1.3 Zellbasierte regenerative Therapien als Lösungsansatz

Abhängig von der Art der Harninkontinenz stehen derzeit, wie von Wood und Anger (2014) dargestellt, verschiedene Therapieansätze zur Verfügung:

Zunächst können Risikofaktoren ausgeschaltet werden. So kann zum Beispiel bei hohem BMI durch eine Gewichtsreduktion eine Besserung erzielt werden. Weitere Maßnahmen sind eine Reduktion des Nikotin- und Koffeinkonsums und die Therapie einer bestehenden Obstipation.

Eine entscheidende Rolle in der konservativen Therapie der Harninkontinenz spielt das **Beckenbodentraining**, auch in Kombination mit Biofeedback (Nyarangi-Dix et al., 2010).

Im Falle einer Drangharninkontinenz kann eine Pharmakotherapie mit **Anticholinergika** in Betracht gezogen werden, doch es gibt Kontraindikationen wie zum Beispiel ein Engwinkelglaukom. Zudem können unerwünschte Arzneimittelwirkungen wie ein trockener Mund und Obstipation auftreten, was von vielen Patienten nicht gut toleriert wird. So brechen innerhalb eines Jahres 30-91% der Frauen eine anticholinerge Therapie ab (Wood and Anger, 2014). Weiterhin kommen dann minimalinvasive Therapien wie die intravesikale Injektion von **OnabotulinumtoxinA** und eine sakrale **Neuromodulation** in Frage. Mögliche Nebenwirkung der Injektion von OnabotulinumtoxinA sind Harnverhalt und Infektionen, unter Umständen kann vorübergehend die Einlage eines Katheters oder das regelmäßige Selbstkatheterisieren notwendig werden. Wird eine sakrale Neuromodulation durchgeführt, so werden in operativen Eingriffen Elektroden und ein Generator eingesetzt. Oft muss revidiert werden, aufgrund von Schmerzen, Neuplatzierung des Generators nach ungewollter Migration oder Ersatz desselben.

Für die Behandlung einer Stressinkontinenz gibt es keine etablierte medikamentöse Therapie mit der Ausnahme des Einsatzes von Duloxetin, einem Antidepressivum, in Großbritannien. Patienten berichten jedoch, analog zum Einsatz von Anticholinergika bei der Drangharninkontinenz, von einer hohen Rate an Nebenwirkungen wie Übelkeit, Obstipation, Mundtrockenheit und Müdigkeit (Li et al., 2013). Die OnabotulinumtoxinA-Injektion und Neuromodulation sind der Therapie der Drangharninkontinenz vorbehalten, sodass bei Versagen der konservativen Therapiemaßnahmen wie des Beckenbodentrainings für die Behandlung der Belastungsharninkontinenz die Chirurgie zum Einsatz kommt. Verschiedene Verfahren stehen zur Auswahl, im Folgenden sollen einige der relevanten genannt werden. Als frühes chirurgisches Verfahren zur Therapie der Belastungsharninkontinenz der Frau wurde die **Kolposuspension nach Burch** etabliert. Hierbei werden Blasenhalshals und Scheidenvorderwand durch Nähte mit nichtauflösendem Faden im umgebenden Gewebe fixiert und dadurch angehoben, sodass sich ein die Kontinenz begünstigender Winkel ergibt. Bei einer **Sakrokolpopexie** wird der Scheidenstumpf mithilfe eines Netzes am Os sacrum (Kreuzbein) fixiert. Neuere Verfahren sind die Einlage eines **Spannungsfreien Transvaginalen Tapes** (Tension free vaginal tape, TVT) oder eines **Transobturatorischen Tapes** (TOT), bei denen Bänder um die Harnröhre herum gelegt und suprapubisch oder transobturatorisch ausgeleitet werden. Ist die Harninkontinenz durch eine Senkung der Blase bzw. des vorderen

Scheidengewölbes (mit-)bedingt so kann eine **Vordere Scheidenplastik** die Symptomatik lindern. Wölbt sich dagegen das Rektum in das hintere Scheidengewölbe hinein, so wird eine **Hintere Scheidenplastik** durchgeführt. Meist nur vorübergehende Besserung erzielt das Einbringen von sogenannten „**Bulking Agents**“ um die Harnröhre herum (Jonsson Funk et al., 2012). In der Vergangenheit wurden hier Substanzen wie Teflon, Kollagen und autologes Fett eingesetzt, aktuell kommt meist Silikon zum Einsatz. In schweren Fällen kann ein **artifizieller Sphinkter**, d.h. ein künstlicher Verschlussmechanismus implantiert werden. Das Implantat besteht aus einer mit Wasser gefüllten Manschette, die um die Harnröhre gelegt wird, einem Reservoir sowie einer Pumpe, die bei Männern im Hodensack, bei Frauen in den Schamlippen platziert wird. Die um die Harnröhre gelegte Manschette dichtet diese ab. Zum Wasserlassen wird die Pumpe durch Knopfdruck aktiviert und dadurch das Wasser aus der Manschette in das Reservoir, das zum Beispiel in die Bauchhöhle eingelegt werden kann, gepumpt.

Einige Patienten können oder sollten jedoch aufgrund ihres Allgemeinzustandes und etwaiger Komorbiditäten nicht einer Operation unterzogen werden und auch bei optimalen Voraussetzungen sind operative Eingriffe stets mit Risiken verbunden, beginnend bei den Risiken einer Narkose über Blutungen, Verletzung von Nerven und in der Nähe des OP-Gebiets befindlichen Organen mit daraus resultierenden langfristigen Einschränkungen wie beispielsweise einer Störung der Sexualfunktion, Infektionen, insbesondere bei Einbringen von Fremdmaterial (Netzen) und weiteren. Zudem möchten viele Patienten keiner Operation unterzogen werden und die Harninkontinenzchirurgie ist nicht immer von langfristigem Erfolg gekrönt. Jonsson Funk et al. beobachteten über 10 Jahre hinweg die Langzeitergebnisse bei 155.458 Frauen, die sich in den USA einer Harninkontinenzoperation unterzogen hatten. Es zeigte sich, dass beim Einsatz von Bulking agents mit 61,2 % die meisten Revisionen nötig waren. Die wenigsten Revisionen waren im Falle der Kolposuspension nach Burch nötig; dennoch waren es hier 10,8 % (Jonsson Funk et al., 2012).

Ist eine Operation nicht gewünscht oder nicht möglich, bleibt für die Therapie der Belastungsharninkontinenz oft nur noch der Einsatz eines Pessars, einem Stützutensil, welches Frauen vaginal einführen können, dem jedoch langfristig kein großer Nutzen zugesprochen wird (Richter et al., 2010).

Wünschenswert wäre es, mit möglichst geringer Invasivität, verbunden mit entsprechend wenigen Risiken, einen möglichst großen und langanhaltenden Therapieeffekt für die Belastungsharninkontinenz zu erzielen. Liegt ein Defekt des unter 1.2 beschriebenen Schließmuskelapparates (Sphinkter) vor, so könnte das Einbringen neuen gesunden Muskelgewebes an zwei der o.g. drei kontinenserhaltenden Faktoren (s. 1.2) ansetzen (Aicher et al., 2014) und eine ursächliche Therapieoption darstellen. Denkbar wäre die Generierung von Muskelzellen aus mesenchymalen Stromazellen (MSC), einer Art „Stammzellen“.

Mesenchymale Stromazellen sind sich selbst erneuernde multipotente Zellen, das bedeutet sie können sich in verschiedene Zelltypen eines Ursprungsgewebes differenzieren. MSC können sich in vivo und in vitro in Zellen des Mesoderms, welches dem mittleren Keimblatt während der Embryonalentwicklung entspricht, differenzieren, so zum Beispiel Osteozyten, Adipozyten und Myozyten.

MSC sind im Knochenmark sowie perivaskulär in vielen anderen Geweben wie zum Beispiel placentarem Gewebe, Nabelschnur und Fettgewebe zu finden.

In vielen Bereichen der Medizin wird derzeit das Potential von MSC im Rahmen der zellbasierten regenerativen Therapien erforscht. Im Jahre 2015 waren es über 500 beim NIH registrierte klinische Studien mit MSC im Fokus (Billing et al., 2016). In Studien als vorteilhaft erwies sich eine Therapie mit MSC bereits beispielsweise bei der Graft versus Host Disease (Amorin et al., 2014) und autoimmunen Erkrankungen wie Lupus erythematoses und Sklerodermie (Cras et al., 2015). Eine MSC-basierte oder -unterstützte Therapie von Lebererkrankungen wie zum Beispiel der Leberzirrhose wird ebenfalls erforscht (Guo et al., 2016, Eom et al., 2015). Im Allgemeinen bietet der Einsatz von MSC in der Medizin vielfältige Möglichkeiten und erscheint überaus vielversprechend – so auch im Falle der Belastungsharninkontinenz.

Eine kürzlich veröffentlichte Studie widmete sich der regenerativen Therapie der Harninkontinenz bei Männern nach radikaler Prostatektomie bzw. Laser-Enukleation der Prostata durch periurethrale Injektion von autologen Stammzellen aus Fettgewebe (Gotoh et al., 2019). Bei 10 der 13 behandelten Patienten konnte auch noch 4 Jahre nach dem minimalinvasiven Eingriff eine deutliche Reduktion des ungewollten Harnverlusts

festgestellt werden; in einem Fall wurde sogar die vollständige Kontinenz wiederhergestellt.

#### **1.4 Fettgewebe als vielversprechende Quelle**

Mesenchymale Stromazellen lassen sich wie unter 1.3 bereits beschrieben, aus verschiedenen Geweben isolieren, so zum Beispiel aus Knochenmark und Plazentagewebe. Die Knochenmarkpunktion ist jedoch eine vergleichsweise invasive und schmerzhafteste Prozedur, die zudem mit Risiken verbunden ist. Plazentagewebe ist nur nach der Schwangerschaft einer Frau verfügbar. In der Regel mehr als ausreichend und zu jeder Zeit vorhanden ist das Fettgewebe im menschlichen Körper, welches durch eine herkömmliche Liposuktion einfach und risikoarm zu gewinnen ist und so als optimale Quelle für die Gewinnung von MSC dienen könnte. Zudem belegen Daten, dass Fettgewebe eine weitaus höhere Stammzellichte aufweist als Knochenmark (Fraser et al., 2006).

#### **1.5 Ziele der Arbeit**

Ziel der Arbeit ist es zu untersuchen ob sich MSC aus Fettgewebe unter GMP-konformen Bedingungen, die Voraussetzung für eine spätere Verwendung im klinischen Alltag sind, isolieren, kulturell anzüchten und effektiv glattmuskulär differenzieren lassen um so im Rahmen der zellbasierten regenerativen Therapie der Harninkontinenz zum Einsatz kommen zu können. Des Weiteren soll untersucht werden ob die Zusammensetzung des Expansionsmediums (s. 2.1.4) Einfluss auf die Differenzierungsfähigkeit nimmt.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Zellkultur von humanen mesenchymalen Stromazellen (MSC)**

Im Folgenden soll das Vorgehen der Kultur der im Rahmen dieser Arbeit aus definiertem humanen Biopsiematerial isolierten Zellen erläutert werden.

Alle Arbeitsschritte bei denen die aus definiertem humanen Biopsiematerial isolierten Zellen nicht in geschlossenen Gefäßen vorlagen wurden an der Sterilbank (BDK) ausgeführt.

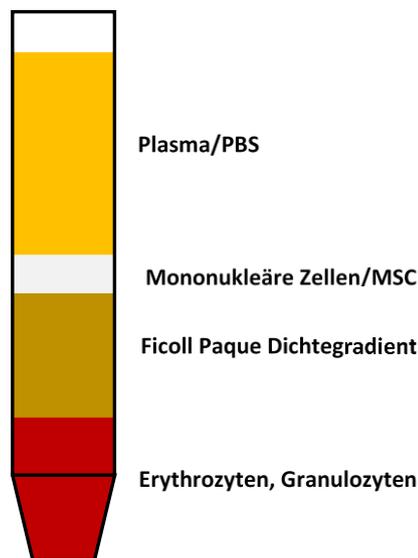
#### **2.1.1 Isolierung aus Knochenmark (bmMSC)**

Das für diese und vergleichbare vorherige Arbeiten der Forschergruppe KFO 273 verwendete Knochenmark wurde im Rahmen von Hüfttotalendoprothesen-Operationen, durchgeführt von der BG Unfallklinik, Tübingen, aus dem Femurschaft verschiedener Patienten gewonnen. Die Verwendung des Knochenmarks wurde von der Ethikkommission unter AZ623/2013/BO genehmigt und Zellen wurden nur von Patienten mit deren Einverständnis aufgearbeitet.

Die Lieferung erfolgt in 50ml-Zentrifugationsröhrchen (Falcon) unter Zusatz von 5.000 Units Heparin (Heparin-Na 1000 IE/ml, Roth).

Das Biopsat wird mittels einer Pipette (BD Falcon) in einem 1:1 Verhältnis mit PBS (Dulbecco's Phosphat buffered saline, Lonza) gemischt und dabei unter Zuhilfenahme einer Pinzette von größeren Knochenfragmenten befreit. Anschließend erfolgt eine 10-minütige Zentrifugation (Zentrifuge, Eppendorf) bei 150 x g bei Raumtemperatur, wodurch sich eine Lipidschicht als oberste Schicht vom Rest des Materials absetzt. Diese Lipidschicht wird mittels einer Pipette abgesaugt und verworfen. Der Vorgang des Waschens mit PBS, Entfernen größerer Knochenfragmente, Zentrifugation und Verwerfen der Lipidschicht wird nochmals wiederholt. Am Boden des Zentrifugationsröhrchens findet sich ein Zellpellet. Der Überstand wird abgesaugt und verworfen, das Zellpellet wird in etwa 30ml PBS resuspendiert und so in einem frischen

Zentrifugationsröhrchen auf einen 10ml Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer Dichtegradienten (Ficoll-Paque™ Premium Dichte: 1,077g/ml, GE Healthcare Biosciences) aufgetragen. Es erfolgt eine 30-minütige Zentrifugation bei 400 x g und Raumtemperatur mit möglichst schonender Beschleunigung und ohne Bremse, worunter sich die verschiedenen Zelltypen des in PBS resuspendierten Zellpellets gemäß ihrer Dichte auftrennen. Die folgende Abbildung zeigt die sich ergebenden Schichten.



**Abbildung 1: Schemazeichnung eines Zentrifugationsröhrchens nach Zentrifugation eines Knochenmark-PBS-Gemisches mit Ficoll Paque Dichtegradient.**

Die sich über dem Ficoll befindliche Schicht der mononukleären Zellen, darunter auch mesenchymale Stromazellen, wird mittels Pipette abgesaugt, erneut in PBS resuspendiert und bei 1500 x g für 7 min. zentrifugiert. Am Boden des Zentrifugationsröhrchens findet sich ein Zellpellet. Dieses wird vom Überstand befreit, in einer geringen Menge eines GMP-konformen (GMP+) Expansionsmediums resuspendiert und so gleichmäßig auf drei frische Zentrifugationsröhrchen verteilt. Diese werden nun mit verschiedenen GMP+ Expansionsmedien aufgefüllt: Es ergibt sich ein Zentrifugationsröhrchen mit GMP+ Medium, das Serum und Plättchenextrakt enthält (S+); eines, das Serum ohne

Plättchenextrakt enthält (S-) und eines, das Plasma und Plättchenextrakt enthält (P+). Die detaillierte Zusammensetzung der hier verwendeten Expansionsmedien ist unter 2.1.4 beschrieben.

Es wird nun erneut zentrifugiert und der Überstand abgenommen und verworfen um das Zellpellet anschließend in 10ml reinem GMP+ S+ bzw. GMP+ S- oder GMP+ P+ zu resuspendieren und in T75-Zellkulturflaschen (BD Biosciences) auszusäen. Anschließend wird bei 37° Celsius / 5% CO<sub>2</sub> inkubiert (CO<sub>2</sub> Inkubator Serie CB, Binder). Etwa 24 Stunden nach Aussaat wird ein erster Medienwechsel vollzogen, bei dem nur intakte am Kunststoff adhärente Zellen in der Zellkulturflasche verbleiben.

### **2.1.2 Isolierung aus Fettgewebe (ADSC)**

Die Mehrzahl des für diese Arbeit verwendeten Fettgewebes wurde im Rahmen von urologischen Operationen, die von der Universitätsklinik für Urologie in Tübingen durchgeführt wurden, gewonnen. Dabei handelte es sich beispielsweise um perirenales Fettgewebe. Die Probe F11 stammte aus einer Liposuktion, durchgeführt von einer Praxis in Tübingen. Die Spender waren mit der Aufarbeitung des Gewebes einverstanden.

<b>Probe:</b>	<b>Herkunft:</b>	<b>Iso/Exp/RP:</b>	<b>DZ:</b>	<b>Diff.:</b>	<b>HC:</b>	<b>PCR:</b>
<b>F3</b>	Universitätsklinik für Urologie, Tübingen	✓				
<b>F4</b>	Universitätsklinik für Urologie, Tübingen	✓	✓	✓	✓	✓
<b>F5</b>	Universitätsklinik für Urologie, Tübingen	✓	✓	✓	✓	✓
<b>F6</b>	Universitätsklinik für Urologie, Tübingen	✓				
<b>F7</b>	Universitätsklinik für Urologie, Tübingen	✓		✓	✓	✓
<b>F8</b>	Universitätsklinik für Urologie, Tübingen	✓				
<b>F9</b>	Universitätsklinik für Urologie, Tübingen	✓				
<b>F10</b>	Universitätsklinik für Urologie, Tübingen	✓		✓		✓
<b>F11</b>	Arztpraxis, Tübingen	✓		✓		✓

**Tabelle 1: Übersicht über in dieser Arbeit bearbeitete Proben. Iso/Exp/RP = Isolation/Expansion/Rückstellproben, DZ = Durchflusszytometrie, Diff. = Differenzierung, HC = histochemische Untersuchung, PCR = Polymerase chain reaction.**

Die Lieferung des Biopsiematerials erfolgte in 50ml-Zentrifugationsröhrchen (Falcon).

Zunächst wird das Fettgewebe mithilfe von Skalpell und Pinzette von größeren Blutgefäßen und anderen, nicht die erwünschten Zellen enthaltenden, Strukturen befreit. Anschließend wird das Fettgewebe mittels eines Skalpells zerkleinert und in ein Zentrifugationsröhrchen überführt, welches ein Gemisch aus PBS, 1% bovines Serumalbumin (BSA) und 0,1% Kollagenase I enthält. Nachdem mittels eines Vortexmischers für ausreichende Durchmischung des Gewebes mit dem PBS-Gemisch gesorgt wurde, wird für 30 min. auf einem Schüttler mit 200 rpm bei 37° C inkubiert. Im Anschluss wird das Zentrifugationsröhrchen mit GMP+ P+ Medium aufgefüllt und gemischt, woraufhin eine Inkubation für 10 min. bei Raumtemperatur erfolgt. Es bildet

sich eine auf dem Gemisch schwimmende Phase, die Adipozyten enthält; diese wird abgesaugt. Die von den Adipozyten befreite Zellsuspension wird durch ein 100 µm Zellsieb filtriert und danach für 5 min. bei 1200 rpm zentrifugiert. Am Boden des Zentrifugationsröhrchens findet sich ein Zellpellet. Der Überstand wird abgesaugt und verworfen, das Zellpellet wird in 1,5 ml GMP+ P+ Medium resuspendiert. Die Suspension wird gleichmäßig auf 3 Zentrifugationsröhrchen verteilt und die Zentrifugationsröhrchen jeweils mit einem GMP+ Medium aufgefüllt: eines mit GMP+ P+ Medium, eines mit GMP+ S+ Medium und eines mit GMP+ S- Medium. Es folgt eine Zentrifugation bei 1200 rpm für 5 min. Erneut findet sich am Boden eines jeden Zentrifugationsröhrchens ein Zellpellet. Die Überstände werden abgesaugt und die Zellpellets in je 10 ml des zuvor benutzten Mediums resuspendiert. Nun werden die 10 ml Suspension in je eine T75-Zellkulturflasche (BD Biosciences) überführt und die Inkubation bei 37° Celsius / 5% CO<sub>2</sub> begonnen (CO<sub>2</sub> Inkubator Serie CB, Binder). Etwa 24 Stunden nach Aussaat wird ein erster Medienwechsel vollzogen, bei dem nur intakte am Kunststoff adhäre Zellen in der Zellkulturflasche verbleiben.

### **2.1.3 Einfrieren/Auftauen von MSC**

Um einen Vorrat der für die Experimente verwendeten Zellen für spätere Untersuchungen zu gewinnen, wurden während der Expansion Zellen für Rückstellproben mitgeführt und diese anschließend eingefroren.

Hierzu wird das Medium, in dem die Zellen eingefroren werden, stets frisch hergestellt. Dieses enthält zu 50 % das jeweilige Expansionsmedium GMP+ S+/S-/P+, zu 40 % fetales Kälberserum (FCS, Biochrome) und zu 10 % das organische Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich). Das Einfriermedium wird bis zu seiner Verwendung bei -20° C aufbewahrt.

Die einzufrierenden Zellen sind am Boden einer Zellkulturflasche adhären. Zunächst wird das Expansionsmedium aus der Zellkulturflasche abgesaugt. Es folgt ein Waschvorgang, bei dem etwa 10 ml PBS (Dulbecco's Phosphat buffered saline, Lonza) in die Zellkulturflasche gegeben werden. Nach Schwenken der Zellkulturflasche für eine

gleichmäßige Verteilung des PBS auf dem Zellrasen wird das PBS wieder abgesaugt. Dieser Waschvorgang wird nochmals wiederholt.

Um die Zellen vom Kunststoff der Zellkulturflasche zu lösen, werden 3 ml Trypsin (Sigma-Aldrich) in die Zellkulturflasche gegeben, diese geschwenkt und für etwa 2 min. bei 37° Celsius / 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Durch Klopfen gegen die Zellkulturflasche kann die Ablösung der Zellen unterstützt werden. Unter dem Lichtmikroskop wird kontrolliert, ob die Ablösung erfolgreich erfolgt ist. Dies ist daran zu erkennen, dass die Zellen eine sphärische Form annehmen und sich frei in der Flüssigkeit des Trypsins bewegen. Durch Zugabe von 3 ml GMP+ Mediums wird das Trypsin inaktiviert. Die Zellsuspension wird nun in ein Zentrifugationsröhrchen überführt. Es folgt eine Zentrifugation bei 1500 rpm für 7 min. Während dieser bildet sich ein Zellpellet am Boden des Zentrifugationsröhrchens sowie ein Überstand. Der Überstand wird abgesaugt. Das Zellpellet wird nun in 1,5 ml des zuvor frisch hergestellten Einfriermediums, welches bis zuletzt bei -20° C aufbewahrt wurde, resuspendiert. Die Zellsuspension wird im Anschluss in ein Kryoröhrchen (Thermo Scientific), das ebenso bis zuletzt bei -20° C gelagert wurde, überführt. Das Kryoröhrchen, welches die Zellsuspension enthält, wird unverzüglich für mindestens 24 Stunden bei -80° C gelagert. Danach erfolgt die dauerhafte Lagerung in einem mit flüssigem Stickstoff gekühlten Tank (Kryotank LS 3000, Taylor Wharton Lab Systems).

Es ist auf ein zügiges Vorgehen zu achten, da DMSO bei Raumtemperatur zelltoxische Eigenschaften besitzt.

#### **2.1.4 Expansion in 3 verschiedenen GMP-konformen Medien**

Die, wie unter 2.1.1 bzw. 2.1.2 beschrieben, aus Knochenmark oder Fettgewebe isolierten Zellen werden in T75-Zellkulturflaschen (BD Biosciences) bei 37° Celsius / 5% CO<sub>2</sub> im Inkubator (CO<sub>2</sub> Inkubator Serie CB, Binder) gehalten. Nach einem ersten vollständigen Wechsel des Expansionsmediums 24 Stunden nach Aussaat, erfolgen die Wechsel anschließend zweimal wöchentlich. Dabei wird das Expansionsmedium abgesaugt und

verworfen und durch 10ml frisches, zuvor im Wasserbad (W12, Preiss Daimler Medingen) erwärmtes Expansionsmedium ersetzt.

Die MSC einer jeden Gewebeprobe werden in den folgenden drei verschiedenen GMP-konformen Expansionsmedien gehalten:

- GMP+ S+
- GMP+ S-
- GMP+ P+

Als Grundlage des GMP+ Mediums dient Dulbecco's Modified Eagle Medium 1000mg/L glucose (DMEM low glucose, Gibco), 2,5 % HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure). Außerdem enthält das GMP+ Medium 0,2% Heparin 1000 IE (Heparin-Na 1000 IE/ml, Roth), sowie 1% Glutamin 2mM und 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco).

Das GMP+ **P+** Medium enthält außerdem zu 5 % **Plasma** (PAA Laboratories) **und** zu 5 % **Thrombozytenkonzentrat** (human, ZKT Tübingen).

Das GMP+ **S+** Medium enthält zu 5 % **Serum** (human, ZKT Tübingen) **und** zu 5 % **Thrombozytenkonzentrat**.

Das GMP+ **S-** Medium enthält zu 5 % **Serum**, jedoch **kein Thrombozytenkonzentrat**.

Sobald die MSC eine Konfluenz von etwa 80 % erreicht haben, was unter dem Lichtmikroskop überprüft wird, werden sie in die nächste Passage umgesetzt. Dadurch soll ein Absterben der Zellen aufgrund eines Mangels an Nährstoffen oder Platz oder aufgrund zu hoher Konzentration von Stoffwechselprodukten wie zum Beispiel Pyruvat vermieden werden. Ebenso soll durch das rechtzeitige Umsetzen in die nächste Passage eine Spontandifferenzierung, durch Zell-Zell-Kontakt begünstigt, vermieden werden.

Die Zellen sind am Boden einer T75-Zellkulturflasche (BD Biosciences) adhären. Zunächst wird das Expansionsmedium aus der Zellkulturflasche abgesaugt und verworfen. Es folgt ein Waschvorgang, bei dem etwa 10 ml PBS (Dulbecco's Phosphat buffered saline, Lonza) in die Zellkulturflasche gegeben werden. Nach Schwenken der

Zellkulturflasche für eine gleichmäßige Verteilung des PBS auf dem Zellrasen wird das PBS wieder abgesaugt. Dieser Waschvorgang wird nochmals wiederholt. Um die Zellen vom Kunststoff der Zellkulturflasche zu lösen, werden 3 ml Trypsin (Sigma-Aldrich) in die Zellkulturflasche gegeben, diese geschwenkt und für etwa 2 min. bei 37° Celsius / 5% CO<sub>2</sub> inkubiert (CO<sub>2</sub> Inkubator Serie CB, Binder). Durch Klopfen gegen die Zellkulturflasche kann die Ablösung der Zellen unterstützt werden. Unter dem Lichtmikroskop wird kontrolliert ob die Ablösung erfolgreich erfolgt ist; dies ist daran zu erkennen, dass die Zellen eine sphärische Form annehmen und sich frei in der Flüssigkeit des Trypsins bewegen. Durch Zugabe von 3 ml GMP+ Mediums wird das Trypsin inaktiviert. Die Zellsuspension wird nun in ein Zentrifugationsröhrchen (Falcon) überführt. Es folgt eine Zentrifugation bei 1500 rpm für 7 min (Zentrifuge Eppendorf). Während dieser bildet sich ein Zellpellet am Boden des Zentrifugationsröhrchens sowie ein Überstand. Der Überstand wird abgesaugt. Das Zellpellet wird nun in 10 ml des in der vorherigen Passage verwendeten Expansionsmediums resuspendiert. Anschließend wird mithilfe einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop die Konzentration der vitalen Zellen bestimmt. Dazu wird in einer 96-well Platte mithilfe einer Pipette die Zellsuspension mit Trypanblaulösung 0,4% (Sigma-Aldrich) in einem Verhältnis von 1:1 vermischt und im Anschluss in die Neubauer-Zählkammer (Assistent) gegeben und die darin enthaltenen vitalen Zellen gezählt. Diese vitalen Zellen erscheinen unter dem Lichtmikroskop hell, im Gegensatz zu abgestorbenen Zellen, welche blau sichtbar werden, da das Trypanblau aufgrund ihrer beschädigten Zellmembran ins Cytoplasma eindringt. Man erhält die Konzentration der vitalen Zellen im Gemisch aus Trypanblau und Zellsuspension. Um auf die Konzentration der vitalen Zellen in der Zellsuspension zu gelangen muss dieser Wert halbiert werden. Es folgt die erneute Aussaat der Zellen mit  $1,5 \times 10^5$  Zellen in 10 ml Expansionsmedium pro T75-Zellkulturflasche.

Bei Passagieren der MSC von der ersten in die zweite Passage werden die MSC sowohl in T75-Zellkulturflaschen für Differenzierungsversuche und Rückstellproben als auch in 6 well – Platten für spätere histochemische Untersuchungen (s. 2.2.2) ausgesät. Dabei wird pro well eine Anzahl von  $5 \times 10^4$  Zellen ausgesät und 2 ml Expansionsmedium hinzugegeben.

Weiterhin werden die MSC bei 37° Celsius / 5% CO<sub>2</sub> inkubiert (CO<sub>2</sub> Inkubator Serie CB, Binder).

Die Kultivierung über Primärkultur, erste und zweite Passage dient der Anreicherung der MSC. Daneben sind zunächst auch andere Zellen wie Erythrozyten und Monozyten in der Primärkultur zu finden. Diese wachsen jedoch im Gegensatz zu MSC langsamer und nicht Kunststoff-adhären und gehen somit, gewollt, beim Mediumwechsel sowie Passagieren verloren.

Sobald die MSC in der zweiten Passage eine Konfluenz von etwa 80 % erreichen, wird, wie unter 2.1.5 beschrieben, mit den Differenzierungsversuchen begonnen bzw. die Rückstellproben, wie unter 2.1.3 beschrieben, eingefroren.

### **2.1.5 Adipogene, osteogene und myogene Differenzierung**

Mit den Differenzierungsversuchen wird begonnen sobald die Zellen in der zweiten Passage eine Konfluenz von etwa 80 %, welche lichtmikroskopisch festgestellt wird, erreicht haben. Dazu wird das Expansionsmedium jeweils durch dieselbe Menge an verschiedenen Differenzierungsmedien bzw. entsprechenden Kontrollmedien ersetzt und die Zellen so weiterhin bei 37° Celsius / 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Ein Wechsel des entsprechenden Mediums erfolgt zweimal wöchentlich.

Die für die Differenzierung verwendeten Medien setzen sich wie folgt zusammen:

- Kontrolle der myogenen Differenzierung (Kontrollmedium „CM“):

Dulbecco's Modified Eagle Medium 4500 mg/L Glucose (DMEM HG, Gibco)

- 10 % Fetales Kälberserum (FCS, Biochrome)
- 2 % Penicillin/Streptomycin (Gibco)
- 1,2 % Fungizone (Fungizide 50 µg/ml, Biochrome)

- Myogene Differenzierung („DM“):

Dulbecco's Modified Eagle Medium 4500 mg/L Glucose (DMEM HG, Gibco)

- 10 % Fetales Kälberserum (FCS, Biochrome)
  - 2 % Penicillin/Streptomycin (Gibco)
  - 1,2 % Fungizone (Fungizide 50 µg/ml, Biochrome)
  - 0,05 % rekombinanter TGF-β1 (R&D-Systems)
  - 0,05 % rekombinanter Platelet-derived growth factor (PDGF-AB, Peprotech)
  - 0,06 % Ascorbinsäure (Sigma-Aldrich)
- Kontrolle der adipogenen u. osteogenen Differenzierung (Mangelmedium „MM“):
- Dulbecco's Modified Eagle Medium 1000 mg/L Glucose, 25 mM Hepes (Gibco)
- 1 % L-Glutamin (Lonza)
  - 0,1 % humanes Blutplasma (FFP, PAA Laboratories)
  - 0,1 % humanes Thrombozytenkonzentrat (TKZ, Zentrum f. Transfusionsmed., Tübingen)
  - 1 % Penicillin/Streptomycin (Gibco)
- Osteogene Differenzierung („OD“):
- Dulbecco's Modified Eagle Medium 4500 mg/L Glucose (DMEM HG, Gibco)
- 10 % Fetales Kälberserum (FCS, Biochrome)
  - 2 % Penicillin/Streptomycin (Gibco)
  - 1,2 % Fungizone (Fungizide 50 µg/ml, Biochrome)
  - 0,1 µM β-Dexamethason (Sigma-Aldrich) [antiproliferativ]
  - 10 mM β-Glycerophosphat (Sigma-Aldrich) [Phosphatquelle]
  - 0,17 mM L-Ascorbinsäure (Sigma-Aldrich)
- Adipogene Differenzierung („AD“):
- Dulbecco's Modified Eagle Medium 4500 mg/L Glucose (DMEM HG, Gibco)
- 10 % Fetales Kälberserum (FCS, Biochrome)
  - 2 % Penicillin/Streptomycin (Gibco)
  - 1,2 % Fungizone (Fungizide 50 µg/ml, Biochrome)
  - 1 µM β-Dexamethason (Sigma-Aldrich) [antiproliferativ]
  - 0,01 mg/ml Insulin (human, Sigma-Aldrich) [Adipogenese-stimulierend]
  - 0,1 mM Indomethacin (Calbiochem)
  - 0,5 mM 3- Isobutyl-1-methylxanthin (AppliChem)

## **2.2 Mikroskopie**

### **2.2.1 Lichtmikroskopie**

Im Rahmen der Kultivierung und Differenzierung der aus humanem Biopsiematerial gewonnenen Zellen wurden Zellmorphologie, -adhärenz und -vitalität regelmäßig lichtmikroskopisch untersucht (s. 2.1.3, 2.1.4, 2.1.5).

### **2.2.2 Histochemie**

Um die Differenzierung der aus humanem Biopsiematerial (Fettgewebe) gewonnenen Zellen zu überprüfen wurden u.a. folgende histochemische Untersuchungen durchgeführt.

#### **2.2.2.1 Von Kossa Färbung**

Vier Wochen nach Beginn des Differenzierungsversuchs (s. 2.1.5) wird an den in osteogenem Differenzierungsmedium (OD) kultivierten Zellen in der 6 well-Platte (CELLSTAR®, Greiner bio-one) die Von Kossa Färbung durchgeführt. Parallel wird die Färbung auch an in Mangelmedium (MM) kultivierten Zellen, die aus demselben Gewebe isoliert wurden, durchgeführt.

Hierzu wird zunächst das Differenzierungsmedium abgesaugt und verworfen. Dann wird -20° C kaltes Methanol (Merck) für fünf Minuten auf die Zellen gegeben um eine Fixation der Zellen zu erreichen. Nun erfolgt durch Aufbringen von Aqua dest., Schwenken der Platte und anschließendes Entfernen des Aqua dest. eine Reinigung der Zellen. Dieser Reinigungsschritt wird noch einmal wiederholt. Danach wird 5 % Silbernitratlösung (Carl Roth GmbH & Co. KG) in Aqua dest. auf die Zellen gegeben und diese so für 60 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach der 60-minütigen Inkubation erfolgt erneut zweimal der oben beschriebene Reinigungsschritt mit Aqua dest. Nun wird für zwei Minuten eine Natriumcarbonat-Lösung (5 g Natriumcarbonat, 25 ml Formalin 36 %, 75 ml Aqua dest.) auf die Zellen gegeben und anschließend erneut zweimalig, wie oben beschrieben, mit Aqua dest. gereinigt. Zuletzt erfolgt eine zweiminütige Inkubation der Zellen mit einer Natriumthiosulfatlösung (5g Natriumthiosulfat in 100ml Aqua dest.)

und die abschließende Reinigung der Zellen durch zweimalige Durchführung des oben beschriebenen Reinigungsschrittes mit Aqua dest.

### **2.2.2.2 Oil Red O Färbung**

Vier Wochen nach Beginn des Differenzierungsversuchs (s. 2.1.5) wird an den in adipogenem Differenzierungsmedium (AD) gehaltenen Zellen in der 6 well-Platte (CELLSTAR®, Greiner bio-one) die Oil Red O Färbung durchgeführt. Parallel wird die Färbung auch an in Mangelmedium (MM) gehaltenen Zellen, die aus demselben Gewebe isoliert wurden, durchgeführt.

Hierzu wird zunächst das adipogene Differenzierungsmedium (AD) bzw. Mangelmedium (MM) abgesaugt und verworfen. Dann wird Oil Red O Färbelösung (0,5% Oil Red O, in Isopropanol (Merck) gelöst, 3:5 verdünnt mit ddH<sub>2</sub>O) auf die Zellen gegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgt durch Aufbringen von PBS (Dulbecco's Phosphat buffered saline, Lonza), Schwenken der Platte und Entfernen des PBS eine Reinigung der Zellen. Dieser Reinigungsschritt wird noch zweimal wiederholt, wobei im letzten Schritt das PBS auf der 6 well-Platte verbleibt.

## **2.3 Durchflusszytometrie**

Um zu verifizieren, dass es sich bei den aus humanem Biopsiematerial (Knochenmark und Fettgewebe), gemäß dem unter 2.1.2 beschriebenen Vorgehen, isolierten Zellen um mesenchymale Stromazellen (MSC) handelt, wurde in der vorliegenden Arbeit u.a. eine Analyse der von den Zellen exprimierten Oberflächenantigene aus der Familie der Cluster of differentiation (CD) per Durchflusszytometrie durchgeführt.

Um die von den Zellen exprimierten Oberflächenantigene in der Durchflusszytometrie messbar zu machen werden diese an entsprechende Antikörper gekoppelt, welche mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind.

Hierzu werden die zu untersuchenden Zellen zunächst mit PBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline, Lonza) gewaschen. Dabei wird das Medium, in dem die Zellen kultiviert

waren, abgesaugt, 10 ml PBS in die Zellkulturflasche gegeben, diese geschwenkt und das PBS ebenfalls abgesaugt. Durch Zugabe von 3 ml Accutase® (PAA Laboratories) mit anschließender Inkubation für 3-9 min. bei 37°C (CO<sub>2</sub> Inkubator Serie CB, Binder) wird eine für die durchflusszytometrische Untersuchung der Zellen nötige besonders schonende Ablösung der Zellen erreicht. Unter dem Lichtmikroskop wird kontrolliert ob die Ablösung der Zellen von der Zellkulturflasche wie gewünscht erfolgt ist; dies ist daran zu erkennen, dass die Zellen eine sphärische Form annehmen und sich frei in der Flüssigkeit (Accutase®) bewegen. Durch Zugabe von 3 ml GMP+ Mediums wird Accutase® inaktiviert. Die nun die Zellen enthaltende Lösung aus Accutase® und GMP+ Medium wird nun in ein Zentrifugationsröhrchen überführt und bei 1500 rpm für 7 min. zentrifugiert. Dabei bildet sich ein Zellpellet am Boden des Zentrifugationsröhrchens sowie ein Überstand. Der Überstand wird abgesaugt. Das Zellpellet wird in 12 ml einer „PFEA“-Pufferlösung (500 ml PBS, 2% FCS, 0.2 % Natrium-Azid-Stammlösung, 372 mg EDTA) resuspendiert. Jeweils 1,5 ml dieser die Zellen enthaltenden Lösung werden nun in Zentrifugationsröhrchen gegeben und bei 300 g (= 0,3 rcf) für 4 min. zentrifugiert. Dabei bildet sich ein Zellpellet am Boden des Zentrifugationsröhrchens sowie ein Überstand. Durch Dekantieren wird der Überstand aus den Zentrifugationsröhrchen entfernt. Auf die Zellpellets werden nun jeweils 50 µl Gamunex® (Talecris Biotherapeutics), welches humane IgG-Antikörper enthält, gegeben. Mithilfe eines Vortexmischers wird eine gleichmäßige Verteilung der Zellen in Gamunex® erreicht. Es folgt eine 20-minütige Inkubation, lichtgeschützt, bei 4°C. Durch die Reaktion der Zellen mit Gamunex® werden spätere unspezifische Antikörperbindungen verhindert. Nach Ablauf der Inkubation wird jew. 1 ml der o.g. Pufferlösung in das Zentrifugationsröhrchen gegeben, erneut mithilfe des Vortex-Gerätes durchmischt und bei 300g (= 0,3 rcf) für 4 min. zentrifugiert. Dabei bildet sich ein Zellpellet am Boden des Zentrifugationsröhrchens sowie ein Überstand. Durch Dekantieren wird der Überstand aus den Zentrifugationsröhrchen entfernt.

Es folgt nun die Kopplung der Zellen an die mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Antikörper. Hierzu wird ein jedes Zellpellet mit 50 µl einer entsprechenden Antikörperlösung versetzt. Die Zusammensetzung der entsprechenden Lösungen ist Tabelle 2 zu entnehmen.

<b>Antikörper</b>	<b>Fluoreszenzfarbstoff</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verdünnungsverhältnis Antikörper : „PFEA“-Pufferlösung</b>
Kontrolle = „PFEA“- Pufferlösung (s.o.)			---
<b>Mouse Anti- Human CD 73 IgG1</b>	PE	BD Bioscience	3 : 5,0
<b>Mouse Anti- Human CD 90 IgG2A</b>	PE	R+D Systems	3 : 12,5
<b>Mouse Anti- Human CD 105 IgG1</b>	FITC	Bio-Rad / AbD serotec	3 : 12,5
<b>Mouse Anti- Human CD 14 IgG2A</b>	FITC	BD Biosciences	3 : 12,5
<b>Mouse Anti- Human CD 34 IgG1</b>	PE	Biolegend	1,5 : 14
<b>Mouse Anti- Human CD 45 IgG1</b>	PE	Biolegend	3 : 12,5
<b>Mouse Anti- Human CD 146 IgG1</b>	PE	R+D Systems	3 : 12,5
<b>Anti-HLA- ABC</b>	FITC		1 : 20
<b>Anti-HLA-DR</b>	PE		1 : 20

**Tabelle 2: Übersicht der Antikörper, die zur durchflusszytometrischen Untersuchung der von den aus humanem Bopsiematerial isolierten Zellen exprimierten Antigene eingesetzt wurden**

Mithilfe eines Vortexmischers wird eine gleichmäßige Verteilung der Zellen in der Antikörperlösung erreicht. Es folgt eine 20-minütige Inkubation, lichtgeschützt, bei 4°C. Nach Ablauf der Inkubation wird jeweils 1 ml der o.g. Pufferlösung in das Zentrifugationsröhrchen gegeben, erneut mithilfe des Vortex-Gerätes durchmischt und bei 300g (= 0,3 rcf) für 4 min. zentrifugiert. Dabei bildet sich ein Zellpellet am Boden des Zentrifugationsröhrchens sowie ein Überstand. Durch Dekantieren wird der Überstand aus den Zentrifugationsröhrchen entfernt.

Abschließend wird ein jedes Zellpellet mithilfe des Vortexmischers in 300 µl der o.g. Pufferlösung resuspendiert. Bis zur Verwendung erfolgt die Lagerung bei 4°C lichtgeschützt in speziellen für die durchflusszytometrische Untersuchung geeigneten Gefäßen.

Die Messung am Durchflusszytometer (LSR II, BD Biosciences) wird möglichst ohne große Verzögerung durchgeführt. Die Auswertung der optischen Signale und Darstellung als Dot-Plot erfolgt mithilfe der Software FACS DIVA (BD Biosciences). Anhand des Kontrollansatzes werden die Messparameter eingestellt und ein Analysefenster konfiguriert, durch unspezifische Bindungen vorhandene falsch-positive Zellen werden herausgefiltert.

Die weitere Auswertung der Daten wurde mithilfe der FlowJo – Single Cell Analysis Software durchgeführt.

## **2.4 qRT-PCR**

Um zu überprüfen ob die Kultur in den in dieser Arbeit eingesetzten Differenzierungsmedien (s. 2.1.5) eine erfolgreiche Differenzierung der aus humanem Biopsiematerial (Fettgewebe) gewonnenen definierten Zellen induziert, wurden diese per qRT-PCR auf die Expression entsprechender Markergene untersucht. Die Untersuchung erfolgte jeweils an Tag 0 sowie an Tag 14 der adipogenen bzw. myogenen Differenzierung. Die Untersuchung der osteogenen Differenzierung erfolgte an Tag 0 sowie an Tag 7, da davon ausgegangen wurde, dass sich bei fortschreitender osteogener

Differenzierung die für die Untersuchung benötigte RNA nicht mehr ausreichend isolieren lässt.

Zunächst muss die RNA-Extraktion erfolgen, hierzu wurde das RNeasy® Mini Kit (Qiagen GmbH) genutzt.

Zu Beginn werden die zu untersuchenden Zellen mit PBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline, Lonza) gewaschen. Dabei wird das Medium, in dem die Zellen kultiviert waren, abgesaugt, 10 ml PBS in die Zellkulturflasche gegeben, diese geschwenkt und das PBS ebenfalls abgesaugt. Um die Zellen vom Kunststoff der Zellkulturflasche zu lösen, werden 3 ml Trypsin (Sigma-Aldrich) in die Zellkulturflasche gegeben, diese geschwenkt und für etwa 2 min. bei 37° Celsius / 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Durch Klopfen gegen die Zellkulturflasche kann die Ablösung der Zellen unterstützt werden. Unter dem Lichtmikroskop wird kontrolliert, ob die Ablösung erfolgreich erfolgt ist. Dies ist daran zu erkennen, dass die Zellen eine sphärische Form annehmen und sich frei in der Flüssigkeit des Trypsins bewegen. Durch Zugabe von 3 ml GMP+ Mediums wird das Trypsin inaktiviert. Die Zellsuspension wird nun in ein Zentrifugationsröhrchen überführt. Es folgt eine Zentrifugation bei 1500 rpm für 7 min. Während dieser bildet sich ein Zellpellet am Boden des Zentrifugationsröhrchens sowie ein Überstand. Der Überstand wird abgesaugt. Das Zellpellet wird in 10 ml PBS resuspendiert und erneut bei 1500 rpm für 7 min. zentrifugiert. Der Überstand wird erneut abgesaugt. Nun wird das Zellpellet in 350 µl RLT-Puffer (Qiagen), welcher Mercaptoethanol enthält, resuspendiert. In dieser Form kann die Probe bei -80°C gelagert werden oder direkt wie folgt verarbeitet werden: Als nächstes wird 350 µl Ethanol 70 % (Merck) zur Probe gegeben. Durch mehrmaliges Aufziehen mithilfe einer Spritze werden eine Homogenisierung sowie ein Aufplatzen der Zellen erreicht. Die Suspension wird auf eine Säule (RNeasy Mini spin column) gegeben und so bei 10.000 rpm für 15 sec. zentrifugiert (Eppendorf). Der Durchfluss wird verworfen. Nun werden 350 µl RW1-Waschpuffer auf die Säule gegeben, es wird erneut bei 10.000 rpm für 15 sec. zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Anschließend werden 80 µl DNase-Gemisch, bestehend aus 10 µl DNase (Qiagen, Pulver gelöst in H<sub>2</sub>O) und 70 µl RDD Puffer (Qiagen), auf die Säule gegeben. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur werden erneut 350 µl des RW1-Waschpuffers hinzugegeben und bei 10.000 rpm für 15 sec. zentrifugiert. Die

Säule wird nun in ein neues Zentrifugationsröhrchen überführt, das zuvor benutzte Zentrifugationsröhrchen mitsamt Durchfluss wird verworfen. Auf die Säule werden nun 500 µl RPE-Puffer gegeben, woraufhin erneut bei 10.000 rpm für 15 sec. zentrifugiert wird, der Durchfluss wird verworfen. Es folgt dann ein erneutes Hinzufügen von 500 µl RPE-Puffer und eine Zentrifugation bei 10.000 rpm, jetzt für 2 min.; der Durchfluss wird verworfen, dann wird nochmals für 15 sec. bei 10.000 rpm zentrifugiert. Die Säule wird erneut in ein neues Zentrifugationsröhrchen überführt. Abschließend werden 40 µl RNase-freies H<sub>2</sub>O auf die Säule gegeben und so für 1 min. bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend bei 10.000 rpm für 1 min. zentrifugiert. Der Durchfluss enthält nun die extrahierte RNA, die Lagerung erfolgt im Zentrifugationsröhrchen bei -80°C.

Nun kann aus der extrahierten RNA die für die PCR benötigte komplementäre DNA (cDNA) generiert werden. Hierbei muss streng darauf geachtet werden, die Proben stets gekühlt zu halten, weshalb auf Eis zu arbeiten ist.

In Zentrifugationsröhrchen werden zunächst 12,5 µl RNase-freies Wasser (depc, Qiagen) vorgelegt.

Um die für die cDNA-Synthese benötigte Menge an RNA zu bestimmen, muss die RNA-Konzentration der einzelnen Proben gemessen werden. Hierzu wird die RNA-Probe im Verhältnis von 1:50 mit destilliertem Wasser versetzt und in eine Quartzküvette (Starna Cells) überführt. Die Konzentration wird dann anhand des Absorptionsgrades in einem Spektrophotometer (Amersham Pharmacia Biotech) bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Als Referenzwert dient eine Probe, die nur destilliertes Wasser, jedoch keine RNA enthält. Eine optische Dichte von 1 entspricht einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Nun lässt sich für eine jede Probe berechnen welches Volumen 1 µg RNA enthält.

Ein entsprechendes Volumen wird den 12,5 µl RNase-freien Wassers entnommen und durch dasselbe Volumen an RNA-Probe ersetzt, sodass nun exakt 1 µg RNA enthalten in 12,5 µl vorliegt. Mithilfe eines Vortexmischers wird eine Homogenisierung erreicht. Anschließendes kurzes Zentrifugieren soll verhindern, dass sich Anteile der Probe am Deckel des Zentrifugationsröhrchens sammeln und beim Öffnen verloren gehen.

Zur Generierung der cDNA wird das Advantage® RT-for-PCR-Kit (Clontech, Mountain View, CA) verwendet. Es wird 1 µl oligo dt Primer hinzugefügt, erneut mithilfe des Vortexmischers homogenisiert und anschließend kurz zentrifugiert. Es folgt eine 2-minütige Inkubation bei 65°C (Biometra, Uno II Thermocycler). Daraufhin wird die Probe wieder auf Eis gelagert. Nun werden 4 µl 5xBuffer, 1 µl dNTP-Mix, 1 µl reverse Transkriptase und 0,5 µl RNase-Inhibitor hinzugefügt. Es folgt eine Inkubation im Thermocycler, zunächst 60min. bei 42 °C und daraufhin 5min. bei 95 °C (Inaktivierung der Reaktion). Abschließend wird die Probe im Thermocycler auf 4 °C heruntergekühlt. Die Probe enthält nun cDNA. Abschließend werden, erneut die Probe auf Eis lagernd, 80 µl RNase-freies Wasser hinzugefügt. Die Lagerung erfolgt bei -20°C.

Zu untersuchen sind pro einzeltem isolierten humanem Biopsiematerial folgende Proben:

<b>Expansions- medium</b>	<b>Tag der Differenzierung</b>	<b>Differenzierungs- medium</b>
<b>S+</b>	<b>0</b>	-
	<b>14</b>	<b>MM</b>
		<b>AD</b>
		<b>OD</b>
		<b>CM</b>
		<b>DM</b>
<b>S-</b>	<b>0</b>	-
	<b>14</b>	<b>MM</b>
		<b>AD</b>
		<b>OD</b>
		<b>CM</b>
		<b>DM</b>
<b>P+</b>	<b>0</b>	-
	<b>14</b>	<b>MM</b>
		<b>AD</b>
		<b>OD</b>
		<b>CM</b>
		<b>DM</b>

**Tabelle 3: Übersicht über die verschiedenen Proben, die sich durch Expansion und Differenzierung pro einzeltem isoliertem Zellmaterial ergeben. MM: Mangelmedium, Kontrollmedium für AD und OD. AD: adipogenes Differenzierungsmedium. OD: osteogenes Differenzierungsmedium. CM: Kontrollmedium für Myogenese. DM: Differenzierungsmedium für glattmuskuläre Myogenese.**

Die Untersuchung einer jeden Probe erfolgt auf Expression folgender Markergene bzw. es wurden die folgenden Primer genutzt:

- Myogene Markergene:
  - Myosin heavy chain 11 (Myh11, Qiagen)
  - Transgelin (Qiagen)
- Adipogene Markergene:
  - Peroxisome proliferation-activated receptor  $\gamma$  2 (PPAR $\gamma$  2, MWG Biotech)
- Osteogene Markergene:
  - Runx2 (Runt-related transcription factor 2)
  - Osteopontin (MWG, Biotech)

Um Referenzwerte zu erhalten wird zudem die Expression der sogenannten „Housekeeping-Genes“ Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH, Biomol) und Peptidylprolyl-isomerase A (PPIA, Biomol) einer jeden Probe quantifiziert.

Als Positivkontrolle und Vergleichswert wird auf jeder Platte „Smooth muscle cells“ (HcaSMC, Provitro) mitgeführt. Hier wird die Expression von Transgelin gemessen.

Als Negativkontrolle dient stets die Untersuchung der Expression von Calponin in 2  $\mu$ l H<sub>2</sub>O.

Für die quantitative rt-PCR wird das LightCycler® 480 SYBR Green I Master Kit genutzt. Der Ansatz einer jeden zu messenden Probe wird wie folgt zusammengefügt: 2  $\mu$ l cDNA, 10  $\mu$ l SYBR Green, 6  $\mu$ l DEPC-water sowie 2  $\mu$ l des entsprechenden Primers. Die hierfür genutzte 96-well Platte wird anschließend mit einem Klebefilm bedeckt und 1 min. bei 1000 rpm zentrifugiert.

Die quantitative rt-PCR erfolgt im LightCycler® 480 II, Roche Diagnostics.

Die optimale „Efficiency“ eines jeden Primers wird berücksichtigt durch Verwendung der individuellen Schmelztemperatur („Melting Temperature“) von entweder 60° oder 62°. Dabei wird sich an den Werten orientiert, die durch andere Studenten dieser Arbeitsgruppe bereits im Vorfeld erhoben worden waren.

Der Analyseprozess wird anhand der Schmelzkurve überwacht.

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt mit der LightCycler® 480 II Software 1.5.0, Advanced Relative Quantification.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Analyse typischer Merkmalskriterien von definiertem humanem Biopsiematerial**

Um zu verifizieren, dass es sich bei den aus humanem Biopsiematerial (Fettgewebe), gemäß dem unter 2.1.2 beschriebenen Vorgehen isolierten Zellen um mesenchymale Stromazellen (MSC) handelt, wurden folgende Kriterien, die von der „International Society for Cellular Therapies“, der Internationalen Gesellschaft für Zellbasierte Therapien, 2006 definiert wurden (Dominici et al., 2006), überprüft.

- 1) MSC sind unter Standardkulturbedingungen an Kunststoff adhärent und proliferieren mit einer den Fibroblasten ähnlichen Morphologie.
- 2) MSC haben das Potential sich in vitro in Adipozyten, Osteozyten und Chondrozyten zu differenzieren.
- 3) MSC exprimieren die Oberflächenantigene CD73, CD90 und CD105.
- 4) MSC exprimieren folgende Oberflächenantigene nicht: CD14 o. CD11b, CD34, CD45, CD19 o. CD79 $\alpha$  und HLA-DR.

Für MSC aus Fettgewebe wurde jedoch eine Expression von CD34 beobachtet (Lin et al., 2012, Mitchell et al., 2006).

In der Literatur beschrieben ist zudem, dass aus Fettgewebe isolierte MSC eine Expression von CD146 aufweisen (Gronthos et al., 2001). Die im Rahmen dieser Arbeit aus Fettgewebe isolierten Zellen wurden folglich auf eine Expression von CD146 hin untersucht.

Darüber hinaus wurde als weiteres MSC-Charakteristikum eine Fibroblasten-ähnliche Morphologie herangezogen (Denu et al., 2016).

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über o.g. MSC-Charakteristika.

	<b>Untersuchte Zelleigenschaften:</b>	<b>MSC-Charakteristika:</b>
<b>1</b>	Kunststoffadhärenz	Ja, bei Standardkulturbedingungen
<b>2</b>	Differenzierungspotential	Osteogenese Adipogenese Chondrogenese
<b>3</b>	Exprimierte Oberflächenantigene	CD 73 CD 90 CD 105 CD146
<b>4</b>	Fehlen von Oberflächenantigenen	CD 14 o. CD 11b CD 19 o. CD79 $\alpha$ CD 34* CD 45 HLA-DR
<b>5</b>	Morphologie	Fibroblasten-ähnlich

**Tabelle 4: Übersicht über MSC-Charakteristika. Mit \* markierte Kriterien können bei MSC aus Fettgewebe abweichen.**

Im Folgenden wurden die aus definiertem humanem Biopsiematerial (Fettgewebe) gewonnenen Zellen gemäß der o.g. Kriterien auf MSC-Charakteristika überprüft.

### **3.1.1 Identifizierung von Bindungseigenschaften an Kunststoff (Kunststoff-Adhärenz)**

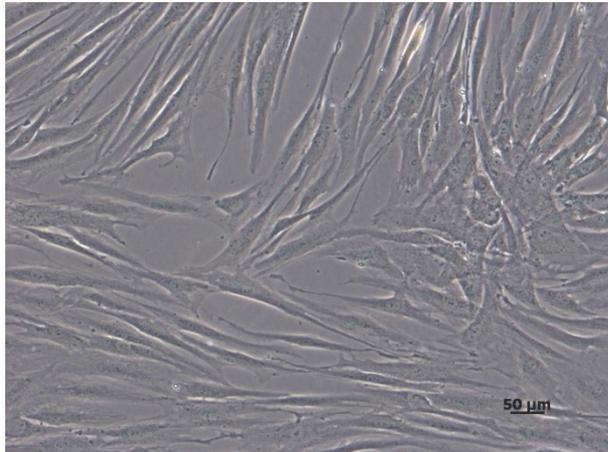
Die Internationale Gesellschaft für Zellbasierte Therapien legt die Adhärenz an Kunststoff als eine der charakteristischen Eigenschaften von MSC fest (Dominici et al., 2006).

Es wurden die adhärenenten Eigenschaften aller eingesetzten Biopsiematerialproben (s. 2.1.2, n=9) geprüft. Dazu wurde das Biopsiematerial, wie unter Material und Methoden

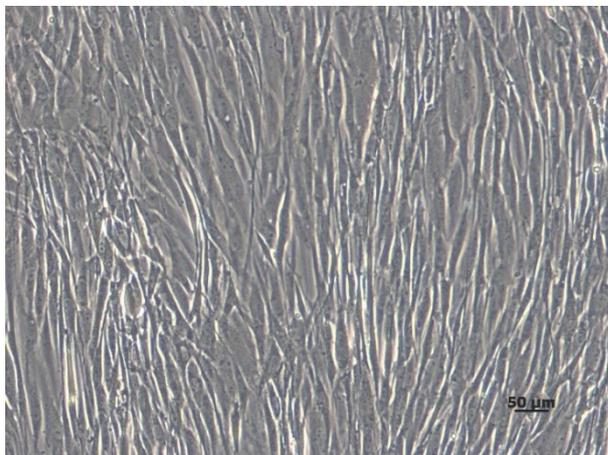
erläutert, aufgearbeitet und die Zellen einer jeden Probe in drei unterschiedlichen definierten Medien (GMP P+, GMP S+, GMP S-, s.2.1.4) ausgesät. Einen Tag nach Aussaat der Zellen sowie im Anschluss alle 3-4 Tage wurde das Expansionsmedium durch frisches ersetzt, wodurch sichergestellt werden konnte, dass alle frei im Expansionsmedium schwimmenden, also nicht-adhären Zellen entfernt wurden. Die Adhäsionsfähigkeit wurde mithilfe einer mikroskopischen Analyse (s. 2.2) der Zellen überprüft. Es zeigte sich, dass in allen 9 Proben, unabhängig von der Variabilität des Biopsiematerials und der Zusammensetzung der verschiedenen Expansionsmedien, Zellen adhären geworden waren. Die Validierung dieser Adhäsionsfähigkeit erfolgte über Passagierung der Zellen (s. 2.1). Es zeigte sich auch noch nach der zweiten Passagierung eine unbeeinträchtigte Adhäsion der Zellen aller eingesetzten Biopsieproben unabhängig vom eingesetzten Expansionsmedium.

Abbildung 2 zeigt exemplarisch die sich in der 1. Passage befindlichen Zellen der Probe F5.

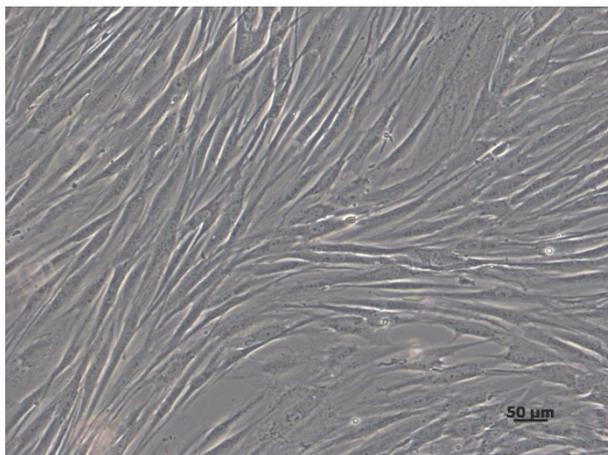
## F5, 1. Passage



GMP S-



GMP S+



GMP P+

**Abbildung 2: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Kunststoff-adhärennten, aus humanem Biopsiematerial (Probe F5) isolierten Zellen in Kultur (1. Passage) in verschiedenen Expansionsmedien**

**Zusammenfassend** lässt sich festhalten, dass unabhängig von der anzunehmenden Variabilität des Probandenbiopsiematerials und unabhängig von den verschiedenen Expansionsmedien (GMP P+, GMP S+, GMP S-, s. 2.1.4) eine Adhäsion der Zellen erfolgte. Wir können aufgrund dessen in allen Biopsiematerialien von einem ersten erfüllten MSC-Kriterium ausgehen.

### **3.1.2 Identifizierung charakteristischer Differenzierungspotentiale**

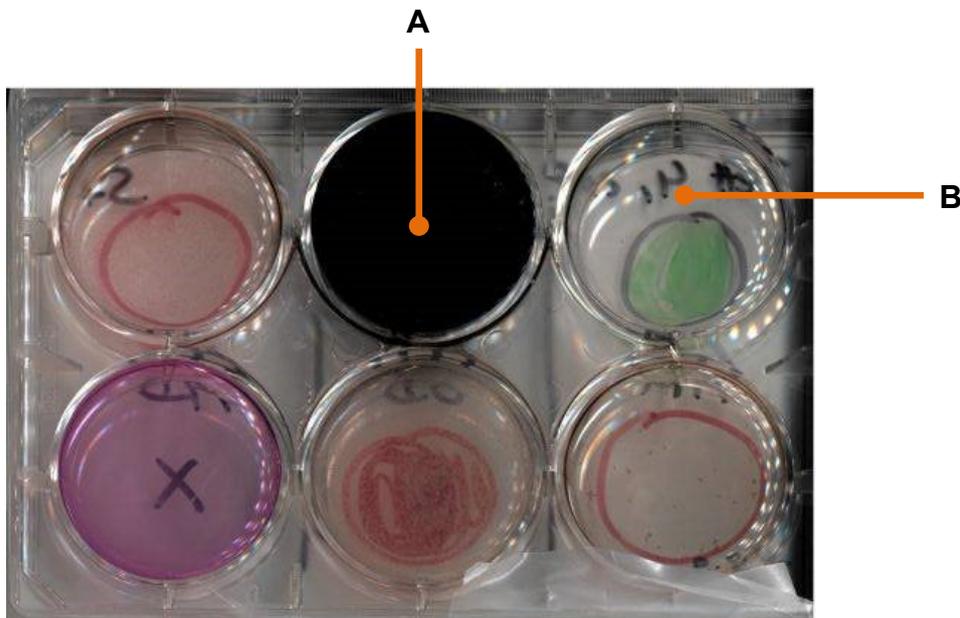
MSC sind multipotent, d.h. sie haben das Potential sich in Zellen des Mesoderms wie z.B. Adipozyten, Fibroblasten, Myozyten, Osteozyten und Chondroblasten zu differenzieren.

Die Differenzierungsfähigkeit der aus humanem Biopsiematerial (Fettgewebe) gewonnenen Zellen wurde per Histochemie (s. 2.2.2, n=3) und q-RT-PCR (s. 2.4, n=5) untersucht. Dazu wurden die o.g. Zellen wie in Material und Methoden beschrieben jeweils in drei verschiedenen Expansionsmedien (GMP P+, GMP S+, GMP S-) bis in die 2. Passage kultiviert und anschließend, bei Erreichen einer Konfluenz von etwa 80%, jeweils in drei verschiedene Zelltypen (Adipozyten, Myozyten, Osteozyten) differenziert. Die Differenzierung wurde durch Ersetzen des Expansionsmediums (GMP P+, GMP S+, GMP S-) durch ein Differenzierungsmedium eingeleitet. Dabei wurde jeweils eine Probe pro Biopsiematerial und Expansionsmedium in adipogenem, osteogenem und myogenem Differenzierungsmedium (s. 2.1.5) ausgesät. Als Kontrolle der adipogenen und osteogenen Differenzierung diente das „Mangelmedium“, als Kontrolle der myogenen Differenzierung das „Kontrollmedium“, s. 2.1.5.

Um die Differenzierung der aus humanem Biopsiematerial (Fettgewebe) gewonnenen Zellen per Mikroskopie zu überprüfen wurden wie in Material und Methoden beschrieben histochemische Untersuchungen (n=3) durchgeführt. Dazu wurde eine definierte Anzahl der o.g. Zellen bei Umsetzen in die 2. Passage in „6well“-Platten ausgesät. Bei Erreichen einer Konfluenz von etwa 80% wurde die Differenzierung in die adipogene, osteogene und glattmuskuläre Richtung eingeleitet. Parallel wurden Kontrollen (Kontrollmedium bzw. Mangelmedium) auf der Platte mitgeführt. Nach 4-wöchiger Differenzierung erfolgten Von-Kossa-Färbungen und Oil Red O Färbungen. Die Von-Kossa-Färbung färbt

das von Osteoblasten produzierte Hydroxylapatit schwarz. Eine Schwarzfärbung spricht somit für das Vorhandensein einer mineralisierten extrazellulären Matrix und ist ein indirektes Indiz für eine erfolgreiche Osteogenese der Zellen. Bei der Oil Red O Färbung stellen sich Triglyzeride in zuvor fixierten Zellen rot dar. Die Erkennbarkeit zahlreicher roter Vakuolen in den Zellen darf also als Indiz für eine erfolgreiche Adipogenese der Zellen gewertet werden.

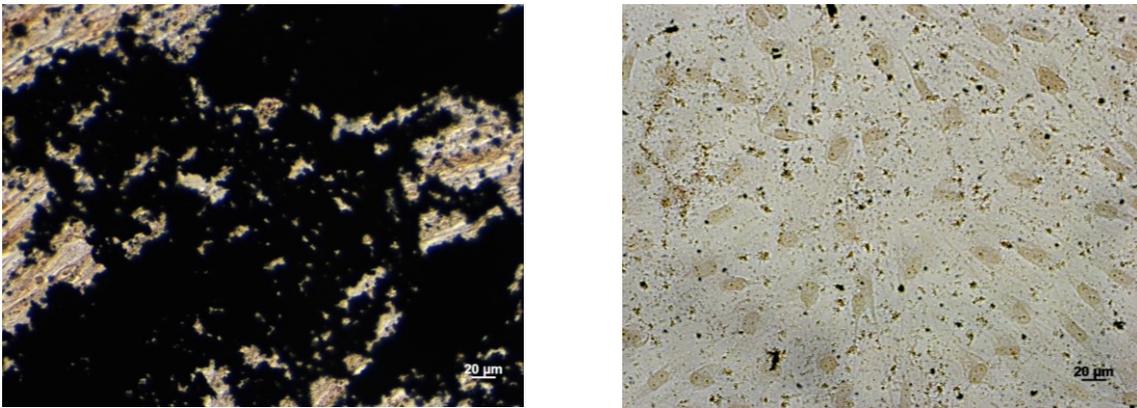
Unabhängig vom Expansionsmedium (GMP P+, GMP S+, GMP S-) war in allen Proben bei Von-Kossa-Färbung der in osteogenem Differenzierungsmedium (OD) kultivierten Zellen eine deutliche Schwarzfärbung zu erkennen, wie in Abbildung 3 und Abbildung 4 exemplarisch dargestellt.



**Abbildung 3: Scan einer 6well-Platte der Probe F4 S+ (Expansionsmedium GMP S+) nach Kultur der Zellen in Differenzierungsmedien und anschließender Oil Red O Färbung und Von Kossa Färbung. A = in osteogenem Differenzierungsmedium kultivierte Zellen lassen nach Von Kossa Färbung eine deutliche Schwarzfärbung erkennen. B = Kontrolle, in Mangelmedium kultivierte Zellen zeigen nach Von Kossa Färbung *keine* Schwarzfärbung.**

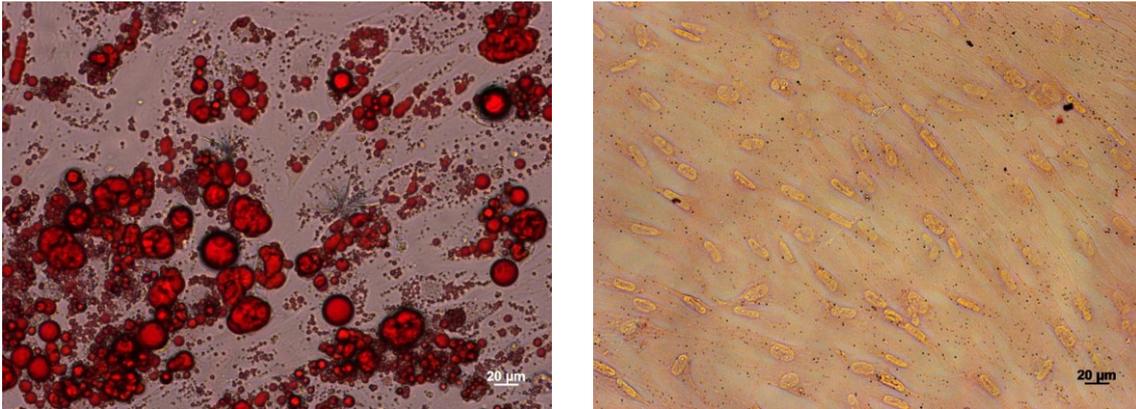
D.h. die aus humanem Biopsiematerial (Fettgewebe) gewonnenen definierten Zellen hatten Hydroxylapatit gebildet, was nahelegt, dass es sich bei den Zellen um Osteoblasten handelt. Bei Von-Kossa-Färbung der Zellen, die mit Mangelmedium (MM) behandelt

worden waren und somit als Kontrolle dienten, war jedoch in keiner der Proben eine Schwarzfärbung zu erkennen, wie in Abbildung 3 und Abbildung 4 exemplarisch dargestellt. Dies lässt darauf schließen, dass das in dieser Arbeit verwendete osteogene Differenzierungsmedium (OD) innerhalb der 28-tägigen Anwendung eine erfolgreiche Osteogenese bei den aus humanem Biopsiematerial (Fettgewebe) gewonnenen definierten Zellen verursacht.



**Abbildung 4: Lichtmikroskopische Aufnahmen, links: Von Kossa Färbung von aus Fettgewebe isolierten Zellen (mutmaßliche MSC) nach Kultur in osteogenem Differenzierungsmedium, rechts: Von Kossa Färbung von aus Fettgewebe isolierten Zellen (mutmaßliche MSC) nach Kultur in Mangelmedium.**

Ebenso war unabhängig vom Expansionsmedium (GMP P+, GMP S+, GMP S-) in allen Proben bei Oil Red O Färbung der in adipogenem Differenzierungsmedium (AD) kultivierten Zellen eine Anhäufung sich rot darstellender Triglyzeride in den Zellen zu erkennen, wie in Abbildung 5 exemplarisch dargestellt. Bei Oil Red O Färbung der Zellen, die mit Mangelmedium (MM) behandelt worden waren, war jedoch in keiner der Proben eine Anhäufung sich rot darstellender Triglyzeride in den Zellen zu erkennen, wie in Abbildung 5 exemplarisch dargestellt. Dies lässt darauf schließen, dass das in dieser Arbeit verwendete adipogene Differenzierungsmedium (AD) innerhalb der 28-tägigen Anwendung eine erfolgreiche Adipogenese bei den aus humanem Biopsiematerial (Fettgewebe) gewonnenen definierten Zellen verursacht.



**Abbildung 5: Lichtmikroskopische Aufnahmen, links: Oil Red O Färbung von aus Fettgewebe isolierten Zellen (mutmaßliche MSC) nach Kultur in adipogenem Differenzierungsmedium, rechts: Oil Red O Färbung von aus Fettgewebe isolierten Zellen (mutmaßliche MSC) nach Kultur in Mangelmedium.**

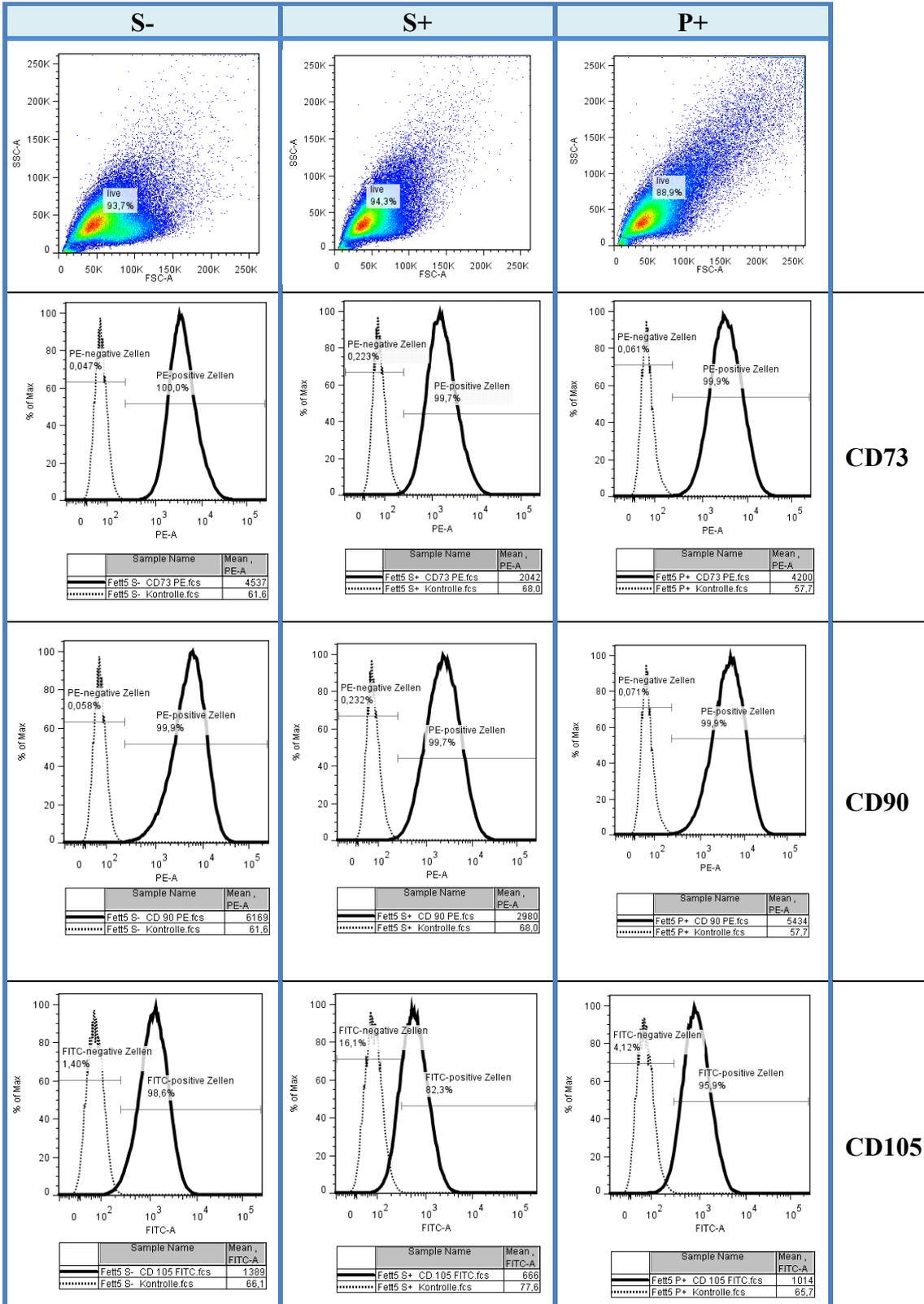
**Zusammenfassend** lässt sich festhalten, dass unabhängig von der anzunehmenden Variabilität des Probandenbiopsiematerials und unabhängig von den verschiedenen Expansionsmedien (GMP P+, GMP S+, GMP S-, s.2.1.4) von einer erfolgreichen Adipogenese sowie Osteogenese der Zellen durch 28-tägige Kultur in den entsprechenden in dieser Arbeit eingesetzten Differenzierungsmedien auszugehen ist. Wir können aufgrund dessen in allen Biopsiematerialien von einem zweiten erfüllten MSC-Kriterium ausgehen.

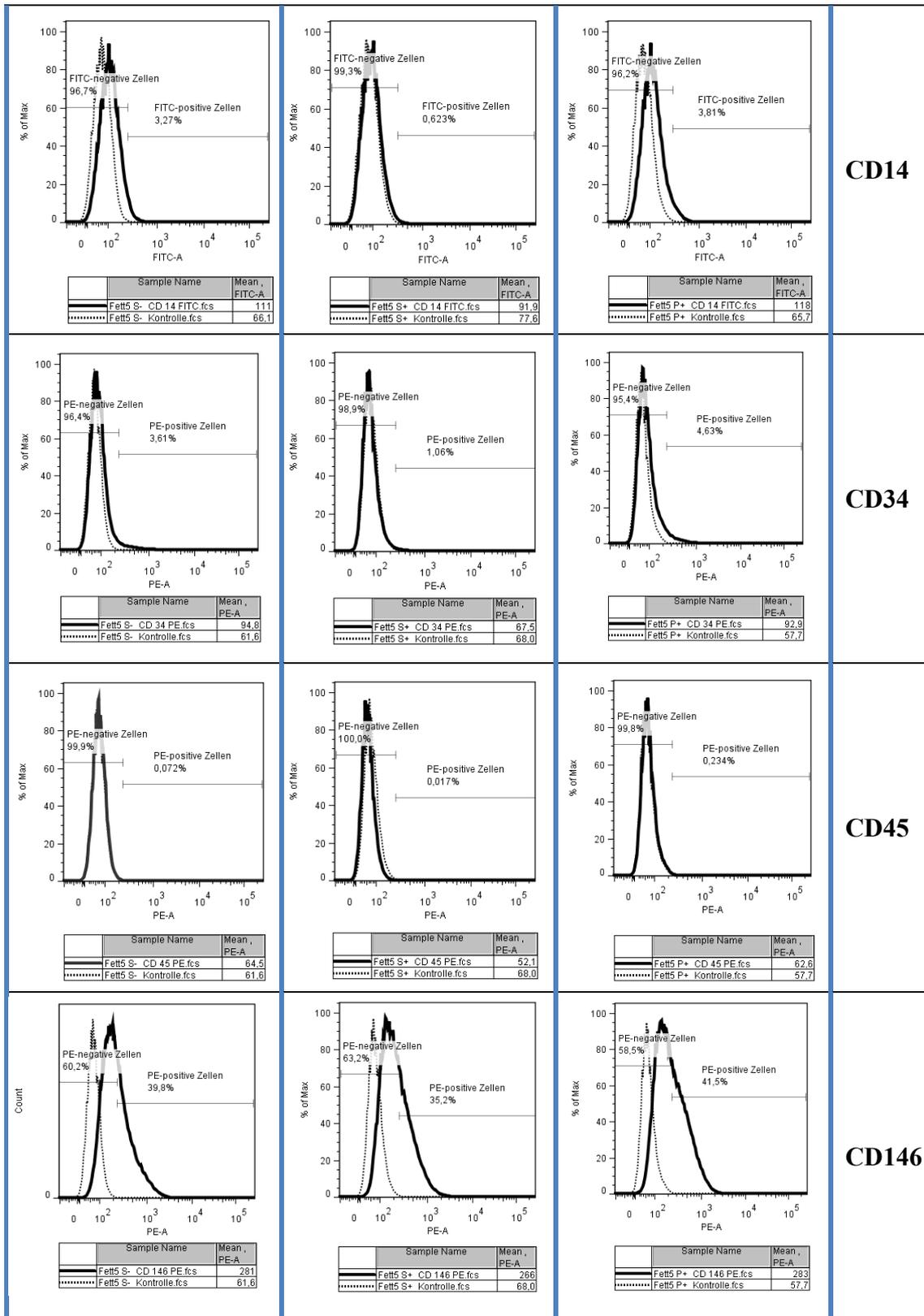
### **3.1.3 Identifizierung charakteristischer Oberflächenantigene**

MSC weisen, wie unter 3.1 beschrieben, ein bestimmtes Muster an Oberflächenantigenen auf: Sie exprimieren u.a. CD73, CD90, CD105 und CD146; während CD14, CD34 und CD45 Marker für hämatopoetische Stammzellen sind und von MSC nicht exprimiert werden. Im Falle Fettgewebe-abgeleiteter MSC wurde jedoch eine Expression von CD34 beobachtet (Lin et al., 2012).

Um das Muster an Oberflächenantigenen der aus humanem Biopsiematerial (Fettgewebe) gewonnenen definierten Zellen zu untersuchen, wurden, wie in Material und Methoden (2.3) beschrieben, durchflusszytometrische Messungen (n=3, Proben F4, F5 und F10) an Zellen der 2. Passage, die jeweils in den drei verschiedenen Expansionsmedien (GMP P+, GMP S+, GMP S-) kultiviert waren, durchgeführt.

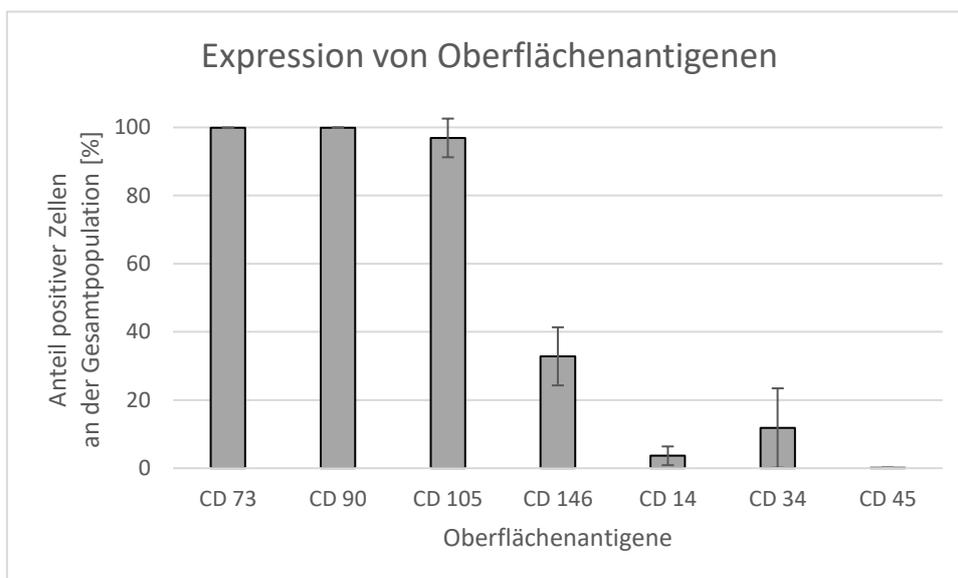
Exemplarisch sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung der Probe F5 in Form von Histogrammen in Abbildung 6 dargestellt.





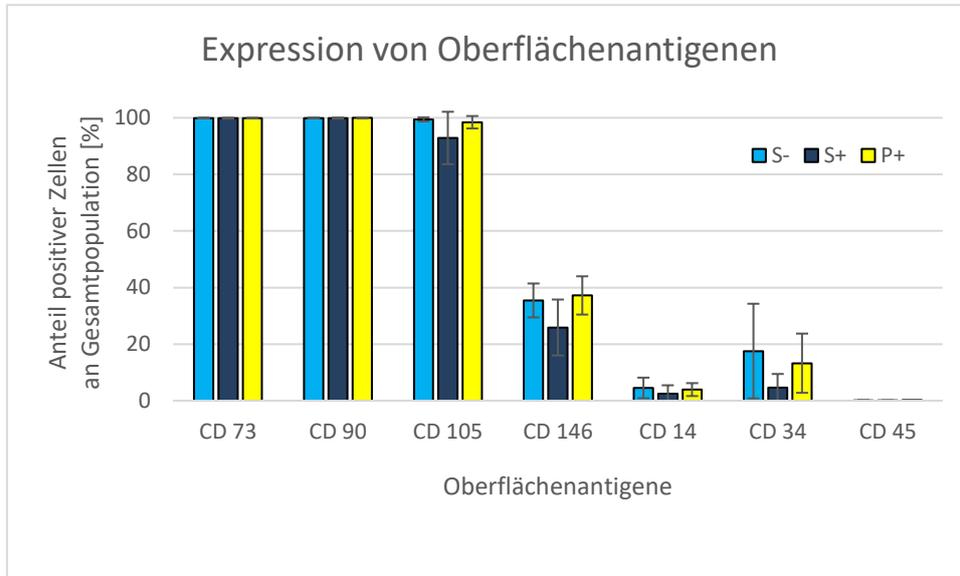
**Abbildung 6: Histogramme der durchflusszytometrischen Untersuchung der Probe F5 auf MSC-typische bzw. -untypische Oberflächenantigene**

Es zeigte sich, dass die Zellen der untersuchten Proben F4, F5 und F10 unabhängig von der Variabilität des Probandenbiopsiematerials und unabhängig vom verwendeten Expansionsmedium (s. Abbildung 8) die für MSC typischen Oberflächenantigene CD73, CD90 und CD105 exprimierten. Ungeachtet der verschiedenen Expansionsmedien exprimierten durchschnittlich 32,83 % der untersuchten Zellen zudem das Oberflächenantigen CD146. Die von MSC typischerweise nicht exprimierten Oberflächenantigene CD14, CD34 und CD45 wurden von den untersuchten Zellen nicht oder nur von einem deutlich geringeren Anteil exprimiert. So wurde, ungeachtet der verschiedenen Expansionsmedien, CD14 von durchschnittlich 3,65 %, CD45 nur von 0,12 % der untersuchten Zellen exprimiert. Die Expression von CD34 war mit durchschnittlich 11,80 %, ungeachtet der verschiedenen Expansionsmedien, häufiger. Abbildung 7 stellt diese Ergebnisse in Form eines Diagrammes dar.



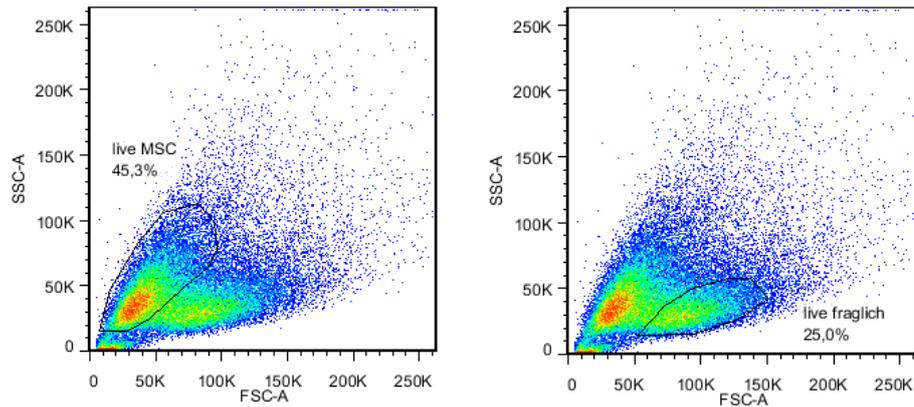
**Abbildung 7: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung der Proben F4, F5 und F10. Expression von Oberflächenantigenen aller untersuchten Zellen (Mittelwerte), ungeachtet der verschiedenen Expansionsmedien**

In Abbildung 8 wird ersichtlich, dass das verwendete Expansionsmedium kaum Einfluss auf die Expression der untersuchten Oberflächenantigene nahm.



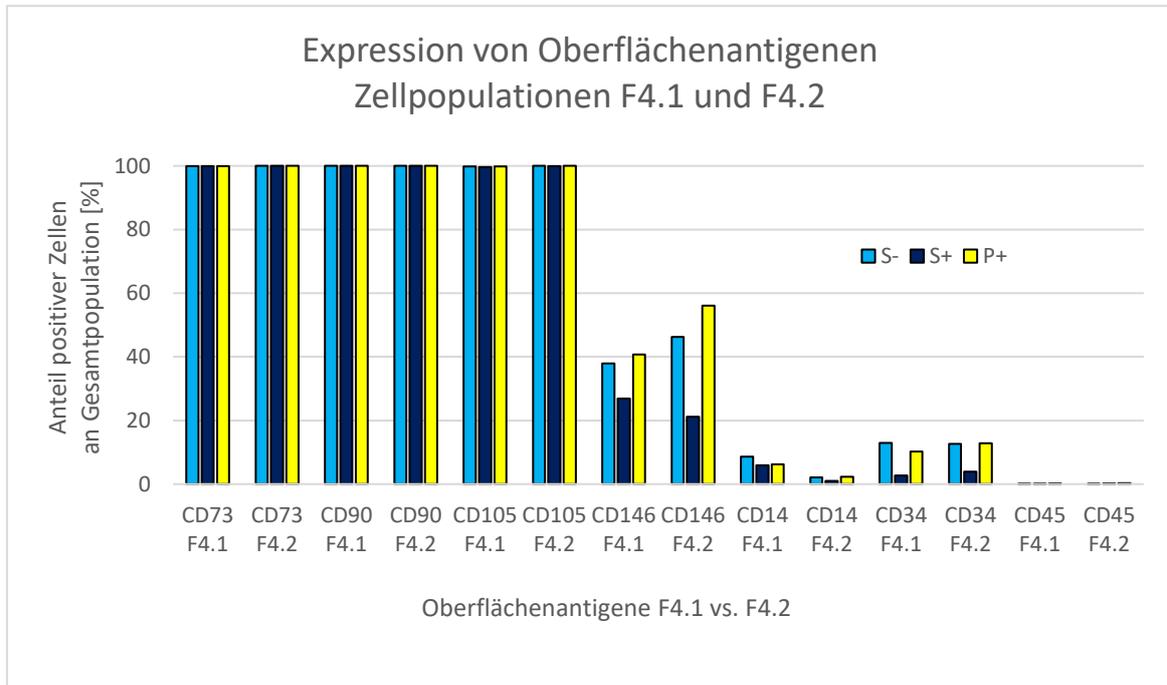
**Abbildung 8:** Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung der Proben F4, F5 und F10. Expression von Oberflächenantigenen aller untersuchten Zellen, unter Berücksichtigung der verschiedenen Expansionsmedien, y-Achse = Anteil der für das entsprechende Antigen positiven Zellen in Prozent der Gesamtpopulation. x-Achse = Oberflächenantigene.

Es zeigte sich außerdem, dass es sich nicht in allen Proben um einheitliche Zellpopulationen handelte. In der durchflusszytometrischen Untersuchung der Probe F4 waren wie in Abbildung 9 zu sehen, zwei Zellpopulationen im SSC-FSC-Blot erkennbar, im Folgenden als F4.1 und F4.2 bezeichnet.



**Abbildung 9: Dot-Plots der sich in der durchflusszytometrischen Untersuchung der Probe F4 darstellenden zwei Zellpopulationen. Links: F4.1, rechts: F4.2.**

Bei getrennter Auswertung der beiden Zellpopulationen zeigte sich, dass bezüglich der Expression der Oberflächenantigene kein wesentlicher Unterschied zwischen Population F4.1 und Population F4.2 bestand. (s. Abbildung 10).



**Abbildung 10: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung der Probe F4. Vergleich der Expression von Oberflächenantigenen zwischen Zellpopulation F4.1 und F4.2 jeweils unter Berücksichtigung der verschiedenen Expansionsmedien. y-Achse = Anteil der für das entsprechende Antigen positiven Zellen in Prozent der Gesamtpopulation. x-Achse = Oberflächenantigene, jeweils links F4.1 und rechts F4.2.**

**Zusammenfassend** lässt sich festhalten, dass die untersuchten Zellen unabhängig von der anzunehmenden Variabilität des Probandenbiopsiematerials und unabhängig von den verschiedenen Expansionsmedien (GMP P+, GMP S+, GMP S-, s.2.1.4) die für MSC typischen Oberflächenantigene CD73, CD90 und CD105 exprimierten. Durchschnittlich 32,83 % der untersuchten Zellen exprimierten zudem CD146. Ein Anteil von 11,80 % der untersuchten Zellen exprimierte CD 34. Geringer war mit 3,65% der Anteil an CD14 exprimierenden Zellen. Eine Expression von CD45 war für die untersuchten Zellen nicht festzustellen (0,12 %).

Teilweise stellten sich die untersuchten Zellen einer Probe in der durchflusszytometrischen Untersuchung als zwei Zellpopulationen dar. Diese unterschieden sich bzgl. ihrer Expression von Oberflächenantigenen jedoch nicht wesentlich voneinander.

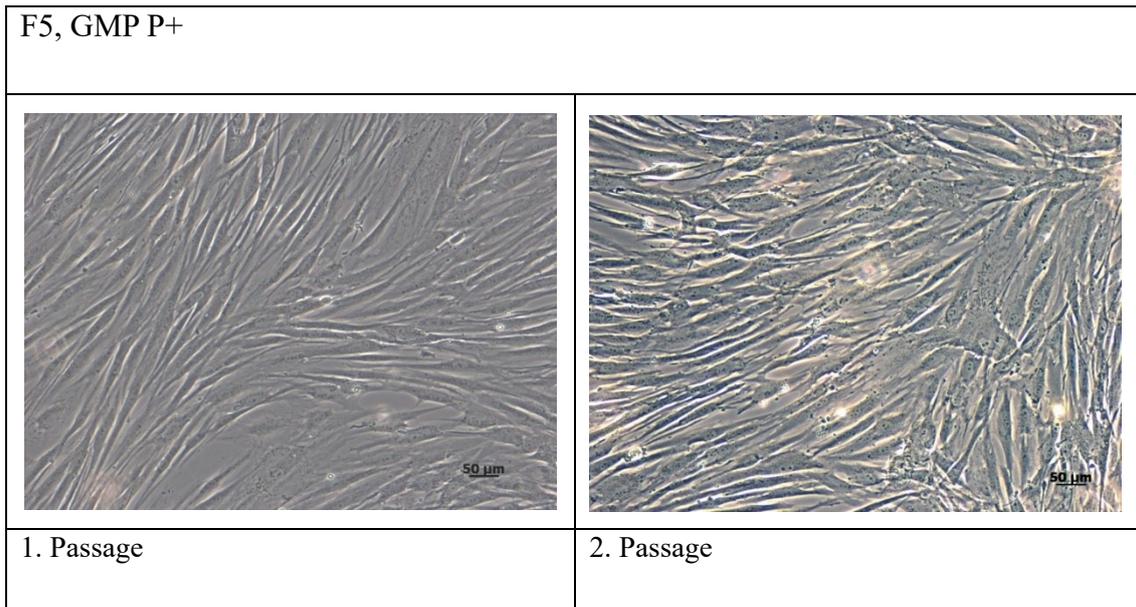
Wir können aufgrund dieser Ergebnisse in allen Biopsiematerialien von einem dritten und vierten erfüllten MSC-Kriterium ausgehen.

### **3.1.4 Identifizierung von charakteristischen Fibroblasten-Merkmalen**

Als ein weiteres charakteristisches Merkmal der MSC gilt eine Fibroblasten-ähnliche Morphologie (Denu et al., 2016).

Die Morphologie der aus definiertem humanem Biopsiematerial (n=9, s. 2.1.2) gewonnenen Zellen wurde regelmäßig lichtmikroskopisch überprüft (s. Material und Methoden).

Es zeigte sich in allen 9 Proben eine Fibroblasten-ähnliche Zellmorphologie über die gesamte Dauer der Expansion (s. Abbildung 11), unabhängig vom verwendeten Expansionsmedium (s. auch 3.1.1, Abb. 2).



**Abbildung 11: Lichtmikroskopische Aufnahmen von aus humanem Biopsiematerial (Probe F5) isolierten Zellen in Kultur (Expansionsmedium GMP P+) in 1. (li.) und 2. (re.) Passage.**

**Zusammenfassend** lässt sich festhalten, dass die im Rahmen dieser Arbeit aus definiertem humanem Biopsiematerial isolierten Zellen unabhängig von der anzunehmenden Variabilität des Probandenbiopsiematerials und unabhängig von den verschiedenen Expansionsmedien (GMP P+, GMP S+, GMP S-, s.2.1.4) einen Fibroblasten-ähnlichen Phänotyp aufwiesen. Aufgrund dessen können wir in allen Biopsiematerialien von einem weiteren erfüllten MSC-Kriterium ausgehen.

### **3.2 Analyse von osteogenen, adipogenen und myogenen Markergenen von definiertem MSC-Biopsiematerial**

Um zu überprüfen ob die 14-tägige bzw. 7-tägige Kultur in den in dieser Arbeit eingesetzten Differenzierungsmedien (s. 2.1.5) eine erfolgreiche Differenzierung der aus humanem Biopsiematerial (Fettgewebe) gewonnenen definierten Zellen induziert, wurden diese an Tag 0 sowie an Tag 14 bzw. Tag 7 der Differenzierung per qRT-PCR auf die Expression entsprechender Markergene untersucht (s. 2.4). Bewertet wurde die

Expression eines entsprechenden Markergens in Bezug auf die Expression der „Housekeeping“-Genes als so genannte „Target/Reference-Ratio“ (s. 2.4).

Zusätzlich wurde untersucht ob das verwendete Expansionsmedium (GMP S-, GMP S+, GMP P+, s. 2.1.4) Einfluss auf die Differenzierungsfähigkeit der Zellen nahm.

### **3.2.1 Analyse des adipogenen Markers PPAR $\gamma$ 2 nach adipogener Differenzierung der ADSC**

Um zu überprüfen ob die 14-tägige Kultur in dem in dieser Arbeit eingesetzten Medium für die Adipogene Differenzierung (s. 2.1.5) eine erfolgreiche Adipogenese der aus humanem Biopsiematerial (Fettgewebe) gewonnenen definierten Zellen induziert, wurde die Expression von PPAR $\gamma$ 2 per qRT-PCR gemessen (n=5).

Eine statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse per ANOVA (Excel®). Hierfür wurde der jeweilige Wert der Target/Reference-Ratio wie in Tabelle 5 ersichtlich angeordnet. Das Signifikanzniveau wurde auf  $\alpha = 0,05$  festgelegt.

	S-	S+	P+
day 0	F5	F5	F5
	F4	F4	F4
	F10	F10	F10
	F11	F11	F11
	F7	F7	F7
day 14	F5	F5	F5
	F4	F4	F4
	F10	F10	F10
	F11	F11	F11
	F7	F7	F7

**Tabelle 5: PPAR $\gamma$ 2: Schema der Anordnung von Rohdaten für die statistische Auswertung per ANOVA (Excel®). F4-11 = versch. Proben (n=5), s. 2.1.2**

	S-	S+	P+
day 0	4,88E-05	9,69E-05	8,12E-05
	3,69E-04	3,40E-04	3,58E-04
	4,02E-04	5,87E-04	2,85E-04
	7,06E-05	5,76E-05	6,47E-05
	2,55E-04	2,01E-04	2,61E-04
day 14	1,31E-02	1,14E-02	3,08E-02
	1,03E-02	8,52E-03	9,04E-03
	1,73E-02	6,22E-03	7,51E-03
	2,67E-02	2,36E-02	2,89E-02
	1,34E-02	9,13E-03	1,14E-02

**Tabelle 6: PPAR $\gamma$ 2: Werte der Target/Reference-Ratio in der Anordnung für die statistische Auswertung per ANOVA (Excel®), Zuordnung zu den einzelnen Proben (n=5) s. Tabelle 5**

ZUSAMMENFASSUNG	S-	S+	P+	Gesamt
<i>day 0</i>				
Anzahl	5	5	5	15
Summe	0,0011454	0,0012825	0,0010499	0,0034778
Mittelwert	0,00022908	0,0002565	0,00020998	0,000231853
Varianz	2,6942E-08	4,6079E-08	1,69579E-08	2,60988E-08
<i>day 14</i>				
Anzahl	5	5	5	15
Summe	0,0808	0,05887	0,08765	0,22732
Mittelwert	0,01616	0,011774	0,01753	0,015154667
Varianz	4,0928E-05	4,71051E-05	0,000128857	6,84263E-05
<i>Gesamt</i>				
Anzahl	10	10	10	
Summe	0,0819454	0,0601525	0,0886999	
Mittelwert	0,00819454	0,00601525	0,00886999	
Varianz	8,8701E-05	5,78041E-05	0,000140606	

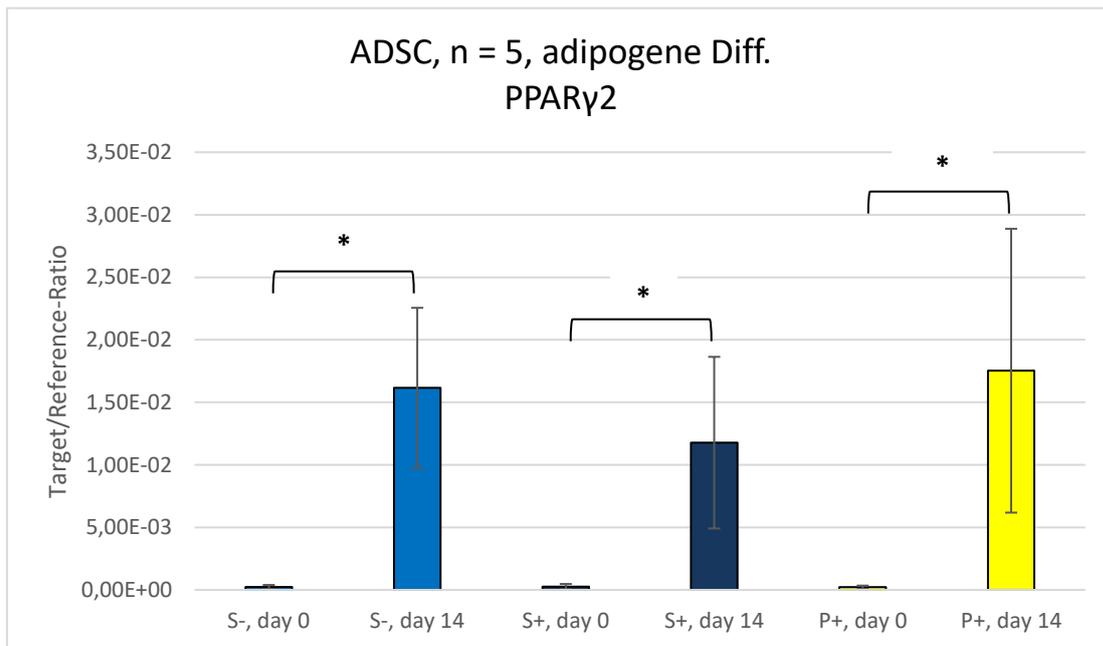
Streuungs- ursache	Quadrat- summen (SS)	Freiheits- grade (df)	Mittlere Quadrat- summe (MS)	Prüfgröße (F)	P-Wert	kritischer F-Wert
Stichprobe	0,00167018	1	0,001670178	46,18431478	<b>4,9834E-07</b>	4,259677273
Spalten	4,4517E-05	2	2,22585E-05	0,615498514	<b>0,54868356</b>	3,402826105
Wechselwirkung	4,5898E-05	2	2,29488E-05	0,634587855	0,53881788	3,402826105
Fehler	0,00086792	24	3,61633E-05			
Gesamt	0,00262851	29				

**Tabelle 7: ANOVA-Analyse der Expression von PPAR $\gamma$ 2 in ADSC (n=5) nach 14-tägiger adipogener Differenzierung**

Mit  $p = 4,9834E-07$  unterschied sich die Expression von PPAR $\gamma$ 2 zwischen Tag 0 und Tag 14 der adipogenen Differenzierung hoch signifikant, was für eine erfolgreiche Adipogenese spricht.

Zwischen den verschiedenen Expansionsmedien (GMP S-, GMP S+, GMP P+) bestand mit  $p \approx 0,55$  kein signifikanter Unterschied.

Die Expression des adipogenen Markergens PPAR $\gamma$ 2 war an Tag 14 der adipogenen Differenzierung also signifikant höher als zu Beginn der Differenzierung an Tag 0. Dabei war es nicht von Bedeutung welches Expansionsmedium (GMP S-, GMP S+ oder GMP P+) verwendet worden war.



**Abbildung 12: Expression von PPAR $\gamma$ 2 (in Bezug auf die Expression von s.g. Housekeeping Genes) an Tag 0 und Tag 14 der adipogenen Differenzierung von ADSC (n=5), \* p < 0,01 (für n=5 ist kein kritischer Wert unterhalb 10 % verfügbar).**

### 3.2.2 Analyse von osteogenen Markern nach osteogener Differenzierung der ADSC

Um zu überprüfen ob die 7-tägige Kultur in dem in dieser Arbeit eingesetzten Medium für die Osteogene Differenzierung (s. 2.1.5) eine erfolgreiche Osteogenese der aus humanem Biopsiematerial (Fettgewebe) gewonnenen definierten Zellen induziert wurde die Expression von Osteopontin und Runx2 per qRT-PCR gemessen (n=3).

Eine statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse per ANOVA (Excel®). Hierfür wurde der jeweilige Wert der Target/Reference-Ratio wie in Tabelle 8 ersichtlich angeordnet. Das Signifikanzniveau wurde auf  $\alpha = 0,05$  festgelegt.

	S-	S+	P+
day 0	F10	F10	F10
	F11	F11	F11
	F7	F7	F7
day 7	F10	F10	F10
	F11	F11	F11
	F7	F7	F7

**Tabelle 8: Osteopontin und Runx2: Schema der Anordnung von Rohdaten für die statistische Auswertung per ANOVA (Excel®). F7-11 = versch. Proben (n=3), s. 2.1.2**

### 3.2.2.1 Osteopontin

	S-	S+	P+
day 0	3,18E-03	6,64E-03	2,86E-03
	2,07E-03	1,45E-03	1,93E-03
	3,04E-03	1,06E-02	6,15E-03
day 7	1,95E-03	1,91E-02	1,04E-03
	9,67E-04	8,68E-04	1,31E-03
	2,03E-03	2,17E-03	1,40E-03

**Tabelle 9: Osteopontin: Werte der Target/Reference-Ratio in der Anordnung für die statistische Auswertung per ANOVA (Excel®), Zuordnung zu den einzelnen Proben (n=3) s. Tabelle 8**

ZUSAMMENFASSUNG	S-	S+	P+	Gesamt
<i>day 0</i>				
Anzahl	3	3	3	9
Summe	0,00829	0,01869	0,01094	0,03792
Mittelwert	0,002763333	0,00623	0,003646667	0,004213333
Varianz	3,65433E-07	2,10567E-05	4,91623E-06	9,01855E-06
<i>day 7</i>				
Anzahl	3	3	3	9
Summe	0,004947	0,022138	0,00375	0,030835
Mittelwert	0,001649	0,007379333	0,00125	0,003426111
Varianz	3,50443E-07	0,000103454	3,51E-08	3,47805E-05
<i>Gesamt</i>				
Anzahl	6	6	6	
Summe	0,013237	0,040828	0,01469	
Mittelwert	0,002206167	0,006804667	0,002448333	
Varianz	6,58872E-07	5,02007E-05	3,70374E-06	

Streuungs- ursache	Quadrat- summen (SS)	Freiheits- grade (df)	Mittlere Quadrat- summe (MS)	Prüfgröße (F)	P-Wert	kritischer F- Wert
Stichprobe	2,78873E-06	1	2,78873E-06	0,128534611	<b>0,72618435</b>	4,747225347
Spalten	8,0365E-05	2	4,01825E-05	1,852037168	<b>0,19907349</b>	3,885293835
Wechselwirkun- g	9,67134E-06	2	4,83567E-06	0,222879218	0,80345077	3,885293835
Fehler	0,000260356	12	2,16964E-05			
Gesamt	0,000353182	17				

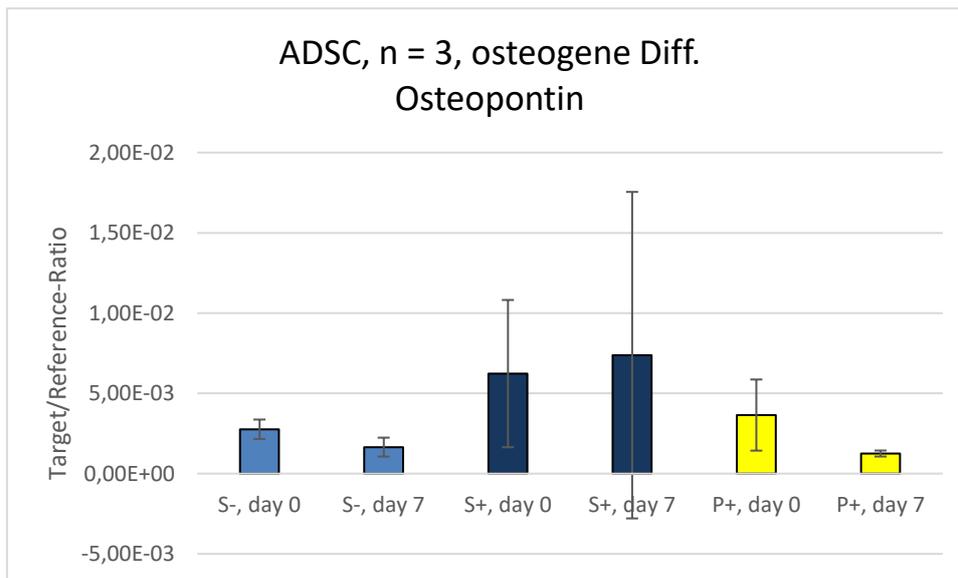
**Tabelle 10: ANOVA-Analyse der Expression von Osteopontin in ADSC (n=3) nach 14-tägiger osteogener Differenzierung**

Mit  $p \approx 0,73$  unterschied sich die Expression von Osteopontin zwischen Tag 0 und Tag 7 der osteogenen Differenzierung nicht signifikant.

Zwischen den verschiedenen Expansionsmedien (GMP S-, GMP S+, GMP P+) bestand mit  $p \approx 0,20$  kein signifikanter Unterschied.

Unabhängig vom verwendeten Expansionsmedium (GMP S-, GMP S+ oder GMP P+) war die Expression des osteogenen Markergens Osteopontin an Tag 7 der osteogenen Differenzierung also nicht signifikant höher als zu Beginn der Differenzierung an Tag 0.

War GMP S- oder GMP P+ als Expansionsmedium verwendet worden, so ließ sich sogar eine Abnahme der relativen Expression von Osteopontin erkennen.



**Abbildung 13: Expression von Osteopontin (in Bezug auf die Expression von s.g. Housekeeping Genes) an Tag 0 und Tag 7 der osteogenen Differenzierung von ADSC (n=3)**

### 3.2.2.2 Runx2

	S-	S+	P+
day 0	3,46E-05	7,38E-05	1,99E-05
	1,77E-04	1,26E-04	2,60E-04
	7,59E-05	1,38E-04	2,38E-04
day 7	5,69E-05	1,37E-03	1,09E-04
	2,15E-04	5,94E-05	5,07E-04
	1,83E-04	4,43E-04	4,12E-04

**Tabelle 11: Runx2: Werte der Target/Reference-Ratio in der Anordnung für die statistische Auswertung per ANOVA (Excel®), Zuordnung zu den einzelnen Proben (n=3) s. Tabelle 8**

ZUSAMMENFASSUNG	S-	S+	P+	Gesamt
<i>day 0</i>				
Anzahl	3	3	3	9
Summe	0,0002875	0,0003378	0,0005179	0,0011432
Mittelwert	9,58333E-05	0,0001126	0,000172633	0,000127022
Varianz	5,36744E-09	1,16508E-09	1,76166E-08	7,2602E-09
<i>day 7</i>				
Anzahl	3	3	3	9
Summe	0,0004549	0,0018724	0,001028	0,0033553
Mittelwert	0,000151633	0,000624133	0,000342667	0,000372811
Varianz	6,9868E-09	4,54025E-07	4,32063E-08	1,68426E-07
<i>Gesamt</i>				
Anzahl	6	6	6	
Summe	0,0007424	0,0022102	0,0015459	
Mittelwert	0,000123733	0,000368367	0,00025765	
Varianz	5,87579E-09	2,60576E-07	3,30026E-08	

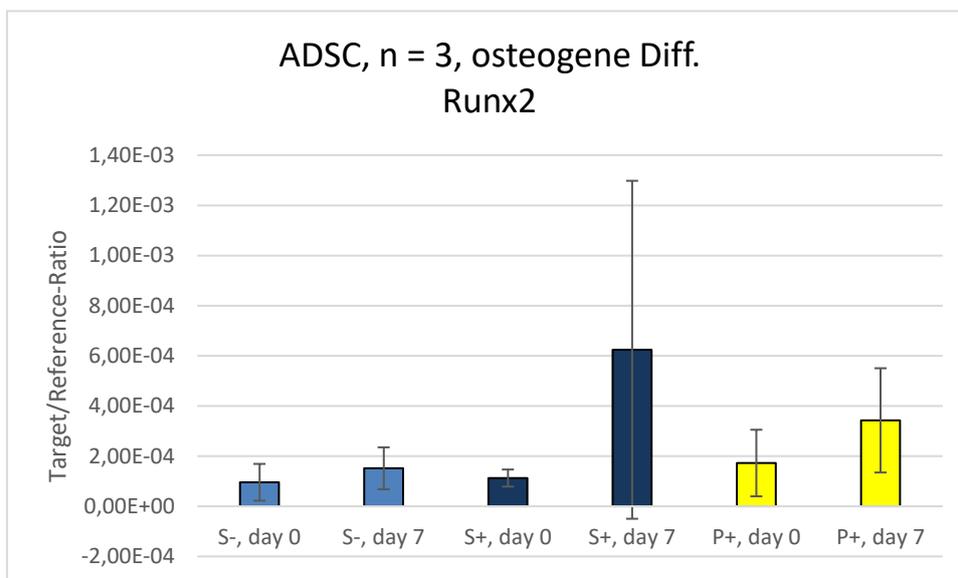
Streuungs- ursache	Quadrat- summen (SS)	Freiheits- grade (df)	Mittlere Quadrat- summe (MS)	Prüfgröße (F)	P-Wert	kritischer F- Wert
Stichprobe	2,71855E-07	1	2,71855E-07	3,087111469	<b>0,1043746</b>	4,747225347
Spalten	1,80075E-07	2	9,00373E-08	1,022440096	<b>0,38902655</b>	3,885293835
Wechselwirkun- g	1,68682E-07	2	8,43411E-08	0,957755235	0,41123742	3,885293835
Fehler	1,05673E-06	12	8,80612E-08			
Gesamt	1,67735E-06	17				

**Tabelle 12: ANOVA-Analyse der Expression von Runx2 in ADSC (n=3) nach 14-tägiger osteogener Differenzierung**

Mit  $p \approx 0,10$  unterschied sich die Expression von Runx2 zwischen Tag 0 und Tag 7 der osteogenen Differenzierung nicht signifikant.

Zwischen den verschiedenen Expansionsmedien (GMP S-, GMP S+, GMP P+) bestand mit  $p \approx 0,39$  kein signifikanter Unterschied.

Unabhängig vom verwendeten Expansionsmedium (GMP S-, GMP S+ oder GMP P+) war die Expression des osteogenen Markergens Runx2 an Tag 7 der osteogenen Differenzierung also nicht signifikant höher als zu Beginn der Differenzierung an Tag 0.



**Abbildung 14: Expression von Runx2 (in Bezug auf die Expression von s.g. Housekeeping Genes) an Tag 0 und Tag 7 der osteogenen Differenzierung von ADSC (n=3)**

### 3.2.3 Analyse von glattmuskulären Markern nach myogener Differenzierung der ADSC

Um zu überprüfen ob die 14-tägige Kultur in dem in dieser Arbeit eingesetzten Medium für die myogene Differenzierung (s. 2.1.5) eine erfolgreiche Myogenese der aus humanem Biopsiematerial (Fettgewebe) gewonnenen definierten Zellen induziert wurde die Expression von Myh11 und Transgelin per qRT-PCR gemessen (n=5).

Eine statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse per ANOVA (Excel®). Hierfür wurde der jeweilige Wert der Target/Reference-Ratio wie in Tabelle 13 ersichtlich angeordnet. Das Signifikanzniveau wurde auf  $\alpha = 0,05$  festgelegt.

	S-	S+	P+
day 0	F5	F5	F5
	F4	F4	F4
	F10	F10	F10
	F11	F11	F11
	F7	F7	F7
day 14	F5	F5	F5
	F4	F4	F4
	F10	F10	F10
	F11	F11	F11
	F7	F7	F7

**Tabelle 13: Myh11 und Transgelin: Schema der Anordnung von Rohdaten für die statistische Auswertung per ANOVA (Excel®). F4-11 = versch. Proben (n=5), s. 2.1.2**

### 3.2.3.1 Myh11

	S-	S+	P+
day 0	3,53E-06	1,98E-06	3,62E-06
	1,90E-06	1,71E-06	2,14E-06
	8,41E-04	3,20E-04	3,41E-04
	1,43E-04	9,62E-05	1,01E-04
	2,25E-04	2,38E-04	3,23E-04
day 14	1,39E-05	9,36E-06	3,19E-05
	1,40E-05	8,27E-06	5,13E-06
	1,20E-03	3,07E-04	8,12E-05
	1,05E-03	3,75E-04	8,48E-04
	2,67E-04	6,69E-04	5,46E-04

**Tabelle 14: Myh11: Werte der Target/Reference-Ratio in der Anordnung für die statistische Auswertung per ANOVA (Excel®), Zuordnung zu den einzelnen Proben (n=5) s. Tabelle 13**

ZUSAMMENFASSUNG	S-	S+	P+	Gesamt
<i>day 0</i>				
Anzahl	5	5	5	15
Summe	0,00121443	0,00065789	0,00077076	0,00264308
Mittelwert	0,000242886	0,000131578	0,000154152	0,000176205
Varianz	1,20851E-07	2,04354E-08	2,80036E-08	5,08414E-08
<i>day 14</i>				
Anzahl	5	5	5	15
Summe	0,0025449	0,00136863	0,00151223	0,00542576
Mittelwert	0,00050898	0,000273726	0,000302446	0,000361717
Varianz	3,29719E-07	7,69903E-08	1,41872E-07	1,68503E-07
<i>Gesamt</i>				
Anzahl	10	10	10	
Summe	0,00375933	0,00202652	0,00228299	
Mittelwert	0,000375933	0,000202652	0,000228299	
Varianz	2,19921E-07	4,89131E-08	8,16091E-08	

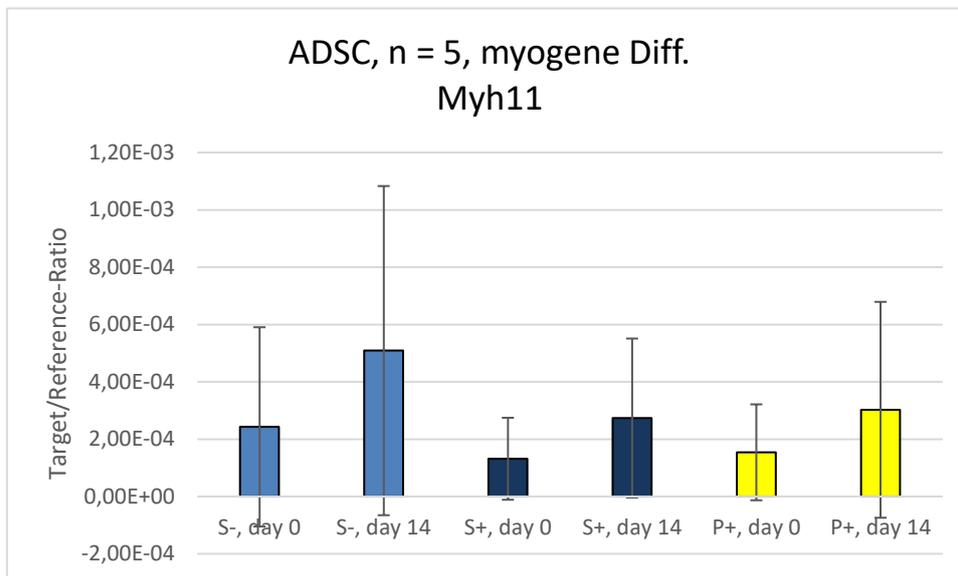
Streuungs- ursache	Quadrat- summen (SS)	Freiheits- grade (df)	Mittlere Quadrat- summe (MS)	Prüfgröße (F)	P-Wert	kritischer F- Wert
Stichprobe	2,5811E-07	1	2,5811E-07	2,157297296	<b>0,1548804</b>	4,259677273
Spalten	1,74933E-07	2	8,74665E-08	0,731048573	<b>0,49181849</b>	3,402826105
Wechselwirkung	2,43977E-08	2	1,21988E-08	0,101958486	0,90345608	3,402826105
Fehler	2,87148E-06	24	1,19645E-07			
Gesamt	3,32893E-06	29				

**Tabelle 15: ANOVA-Analyse der Expression von Myh11 in ADSC (n=5) nach 14-tägiger myogener Differenzierung**

Mit  $p \approx 0,15$  unterschied sich die Expression von Myh11 zwischen Tag 0 und Tag 14 der myogenen Differenzierung nicht signifikant.

Zwischen den verschiedenen Expansionsmedien (GMP S-, GMP S+, GMP P+) bestand mit  $p \approx 0,49$  kein signifikanter Unterschied.

Unabhängig vom verwendeten Expansionsmedium (GMP S-, GMP S+ oder GMP P+) war die Expression des myogenen Markergens Myh11 an Tag 14 der myogenen Differenzierung also nicht signifikant höher als zu Beginn der Differenzierung an Tag 0. Ursächlich scheint hier jedoch die hohe Messwertstreuung zu sein, bei näherer Betrachtung der Ergebnisse lässt sich durchaus eine Tendenz zur Zunahme der relativen Expression von Myh11 erkennen. Dies lässt sich mit den Ergebnissen der Untersuchung der Expression des zweiten in dieser Arbeit eingesetzten myogenen Markergens Transgelin vereinbaren (s.u.).



**Abbildung 15: Expression von Myh11 (in Bezug auf die Expression von s.g. Housekeeping Genes) an Tag 0 und Tag 14 der myogenen Differenzierung von ADSC (n=5)**

### 3.2.3.2 Transgelin

	S-	S+	P+
day 0	0,4435	0,1289	0,3426
	0,416	0,3924	0,4864
	8,18E-02	0,1796	8,13E-02
	0,1438	6,93E-02	7,67E-02
day 14	0,7496	0,6917	0,7399
	0,5475	0,4168	0,5462
	0,1674	0,3957	0,2623
	0,4161	0,4746	0,3286

**Tabelle 16: Transgelin: Werte der Target/Reference-Ratio in der Anordnung für die statistische Auswertung per ANOVA (Excel®), Zuordnung zu den einzelnen Proben (n=5) s. Tabelle 13**

ZUSAMMENFASSUNG	S-	S+	P+	Gesamt
<i>day 0</i>				
Anzahl	4	4	4	12
Summe	1,0851	0,7702	0,987	2,8423
Mittelwert	0,271275	0,19255	0,24675	0,236858333
Varianz	0,03425248	0,0197832	0,040970017	0,027090855
<i>day 14</i>				
Anzahl	4	4	4	12
Summe	1,8806	1,9788	1,877	5,7364
Mittelwert	0,47015	0,4947	0,46925	0,478033333
Varianz	0,05955143	0,01836081	0,04726115	0,034289859
<i>Gesamt</i>				
Anzahl	8	8	8	
Summe	2,9657	2,749	2,864	
Mittelwert	0,3707125	0,343625	0,358	
Varianz	0,05150204	0,04243161	0,051958	

Streuungs- ursache	Quadrat- summen (SS)	Freiheits- grade (df)	Mittlere Quadrat- summe (MS)	Prüfgröße (F)	P-Wert	kritischer F- Wert
Stichprobe	0,34899228	1	0,348992284	9,51022994	<b>0,00640119</b>	4,41387341
Spalten	0,00293862	2	0,001469308	0,04003944	<b>0,96083686</b>	3,55455714
Wechselwirkung	0,01171199	2	0,005855996	0,15957908	0,85369538	3,55455714
Fehler	0,66053725	18	0,036696514			
Gesamt	1,02418014	23				

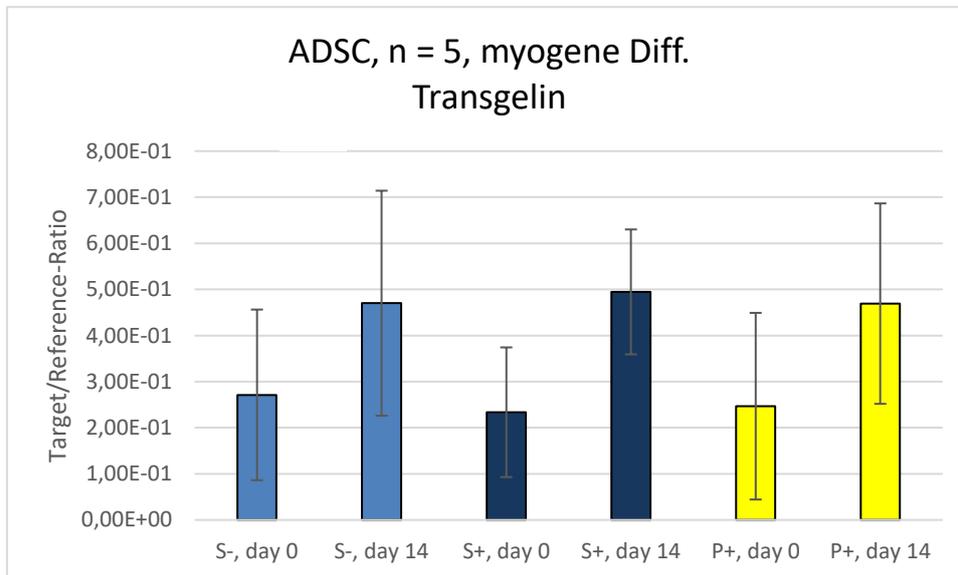
**Tabelle 17: ANOVA-Analyse der Expression von Transgelin in ADSC (n=5) nach 14-tägiger myogener Differenzierung**

Mit  $p \approx 0,006$  unterschied sich die Expression von Transgelin zwischen Tag 0 und Tag 14 der myogenen Differenzierung signifikant.

Zwischen den verschiedenen Expansionsmedien (GMP S-, GMP S+, GMP P+) bestand mit  $p \approx 0,96$  kein signifikanter Unterschied.

Die Expression des myogenen Markergens Transgelin war an Tag 14 der myogenen Differenzierung also signifikant höher als zu Beginn der Differenzierung an Tag 0. Dabei

war es nicht von Bedeutung welches Expansionsmedium (GMP S-, GMP S+ oder GMP P+) verwendet worden war.



**Abbildung 16: Expression von Transgelin (in Bezug auf die Expression von s.g. Housekeeping Genes) an Tag 0 und Tag 14 der myogenen Differenzierung von ADSC (n=5)**

**Zusammenfassend** lässt sich festhalten:

Die Expression des adipogenen Markergens PPAR $\gamma$ 2 war an Tag 14 der adipogenen Differenzierung signifikant höher als an Tag 0. Dies weist darauf hin, dass die 14-tägige Kultur in dem in dieser Arbeit eingesetzten Medium für die Adipogene Differenzierung (s. 2.1.5) eine erfolgreiche Adipogenese der aus humanem Biopsiematerial (Fettgewebe) gewonnenen definierten Zellen induziert.

Die Expression der osteogenen Markergene Osteopontin und Runx2 war an Tag 7 der osteogenen Differenzierung nicht signifikant höher als zu Beginn der Differenzierung an Tag 0. Dies weist darauf hin, dass die 7-tägige Kultur in dem in dieser Arbeit eingesetzten Medium für die Osteogene Differenzierung (s. 2.1.5) keine erfolgreiche Osteogenese der aus humanem Biopsiematerial (Fettgewebe) gewonnenen definierten Zellen induziert.

Die Expression des myogenen Markergens Transgelin war an Tag 14 der myogenen Differenzierung signifikant höher als zu Beginn der Differenzierung an Tag 0.

Die Expression des myogenen Markergens Myh11 war an Tag 14 der myogenen Differenzierung nicht signifikant höher als zu Beginn der Differenzierung an Tag 0. Ursächlich schien hier jedoch die hohe Messwertstreuung zu sein, bei näherer Betrachtung der Ergebnisse ließ sich durchaus eine Tendenz zur Zunahme der relativen Expression von Myh11 erkennen, sodass unter Einbeziehung der signifikant höheren Expression von Transgelin davon ausgegangen werden kann, dass die 14-tägige Kultur in dem in dieser Arbeit eingesetzten Medium für die Myogene Differenzierung (s. 2.1.5) eine erfolgreiche Myogenese der aus humanem Biopsiematerial (Fettgewebe) gewonnenen definierten Zellen induziert.

Differenzierung	Tag der Differenzierung	Stichproben- größe [n]	Signifikant	Nicht signifikant
adipogen	14	5	PPAR $\gamma$ 2	-
osteogen	7	3	-	Osteopontin, Runx2
myogen	14	5	Transgelin	Myh11

**Tabelle 18: Überblick über die Ergebnisse der Untersuchung auf Expression von Markergenen nach Kultur der aus humanem Biopsiematerial (Fettgewebe) gewonnenen definierten Zellen in entsprechenden Differenzierungsmedien. Signifikanzniveau  $\alpha = 0,05$ .**

Ein Einfluss der verschiedenen Expansionsmedien (GMP S-, GMP S+, GMP P+) auf die Differenzierungsfähigkeit der aus humanem Biopsiematerial (Fettgewebe) gewonnenen definierten Zellen konnte in keiner der Untersuchungen gezeigt werden.

### 3.2.4 Analyse von adipogenen, osteogenen und myogenen Markern nach myogener Differenzierung der ADSC

Um das Genexpressionsprofil der Zellen nach 14-tägiger Kultur im Medium für die myogene Differenzierung zu überprüfen, wurde das Verhältnis der Expression von myogenen (Myh-11, Transgelin), adipogenen (PPAR $\gamma$ 2) und osteogenen (Osteopontin, Runx2) Markergenen per qRT-PCR untersucht (n=5).

Der Prüfung auf unterschiedliche Genexpression wurde eine Prüfung auf einen Einfluss der unterschiedlichen Expansionsmedien (GMP S-, GMP S+, GMP P+) vorgeschaltet. Hierzu wurde für jedes Markergen eine einfaktorische Varianzanalyse per ANOVA (Excel®) durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde auf  $\alpha = 0,05$  festgelegt. Alle Varianzanalysen waren mit p-Werten von 0,6 bis 0,9 (s. Abbildung 17) durchweg nicht signifikant.

Myh11	S+	S-	P+				
	9,36E-06	1,39E-05	3,19E-05				
	8,27E-06	1,40E-05	5,13E-06				
	3,07E-04	1,20E-03	8,12E-05				
	3,75E-04	1,05E-03	8,48E-04				
	6,69E-04	2,67E-04	5,46E-04				
Anova: Einfaktorielle Varianzanalyse							
ZUSAMMENFASSUNG							
	<i>Gruppen</i>	<i>Anzahl</i>	<i>Summe</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>Varianz</i>		
S+		5	0,00136863	0,000273726	7,699E-08		
S-		5	0,0025449	0,00050898	3,2972E-07		
P+		5	0,00151223	0,000302446	1,4187E-07		
ANOVA							
	<i>Streuungsursache</i>	<i>Quadratsummen (SS)</i>	<i>Freiheitsgrade (df)</i>	<i>Mittlere Quadratsumme (MS)</i>	<i>Prüfgröße (F)</i>	<i>P-Wert</i>	<i>kritischer F-Wert</i>
	Unterschiede zwischen den Gruppen	1,64709E-07	2	8,23546E-08	0,45036874	0,6477393	3,885293835
	Innerhalb der Gruppen	2,19433E-06	12	1,8286E-07			
	Gesamt	2,35904E-06	14				
Transgelin	S+	S-	P+				
	6,92E-01	7,50E-01	7,40E-01				
	4,17E-01	5,48E-01	5,46E-01				
	3,96E-01	1,67E-01	2,62E-01				
	4,75E-01	4,16E-01	3,29E-01				
	8,78E-01	7,49E-01	6,73E-01				
Anova: Einfaktorielle Varianzanalyse							
ZUSAMMENFASSUNG							
	<i>Gruppen</i>	<i>Anzahl</i>	<i>Summe</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>Varianz</i>		
S+		5	2,8567	0,57134	0,04313905		
S-		5	2,6298	0,52596	0,06023735		
P+		5	2,5496	0,50992	0,04371611		
ANOVA							
	<i>Streuungsursache</i>	<i>Quadratsummen (SS)</i>	<i>Freiheitsgrade (df)</i>	<i>Mittlere Quadratsumme (MS)</i>	<i>Prüfgröße (F)</i>	<i>P-Wert</i>	<i>kritischer F-Wert</i>
	Unterschiede zwischen den Gruppen	0,010148404	2	0,005074202	0,10349001	0,90248101	3,885293835
	Innerhalb der Gruppen	0,588370052	12	0,049030838			
	Gesamt	0,598518456	14				

Runx2	S+	S-	P+			
	1,23E-03	9,92E-04		1,19E-03		
	1,78E-04	1,11E-04		1,35E-04		
	1,65E-04	1,24E-04		1,71E-04		
	1,88E-03	1,03E-03		4,42E-04		
	8,48E-04	4,81E-04		8,10E-04		
Anova: Einfaktorielle Varianzanalyse						
ZUSAMMENFASSUNG						
Gruppen	Anzahl	Summe	Mittelwert	Varianz		
S+	5	0,004301	0,0008602	5,314E-07		
S-	5	0,002738	0,0005476	2,0117E-07		
P+	5	0,002748	0,0005496	2,0118E-07		
ANOVA						
Streuungsursache	Quadratsummen (SS)	Freiheitsgrade (df)	Mittlere Quadratsumme (MS)	Prüfgröße (F)	P-Wert	kritischer F-Wert
Unterschiede zwischen den Gruppen	3,23659E-07	2	1,61829E-07	0,51993127	0,60736449	3,885293835
Innerhalb der Gruppen	3,73502E-06	12	3,11251E-07			
Gesamt	4,05867E-06	14				

Osteopontin	S+	S-	P+			
	5,63E-03	5,26E-03		2,90E-03		
	3,96E-02	3,31E-02		2,58E-02		
	9,79E-03	3,04E-02		1,34E-02		
	6,16E-03	2,19E-03		6,74E-03		
	1,26E-03	1,74E-03		2,15E-03		
Anova: Einfaktorielle Varianzanalyse						
ZUSAMMENFASSUNG						
Gruppen	Anzahl	Summe	Mittelwert	Varianz		
S+	5	0,06244	0,012488	0,00023887		
S-	5	0,07269	0,014538	0,00024962		
P+	5	0,05099	0,010198	9,5916E-05		
ANOVA						
Streuungsursache	Quadratsummen (SS)	Freiheitsgrade (df)	Mittlere Quadratsumme (MS)	Prüfgröße (F)	P-Wert	kritischer F-Wert
Unterschiede zwischen den Gruppen	0,000047137	2	2,35685E-05	0,12098604	0,88711346	3,885293835
Innerhalb der Gruppen	0,002337642	12	0,000194803			
Gesamt	0,002384779	14				

PPARgamma2	S+	S-	P+			
	3,05E-05	2,53E-05		2,70E-05		
	1,26E-04	8,11E-05		7,51E-05		
	2,17E-04	3,55E-04		2,19E-04		
	3,13E-05	1,44E-04		3,37E-04		
	1,14E-04	1,21E-04		1,09E-04		
Anova: Einfaktorielle Varianzanalyse						
ZUSAMMENFASSUNG						
Gruppen	Anzahl	Summe	Mittelwert	Varianz		
S+	5	0,0005188	0,00010376	6,0101E-09		
S-	5	0,0007264	0,00014528	1,5772E-08		
P+	5	0,0007671	0,00015342	1,5523E-08		
ANOVA						
Streuungsursache	Quadratsummen (SS)	Freiheitsgrade (df)	Mittlere Quadratsumme (MS)	Prüfgröße (F)	P-Wert	kritischer F-Wert
Unterschiede zwischen den Gruppen	7,09381E-09	2	3,5469E-09	0,28523619	0,75679436	3,885293835
Innerhalb der Gruppen	1,4922E-07	12	1,2435E-08			
Gesamt	1,56313E-07	14				

**Abbildung 17: Statistische Analyse auf einen Einfluss der verschiedenen Expansionsmedien (GMP S-, GMP S+, GMP P+) auf die Expression der einzelnen Markergene (Myh11, Transgelin, Runx2, Osteopontin, PPAR $\gamma$ 2)**

Im nachfolgenden Test auf unterschiedliche Expression von Markergenen wurden die drei Expansionsmedien (GMP S-, GMP S+, GMP P+) daher zusammengefasst. Dann wurde die parameterfreie Varianzanalyse nach Kruskal-Wallis angewendet (Renn, 1975).

	PPARgamma2	Myh11	Runx2	Osteopontin	Transgelin
	3,05E-05	9,36E-06	1,23E-03	5,63E-03	6,92E-01
	1,26E-04	8,27E-06	1,78E-04	3,96E-02	4,17E-01
	2,17E-04	3,07E-04	1,65E-04	9,79E-03	3,96E-01
	3,13E-05	3,75E-04	1,88E-03	6,16E-03	4,75E-01
	1,14E-04	6,69E-04	8,48E-04	1,26E-03	8,78E-01
	2,53E-05	1,39E-05	9,92E-04	5,26E-03	7,50E-01
	8,11E-05	1,40E-05	1,11E-04	3,31E-02	5,48E-01
	3,55E-04	1,20E-03	1,24E-04	3,04E-02	1,67E-01
	1,44E-04	1,05E-03	1,03E-03	2,19E-03	4,16E-01
	1,21E-04	2,67E-04	4,81E-04	1,74E-03	7,49E-01
	2,70E-05	3,19E-05	1,19E-03	2,90E-03	7,40E-01
	7,51E-05	5,13E-06	1,35E-04	2,58E-02	5,46E-01
	2,19E-04	8,12E-05	1,71E-04	1,34E-02	2,62E-01
	3,37E-04	8,48E-04	4,42E-04	6,74E-03	3,29E-01
	1,09E-04	5,46E-04	8,10E-04	2,15E-03	6,73E-01
Mittelwert	1,34E-04	3,62E-04	6,52E-04	1,24E-02	5,36E-01
Standardabweichung	1,06E-04	4,10E-04	5,38E-04	1,31E-02	2,07E-01
Median	1,14E-04	2,67E-04	4,81E-04	6,16E-03	5,46E-01
Kruskal-Wallis Test					
	PPARgamma2	Myh11	Runx2	Osteopontin	Transgelin
Median	1,14E-04	2,67E-04	4,81E-04	6,16E-03	5,46E-01
Rang Summe	250	314,5	472,5	793	1020
Anzahl Werte	15	15	15	15	15
r <sup>2</sup> /n	4166,666667	6594,01667	14883,75	41923,2667	69360
H-stat					60,2688421
H-ties					60,2696994
df					4
p-Wert					2,5459E-12
alpha					0,05
Signifikanz					ja

**Abbildung 18: Statistische Prüfung auf unterschiedliche Expression der Markergene nach 14-tägiger Kultur von aus humanem Biopsiematerial (Fettgewebe) gewonnenen definierten Zellen (n=5) in myogenem Differenzierungsmedium**

Der Kruskal-Wallis-Test zeigte mit  $p \approx 2,5 \cdot 10^{-12}$  deutliche Unterschiede zwischen den untersuchten Markergenen auf.

Daher war es gestattet nachfolgend multiple Vergleiche durchzuführen. Dazu wurde der Dunn's Test (De Muth, 2006) angewandt.

DUNN's TEST		alpha		0,05		
group	R-sum	size	R-mean	z-crit		
PPARgamma2	250	15	16,6666667			
Myh11	314,5	15	20,9666667			
Runx2	472,5	15	31,5			
Osteopontin	793	15	52,8666667			
Transgelin	1020	15	68			
		75		1,95996398		
D TEST						
group 1	group 2	R-mean	std err	z-stat	R-crit	p-value
PPARgamma2	Myh11	4,3	7,95816766	0,54032538	15,597722	0,58897266
PPARgamma2	Runx2	14,83333333	7,95816766	1,86391315	15,597722	0,0623339
PPARgamma2	Osteopontin	36,2	7,95816766	4,5487858	15,597722	5,3956E-06
PPARgamma2	Transgelin	51,33333333	7,95816766	6,45039607	15,597722	1,1156E-10
Myh11	Runx2	10,53333333	7,95816766	1,32358776	15,597722	0,18563999
Myh11	Osteopontin	31,9	7,95816766	4,00846041	15,597722	6,1116E-05
Myh11	Transgelin	47,03333333	7,95816766	5,91007068	15,597722	3,4196E-09
Runx2	Osteopontin	21,36666667	7,95816766	2,68487265	15,597722	0,00725574
Runx2	Transgelin	36,5	7,95816766	4,58648292	15,597722	4,5078E-06
Osteopontin	Transgelin	15,13333333	7,95816766	1,90161027	15,597722	0,05722212

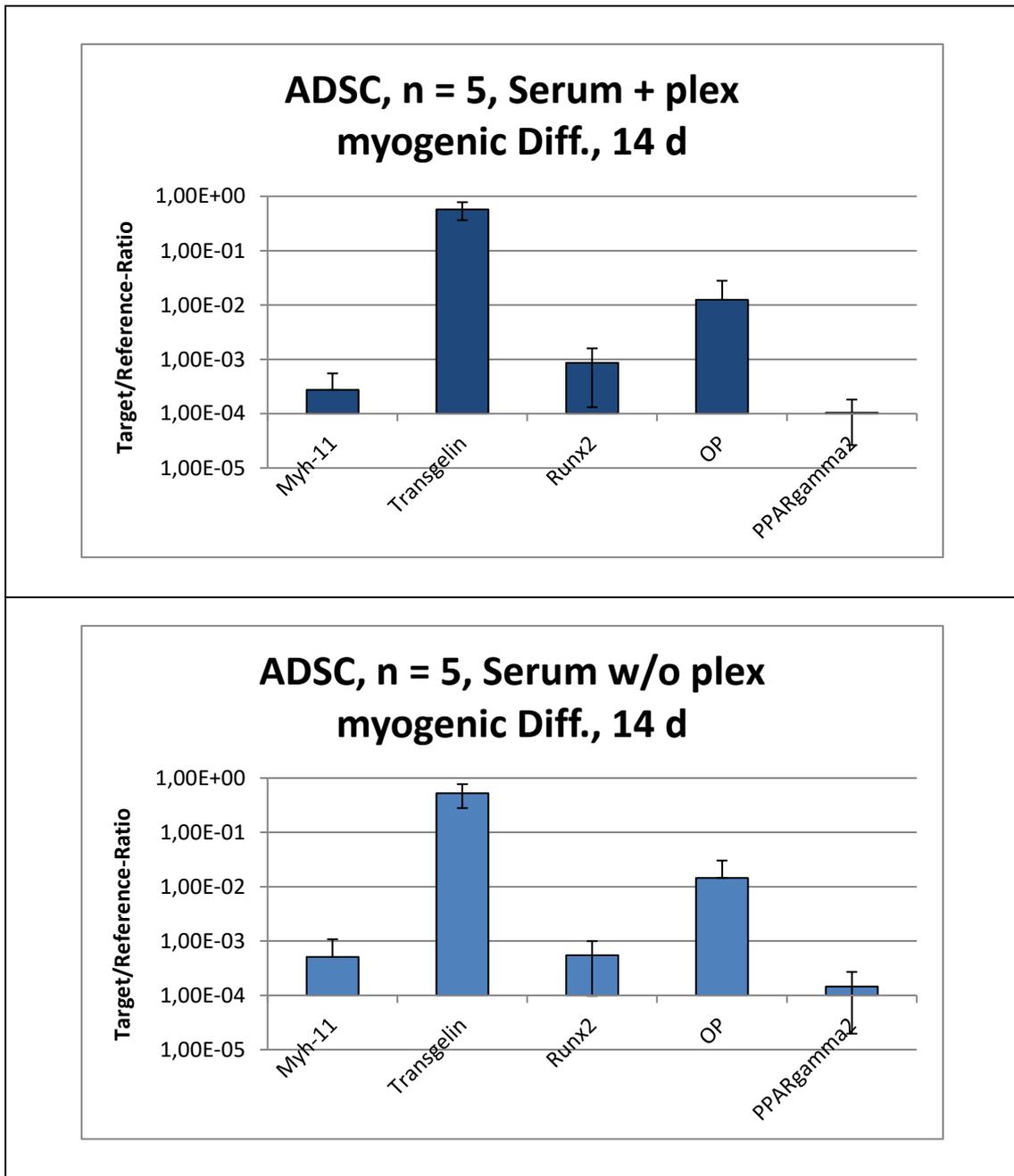
Abbildung 19: Multipler Vergleich der Expression von Markergenen nach 14-tägiger Kultur von aus humanem Biopsiematerial (Fettgewebe) gewonnenen definierten Zellen (n=5) in myogenem Differenzierungsmedium, grün = hoch signifikant, gelb = knapp nicht signifikant, weiß = eindeutig nicht signifikant

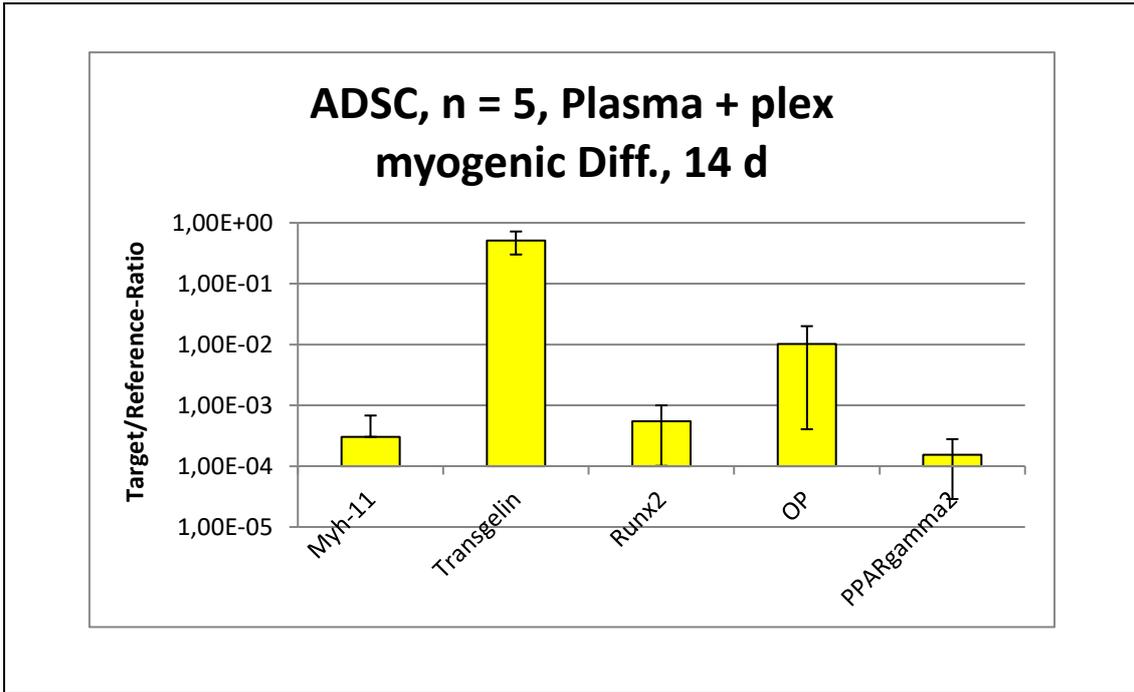
Signifikante Unterschiede bestanden in der Expression von:

- PPAR $\gamma$ 2 und Osteopontin
- PPAR $\gamma$ 2 und Transgelin
- Myh11 und Osteopontin
- Myh11 und Transgelin
- Runx2 und Osteopontin
- Runx2 und Transgelin

Die Expression von Transgelin und Osteopontin war signifikant höher als die der restlichen Markergene. Die Expression von Transgelin und Osteopontin selbst war knapp nicht signifikant unterschiedlich.

Deutlicher werden die Ergebnisse in Form von Balkendiagrammen:





**Abbildung 20: Expression von Markergenen nach Expansion von aus humanem Biopsiematerial (Fettgewebe) gewonnenen definierten Zellen (n=5) in versch. Expansionsmedien (GMP S-, GMP S+, GMP P+) und anschließender 14-tägiger Kultur in myogenem Differenzierungsmedium**

**Zusammenfassend** lässt sich festhalten:

Nach Expansion in unterschiedlichen Medien (GMP S-, GMP S+, GMP P+) und anschließender 14-tägiger Kultur im myogenen Differenzierungsmedium, unterschieden sich die Genexpressionsprofile der aus humanem Biopsiematerial (Fettgewebe) gewonnenen definierten Zellen nicht signifikant. D.h. trotz verschiedener Expansionsmedien ergaben sich dieselben Genexpressionsprofile.

Jedoch bestanden nach der 14-tägigen Kultur in myogenem Differenzierungsmedium signifikante Unterschiede in der Expression der untersuchten Markergene. Die Expression von Transgelin und Osteopontin war signifikant höher als die der restlichen Markergene. Die Expression von Transgelin und Osteopontin selbst war knapp nicht signifikant unterschiedlich.

### 3.3 Gesamtbetrachtung

Zunächst wurden die aus humanem Biopsiematerial (Fettgewebe), gemäß dem unter 2.1.2 beschriebenen Vorgehen, isolierten Zellen anhand der „MSC-Kriterien“, die von der „International Society for Cellular Therapies“ 2006 definiert wurden (Dominici et al., 2006) untersucht (s. 3.1). Dabei zeigte sich, dass alle Kriterien erfüllt wurden. So erfolgte unabhängig von der anzunehmenden Variabilität des Probandenbiopsiematerials und unabhängig von den verschiedenen Expansionsmedien (GMP P+, GMP S+, GMP S-, s.2.1.4) eine Adhäsion der Zellen am Kunststoff der Zellkulturflaschen (s. 3.1.1). Ebenso konnte aufgrund der Von Kossa- und Oil Red O-Färbungen auf eine erfolgreiche Adipogenese sowie Osteogenese der Zellen nach 4 Wochen der Differenzierungen geschlossen werden (s. 3.1.2). Die Analyse der korrespondierenden osteogenen Faktoren auf mRNA-Ebene 1 Woche nach Induktion der Differenzierung blieb jedoch nicht eindeutig. Das untersuchte Expressionsmuster an Oberflächenantigenen stimmte mit den o.g. Kriterien bzw. den Ergebnissen weiterer Forschungsarbeiten überein (s. 3.1.3). Darüber hinaus wiesen die Zellen auch den bereits vielfach beobachteten und als typisch für MSC beschriebenen (Denu et al., 2016) Fibroblasten-ähnlichen Phänotyp auf (s. 3.1.4).

Die Untersuchung per qRT-PCR auf die Expression von adipogenen, osteogenen und myogenen Markergenen nach Kultur der aus Fettgewebe gewonnenen MSC in den in dieser Arbeit eingesetzten Differenzierungsmedien (s. 2.1.5) erbrachte folgende Ergebnisse:

Die Expression des adipogenen Markergens PPAR $\gamma$ 2 war an Tag 14 der adipogenen Differenzierung signifikant höher als an Tag 0.

Die Expression der osteogenen Markergene Osteopontin und Runx2 war an Tag 7 der osteogenen Differenzierung nicht signifikant höher als zu Beginn der Differenzierung an Tag 0. Proben für Untersuchungen nach 14 Tagen osteogener Differenzierung standen nicht zur Verfügung.

Die Expression des myogenen Markergens Transgelin war an Tag 14 der myogenen Differenzierung signifikant höher als zu Beginn der Differenzierung an Tag 0. Die

Expression des myogenen Markergens Myh11 war an Tag 14 der myogenen Differenzierung jedoch nicht signifikant höher als zu Beginn der Differenzierung an Tag 0. Ursächlich könnte hier jedoch die hohe Messwertstreuung sein, bei näherer Betrachtung der Ergebnisse ließ sich durchaus eine Tendenz zur Zunahme der relativen Expression von Myh11 erkennen.

Zusätzlich wurde überprüft ob das verwendete Expansionsmedium (GMP S-, GMP S+, GMP P+, s. 2.1.4) Einfluss auf die Differenzierungsfähigkeit der Zellen nahm. Hinweise auf einen solchen ergaben sich in keiner der Untersuchungen.

Des Weiteren wurde das Genexpressionsprofil der Zellen nach Expansion in verschiedenen Medien (GMP S-, GMP S+, GMP P+) und anschließender 14-tägiger Kultur in myogenem Differenzierungsmedium untersucht. Abermals unabhängig vom zuvor verwendeten Expansionsmedium erhielten wir folgende Ergebnisse: In der Expression der untersuchten Markergene bestanden signifikante Unterschiede. Die Expression von Transgelin und Osteopontin war signifikant höher als die der restlichen Markergene. Die Expression von Transgelin und Osteopontin selbst war knapp nicht signifikant unterschiedlich.

## **4. Diskussion**

Ziel der Arbeit war es zu untersuchen ob sich MSC aus Fettgewebe unter GMP-konformen Bedingungen, die Voraussetzung für eine spätere Verwendung im klinischen Alltag sind, isolieren und kulturell anzüchten lassen, und ob sich diese effektiv myogen differenzieren lassen um so zukünftig im Rahmen der zellbasierten regenerativen Therapie der Harninkontinenz zum Einsatz kommen zu können.

Des Weiteren sollte untersucht werden ob die Zusammensetzung des Expansionsmediums Einfluss auf die Eigenschaften der isolierten Zellen, insbesondere die Differenzierungsfähigkeit nimmt.

### **4.1 Analyse typischer Merkmalskriterien von definiertem humanem Biopsiematerial**

Bei der Untersuchung der im Rahmen dieser Arbeit isolierten Zellen auf charakteristische Eigenschaften orientierten wir uns an den Kriterien, die von der „International Society for Cellular Therapies“, der Internationalen Gesellschaft für Zellbasierte Therapien, 2006 definiert wurden (Dominici et al., 2006).

Wir erhielten folgende Resultate:

Die isolierten Zellen waren unter Standardkulturbedingungen Kunststoff-adhärenz. Dies entspricht laut Domici et al. einer der für MSC charakteristischen Eigenschaften.

Die Ergebnisse der Oil Red O- und Von Kossa-Färbung der Zellen nach 28-tägiger Kultur in den entsprechenden in dieser Arbeit eingesetzten Differenzierungsmedien ließen auf eine erfolgreiche Adipogenese und Osteogenese schließen. Die untersuchten Zellen wiesen also ein entsprechendes Differenzierungspotential auf, wie man es von MSC erwartet.

Die durchflusszytometrischen Untersuchungen ergaben, dass die Zellen die für MSC typischen Oberflächenantigene CD73, CD90 und CD105 (Dominici et al., 2006) exprimierten. Durchschnittlich 32,83 % der untersuchten Zellen exprimierten zudem CD146. Bereits 2001 wurde eine Expression von CD146 durch MSC aus Fettgewebe von Gronthos et al. beobachtet.

Bezüglich der laut Dominici et al. von MSC charakteristischerweise nicht exprimierten Oberflächenantigene CD14, CD34 und CD45 ergaben sich bei Untersuchung der im Rahmen dieser Arbeit isolierten Zellen folgende Ergebnisse: Ein Anteil von 11,80 % der untersuchten Zellen exprimierte CD34. Dies steht im Einklang mit Beobachtungen von Mitchell et al. aus dem Jahre 2006 und Lin et al. aus dem Jahre 2012, die ebenfalls eine Expression von CD34 auf MSC aus Fettgewebe beobachteten. Der Anteil an CD14 exprimierenden Zellen war mit 3,65 % sehr gering. Eine Expression von CD45 war nicht festzustellen (0,12 %).

Ein weiterer Hinweis, dass es sich bei den untersuchten Zellen um MSC handelte, ergab sich aus dem Fibroblasten-ähnlichen Phänotyp, der sich bei den isolierten Zellen eines jeden Biopsiematerials dieser Arbeit zeigte. Es wird allgemein angenommen, dass MSC einen solchen Fibroblasten-ähnlichen Phänotyp aufweisen, dies wurde so zum Beispiel auch von Denu et al. (2016) beschrieben.

Unter Berücksichtigung der charakteristischen Eigenschaften der im Rahmen dieser Arbeit aus humanem Biopsiematerial (Fettgewebe) isolierten Zellen, ist davon auszugehen, dass es sich bei diesen um MSC handelte.

Somit darf angenommen werden, dass eine erfolgreiche Isolation von MSC aus Fettgewebe unter GMP-konformen Bedingungen und folglich auch ein zukünftiger Einsatz dieser Zellen im klinischen Alltag möglich ist. Dies steht im Einklang mit den von Adegani et al. (2013) und Lisini et al. (2018) publizierten Daten. So verglichen Adegani et al. vier verschiedene Arten von Stammzellen, darunter auch MSC aus Fettgewebe und Knochenmark. Beurteilt wurden u.a. auch die Differenzierungspotentiale. Die Ergebnisse legten nahe, dass MSC aus Fettgewebe für die Zellkultur unter GMP-konformen Bedingungen und folglich den klinischen Einsatz geeignet seien. Auch Lisini et al. widmeten sich erfolgreich der GMP-konformen

Expansion von MSC aus Fettgewebe. In ihren Studien erwies sich die GMP-konforme Expansion sogar als vorteilhaft bzgl. Quantität und Reinheit der MSC.

In unseren Untersuchungen zeigte sich außerdem, dass es im Hinblick auf eine erfolgreiche Isolation und Kultur von MSC aus Fettgewebe nicht von Bedeutung war welches der, in dieser Arbeit eingesetzten, verschiedenen GMP-konformen Expansionsmedien (GMP P+, GMP S+, GMP S-) verwendet worden war.

#### **4.2 Analyse von osteogenen, adipogenen und myogenen Markergenen von definiertem MSC-Biopsiematerial**

Die Untersuchungen typischer adipogener, osteogener und myogener Markergene per PCR nach 7-tägiger (für die osteogenen) bzw. 14-tägiger (für die adipogenen und myogenen) Kultur der aus Fettgewebe isolierten Zellen in den entsprechenden in dieser Arbeit eingesetzten Differenzierungsmedien erbrachte folgende Ergebnisse:

Die Expression des adipogenen Markergens PPAR $\gamma$ 2 war an Tag 14 der adipogenen Differenzierung signifikant höher als vor Beginn der Differenzierung an Tag 0. Die 14-tägige Kultur in dem in dieser Arbeit eingesetzten Medium für die adipogene Differenzierung (s. 2.1.5) scheint also eine erfolgreiche Adipogenese der aus humanem Biopsiematerial (Fettgewebe) gewonnenen Zellen zu induzieren.

Die Expression der osteogenen Markergene Osteopontin und Runx2 war an Tag 7 der osteogenen Differenzierung nicht signifikant höher als zu Beginn der Differenzierung an Tag 0. Dies weist darauf hin, dass die 7-tägige Kultur in dem in dieser Arbeit eingesetzten Medium für die osteogene Differenzierung (s. 2.1.5) keine erfolgreiche Osteogenese der aus humanem Biopsiematerial (Fettgewebe) gewonnenen definierten Zellen induziert. Dieses Ergebnis steht jedoch in Kontrast zu jenem Ergebnis, welches wir in der Von Kossa Färbung von osteogen differenzierten Zellen erhielten. Hier wird das Hydroxylapatit, welches von Osteoblasten produziert wird, schwarz gefärbt. In der Von Kossa Färbung der osteogen differenzierten Zellen zeigte sich eine deutliche Schwarzfärbung, es war also mutmaßlich Hydroxylapatit gebildet worden, was nahelegt, dass eine osteogene Differenzierung der MSC zu Osteoblasten stattgefunden hatte. Dass in der Untersuchung

per PCR jedoch kein signifikanter Anstieg der osteogenen Markergene zu verzeichnen gewesen war, ließe sich beispielsweise durch die unterschiedliche Dauer der Inkubation im Medium für die osteogene Differenzierung erklären: Die Untersuchung auf osteogene Markergene per PCR erfolgte bereits nach nur 7-tägiger Differenzierung während die histochemische Untersuchung (Von Kossa-Färbung) erst nach 28-tägiger Differenzierung durchgeführt wurde. Die Entscheidung die PCR bereits nach nur 7-tägiger Differenzierung der Zellen durchzuführen, war getroffen worden, da sich in früheren Arbeiten der Forschergruppe gezeigt hatte, dass eine Isolierung der RNA für die Durchführung einer PCR bei zu fortgeschrittener Osteogenese der Zellen nicht mehr möglich war. Zudem wäre es denkbar, dass sich bei höherer Probenanzahl signifikante Ergebnisse bei Untersuchung auf die osteogenen Markergene Osteopontin und Runx2 ergeben könnten.

In präklinischen Studien zur Untersuchung von ADSC als weitere Quelle regenerativ kompetenter Zellen, stellte man sich allerdings bereits vor langem die Frage ob ADSC dasselbe osteogene Differenzierungspotential mit sich bringen wie beispielsweise bmMSC (Im et al., 2005). Es bestehen Daten, die nahelegen, dass MSC aus Knochenmark sich effizienter osteogen differenzieren lassen, während sich MSC aus Fettgewebe besser adipogen differenzieren lassen (Liu et al., 2007). Auf die Thematik Heterogenität unter MSC, bspw. abhängig vom Ursprungsgewebe, wird unter 4.4 weiter eingegangen.

Die Expression des myogenen Markergens Transgelin war an Tag 14 der myogenen Differenzierung signifikant höher als zu Beginn der Differenzierung an Tag 0 während jedoch die Expression des myogenen Markergens Myh11 an Tag 14 der myogenen Differenzierung nicht signifikant höher war als zu Beginn der Differenzierung an Tag 0. Ursächlich schien hier allerdings die hohe Messwertstreuung zu sein, bei näherer Betrachtung der Ergebnisse ließ sich durchaus eine Tendenz zur Zunahme der relativen Expression von Myh11 erkennen. Hier wäre zu prüfen ob durch Erhöhung der Probenanzahl signifikante Ergebnisse zu erhalten wären. Eine Erklärung könnte zudem in der Plastizität bzw. den verschiedenen Stadien der Myogenese liegen, so zählt Transgelin zu den frühen Markergenen während Myh11 zu den späten Markergenen der Myogenese zählt und eher vom s.g. kontraktilen Phänotyp der Myozyten exprimiert wird (Alexander and Owens, 2012, Owens et al., 2004, Rensen et al., 2007). Unter

Einbeziehung dieser Aspekte, kann davon ausgegangen werden, dass die 14-tägige Kultur in dem in dieser Arbeit eingesetzten Medium für die myogene Differenzierung (s. 2.1.5) eine erfolgreiche Myogenese der aus humanem Biopsiematerial (Fettgewebe) gewonnenen definierten Zellen induziert. Um dies zu verifizieren, wäre eine weiterführende Untersuchung auf entsprechende Proteine (z.B. Calponin), beispielsweise per Westernblot, sinnvoll. Möglich wäre jedoch auch, dass die durch 14-tägige Inkubation im entsprechenden Differenzierungsmedium aus MSC generierten Myozyten noch nicht den voll ausgeprägten kontraktilen Phänotyp aufweisen (s.o.). Eine Untersuchung der Kontraktilität, wie zum Beispiel von Guo et. al beschrieben (2013) oder elektrophysiologische Untersuchungen, wie sie von Mitgliedern der Forschergruppe bereits durchgeführt wurden (Brun et al., 2015), könnten Aufschluss geben.

Des Weiteren wurde das Genexpressionsprofil der Zellen nach Expansion in verschiedenen Medien (GMP S-, GMP S+, GMP P+) und anschließender 14-tägiger Kultur in myogenem Differenzierungsmedium untersucht. Unabhängig vom zuvor verwendeten Expansionsmedium erhielten wir folgende Ergebnisse: In der Expression der untersuchten Markergene bestanden signifikante Unterschiede. Die Expression von Transgelin und Osteopontin war signifikant höher als die der restlichen Markergene. Die Expression von Transgelin und Osteopontin selbst war knapp nicht signifikant unterschiedlich. Dass die Expression des myogenen Markergens Transgelin signifikant höher war als die des zweiten untersuchten myogenen Markergens Myh11 deckt sich mit den o.g. Ergebnissen der Einzeluntersuchungen. Ein möglicher Erklärungsansatz liegt hier beispielsweise in der Plastizität von Myozyten (s.o.). Kritisch zu betrachten ist jedoch, dass die Expression des osteogenen Markergens Osteopontin ebenso hoch zu sein schien wie die Expression von Transgelin. Man muss also annehmen, dass die Kultur im myogenen Differenzierungsmedium ebenso eine Myogenese wie auch eine Osteogenese der Zellen verursachte. Sinnvoll wäre jedoch, eine Untersuchung der Genexpressionsprofile an Tag 0 der myogenen Differenzierung zu ergänzen, um zu klären ob bereits nach Expansion der Zellen ein ähnliches Genexpressionsprofil vorlag oder dieses durch die Kultur im myogenen Differenzierungsmedium entstand. Zudem wäre zu untersuchen weshalb mit Osteopontin eines der beiden untersuchten osteogenen Markergene stark exprimiert wurde, während die Expression des zweiten untersuchten osteogenen Markergens Runx2 signifikant geringer war.

### 4.3 Vergleich verschiedener Expansionsmedien

Ein Einfluss der verschiedenen Expansionsmedien (GMP P+, GMP S+, GMP S-) war in keiner der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zu erkennen. So konnten weder Unterschiede in der Expression von Oberflächenantigenen noch in der Expression von Markergenen nach entsprechender Differenzierung festgestellt werden.

In früheren Arbeiten der Forschergruppe war der Einfluss der o.g. verschiedenen Expansionsmedien auf die Expression von Oberflächenantigenen und die Differenzierungsfähigkeit von aus Knochenmark isolierten MSC untersucht worden (Brun et al., 2016). Hier hatte sich gezeigt, dass sich hinsichtlich der Oberflächenantigene keine statistisch relevanten Unterschiede ergaben, mit Ausnahme der Expression von CD146, die nach Expansion in Plättchenlysathaltigem Medium signifikant erhöht war. Zudem war die Expression der frühen myogenen Markergene ACTA-2 und Transgelin signifikant gesteigert, wenn die Differenzierung nach vorheriger Expansion in Plättchenlysathaltigem Expansionsmedium erfolgte (im Vergleich zur Differenzierung nach vorheriger Expansion in Medium *ohne* Plättchenlysathaltigem). Dasselbe traf für das späte myogene Markergene Myh11 zu, wobei hier die am deutlichsten gesteigerte Expression nach Expansion im S+ Medium (Serum+Plättchenlysathaltigem) zu verzeichnen war. Die Wahl des Expansionsmediums war im Falle von aus Knochenmark isolierten MSC also von Bedeutung, die Anwesenheit von Plättchenlysathaltigem im Expansionsmedium schien die anschließende myogene Differenzierung zu begünstigen.

Mojica-Henshaw et al. untersuchten wiederum 2013 den Einfluss verschiedener Expansionsmedien (Serum+Plättchenlysathaltigem vs. Plasma+Plättchenlysathaltigem) auf die Expression der Oberflächenantigene sowie das Differenzierungspotential von MSC. Ein signifikanter Unterschied konnte, wie in der hier vorliegenden Arbeit, nicht festgestellt werden. Allerdings wurde hier ein Expansionsmedium ohne Plättchenlysathaltigem nicht mitberücksichtigt.

Wie lassen sich nun solch teilweise divergenten Ergebnisse erklären?

#### 4.4 Ansatz „Heterogenität unter MSC“ und Ausblick

„MSC sind nicht gleich MSC.“

Viele Studiendaten liegen vor, die zeigen, dass Unterschiede zwischen verschiedenen MSC-Populationen bestehen.

Diese Heterogenität ließe sich beispielsweise erklären durch die anatomisch verschiedenen Ursprungsregionen der MSC. So wurden bereits vor einigen Jahren Unterschiede zwischen MSC aus Knochenmark und MSC aus Fettgewebe oder Nabelschnurgewebe erkannt (Jansen et al., 2010).

Torensma et al. nahmen sich der Thematik „Heterogenität unter MSC“ mit ihrer Studie aus dem Jahre 2013 an und stellten fest, dass die verschiedenen Gewebe, aus denen MSC isoliert werden, den größten Einfluss auf die Heterogenität haben; gefolgt von verschiedenen Aufbereitungsmethoden. Die Individualität der Spender schien sowohl in der von Torensma et al. wie auch in der von Jansen et al. durchgeführten Studie keinen signifikanten Einfluss auf die Heterogenität zu nehmen.

Denkbar wäre im Falle der MSC aus Fettgewebe, dass die Lokalisation des Fettgewebes selbst eine Rolle spielt. Iwen et al. widmeten sich dieser Thematik in einem Vergleich von subkutanem Fettgewebe glutealer vs. abdominaler Herkunft und erkannten Unterschiede bezüglich der Differenzierungsfähigkeit dieser Fettgewebe anatomisch verschiedener Regionen (2014). Genauso sahen auch Li et al. (2018) einen Unterschied zwischen MSC aus subkutanem Fettgewebe der Hüfte und MSC aus subkutanem Fettgewebe des Bauches.

In der vorliegenden Arbeit wurden fast ausschließlich MSC aus perirenalem Fettgewebe untersucht. An dieser Stelle soll erwähnt werden, dass im Hinblick auf eine spätere routinemäßige Verwendung von MSC wohl kaum das perirenale Fettgewebe die optimale Quelle darstellen wird. Praktikabler erscheint hier die Isolation von MSC aus Fettgewebe, welches im Rahmen einer Liposuktion gewonnen wird.

Eine Studie, die MSC aus Material einer Liposuktion mit MSC aus Lipektomie-Gewebe vergleicht (Bian et al., 2016) zeigte jedoch, dass sich aus Lipektomie-Gewebe eine höhere

Anzahl lebensfähiger MSC isolieren ließ und die Apoptose-Rate im Vergleich zu MSC aus Liposuktionsmaterial deutlich geringer war.

Weitere Studien wären nötig, die sich der GMP-konformen Differenzierung von MSC aus Liposuktionsmaterial widmen. Für unsere Zwecke besonders von Bedeutung wäre die Untersuchung im Hinblick auf die myogene Differenzierungsfähigkeit.

Des Weiteren wird, wie oben erwähnt, davon ausgegangen, dass verschiedene Aufbereitungsmethoden inkl. verschiedener Expansions- oder Differenzierungsmedien und eine unterschiedliche Anzahl an Passagen großen Einfluss auf die Heterogenität haben. So zeigten sich auch in vorherigen Arbeiten unserer Forschergruppe, dass die Wahl des Expansionsmediums Einfluss auf die Differenzierungsfähigkeit von aus Knochenmark isolierten MSC nahm (s.o.). In der vorliegenden Arbeit, die sich dieser Thematik im Falle von aus Fettgewebe isolierten MSC widmete, konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede, verursacht durch unterschiedliche Expansionsmedien, festgestellt werden.

Es stellt sich nun folgende Frage: Wie kann es sein, dass die Wahl des Expansionsmediums bei aus Knochenmark isolierten MSC von Bedeutung ist, während es bei aus Fettgewebe isolierten MSC nicht von Bedeutung zu sein scheint?

„Es sind nicht alle Zellen innerhalb einer MSC-Population gleich.“

Dass es sich bei MSC-Populationen nicht um homogene Zellpopulationen handelt, zeigte sich bereits in vorherigen Studien von Mitgliedern unserer Forschergruppe (Sivasubramanian et al., 2012, Elahi et al., 2016) und auch in den durchflusszytometrischen Untersuchungen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, war diese Inhomogenität von MSC-Populationen bzw. Subpopulationen zu erkennen (s. 3.1.3).

Bei einer heterogenen MSC-Population erscheint es plausibel, dass sich durch Einsatz verschiedener Medien einzelne Subpopulationen herauskristallisieren könnten. So könnte es sich unter Umständen bei MSC aus Knochenmark um Populationen mit größerer Heterogenität handeln. Folglich könnte durch unterschiedliche Medien auch die

Expansion unterschiedlicher Subpopulationen gefördert werden. Am Ende ergäben sich Unterschiede bzgl. der Genexpression, je nach Einsatz des Expansionsmediums.

Sollte es sich bei ADSC nun generell um homogenere MSC-Populationen handeln, so ist auch ein Herauskristallisieren unterschiedlicher Subpopulationen, durch Einsatz unterschiedlicher Medien, und eine Differenz in der Expression von Oberflächenantigenen und Markergenen weniger wahrscheinlich.

Insgesamt ist plausibel, dass für unterschiedliche Verwendungszwecke von MSC ebenso unterschiedliche MSC-Quellen, Aufbereitungsmethoden, Expansions- bzw. Differenzierungsmedien gewählt werden könnten. Je nach vorgesehenem Verwendungszweck wäre es zum Beispiel bei ausreichendem Material nach Durchführung einer Liposuktion, möglich, auf eine Expansion der MSC über mehrere Passagen zu verzichten. Außerdem wäre sogar die Wahl einer bestimmten Subpopulation denkbar und wurde bereits von Mitgliedern der Forschergruppe diskutiert (Elahi et al., 2016).

Für die Therapie der Harninkontinenz wäre beispielsweise ein vergleichsweise niedriges osteogenes Differenzierungspotential von Vorteil, möchte man doch eine Osteogenese von in den Harnblasensphinkter injizierten MSC vermeiden. Bei Analyse des Genexpressionsprofils nach 14-tägiger „myogener Differenzierung“ der hier untersuchten MSC aus perirenalem Fettgewebe, hatte sich die Expression des myogenen Markergens Transgelin und die Expression des osteogenen Markergens Osteopontin nicht signifikant unterschieden. Hier sollten deshalb noch weitere Untersuchungen folgen um eine optimale Myogenese von MSC aus Fettgewebe erreichen zu können. Kann das myogene Differenzierungsmedium noch optimiert werden? Könnten MSC aus Fettgewebe anderen anatomischen Ursprungs eine geringere „Osteogenese-Bereitschaft“ mit sich bringen?

Es erscheint also sinnvoll und notwendig, für jeden klinischen Verwendungszweck genau und individuell zu überprüfen welche MSC-Quelle und welche Aufbereitungsmethode inkl. Expansions- bzw. Differenzierungsmedium am besten geeignet ist.

Beachtet werden muss, dass die Isolierung und Expansion der MSC in dieser Studie in GMP-konformem Medium erfolgte während für die Differenzierung herkömmliche

Medien eingesetzt wurden, welche tierische Bestandteile (FCS) enthielten. Somit wären weitere Experimente sinnvoll um zu untersuchen ob sich unter Einsatz von GMP-konformen Differenzierungsmedien ähnliche Ergebnisse erzielen ließen.

Auch alternative Methoden um eine myogene Differenzierung von MSC zu erreichen wären denkbar, so z.B. ein „Stretching“ von MSC anstelle der Inkubation in Differenzierungsmedium (Rothdiener et al., 2016). Sollte sich ferner in weiterführenden Untersuchungen zeigen, dass die durch Inkubation in herkömmlichem Differenzierungsmedium generierten Myozyten nicht den erwünschten kontraktile Phänotyp aufweisen (s.o.), so wäre evtl. auch eine Kombination beider Methoden, also der Einsatz von Differenzierungsmedium mit zusätzlichem Stretching, in Betracht zu ziehen.

Forschungsbedarf bzgl. des Therapieansatzes für die Harninkontinenz besteht ferner darin, ob das Einbringen von bereits myogen differenzierten MSC allein die optimale Therapieform darstellt. Wie bereits oben beschrieben, weisen Myozyten eine gewisse Plastizität auf und könnten folglich auch noch in situ ihren Phänotyp verändern. Genauso stellt die Migration von in den Sphinkter injizierten Myozyten einen den Therapieerfolg bedrohenden Aspekt dar. Erstrebenswert wäre es also, ein für Myozyten optimales Milieu zu schaffen. So könnte die Myogenese von eingebrachten MSC gefördert bzw. stabilisiert und eine Migration in umliegendes Gewebe verhindert werden. Hier würde das Einbringen von MSC gemeinsam mit entsprechenden Signalstoffen einen interessanten Ansatz bieten.

Sogar das Einbringen unbehandelter, d.h. nicht (myogen) differenzierter MSC in das periurethrale Gewebe kann über die Freisetzung von Zytokinen die Durchblutung und Zellregeneration anregen. Wie unter 1.3 bereits beschrieben, zeigt eine kürzlich veröffentlichte Studie (Gotoh et al., 2019), dass auf diesem Wege die Kontinenz langfristig verbessert werden kann. Von Vorteil ist, dass es sich hier um einen stark vereinfachten Prozess handelt: Es werden autologe MSC aus Fettgewebe verwendet; auf eine vorherige Kultur der Zellen kann verzichtet werden.

Es bestehen also noch mannigfaltige Möglichkeiten, um den Einsatz von MSC im Rahmen der Therapie der Harninkontinenz zu optimieren bzw. erfolgreich zu

verwirklichen. In diesem Sinne möchte ich mit den Worten Novalis` (Georg Philipp Friedrich Leopold Freiherr von Hardenberg, 1772-1801) schließen, die auch heute nichts an Aktualität eingebüßt haben: „Wie Kopernikus machen`s alle guten Forscher, Ärzte und Beobachter und Denker: sie drehn die Data und die Methode um, um zu sehn, ob`s da nicht besser geht.“

## 5. Zusammenfassung

Von einer Harninkontinenz ist ein großer Anteil der Bevölkerung betroffen. Die bislang etablierten Therapieformen erzielen in vielen Fällen nur eine unzureichende Symptomreduktion. Durch eine zellbasierte Regeneration des Blasenschließmuskels könnte Harninkontinenz ursächlich und minimalinvasiv therapiert werden.

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen ob mesenchymale Stromazellen aus Fettgewebe, welches eine leicht zugängliche Quelle darstellt, für die zellbasierte regenerative Therapie der Harninkontinenz geeignet sind.

Es wurden Zellen aus humanem Fettgewebe in drei verschiedenen GMP-konformen Medien expandiert und zellbiologisch charakterisiert. Die Zellen wiesen die typischen MSC-Charakteristika auf. Durch Kultur in entsprechendem Differenzierungsmedium konnte eine Adipogenese der MSC induziert werden. Bezüglich der Osteogenese waren die Ergebnisse nicht eindeutig. Die zytochemischen Färbungen lieferten Hinweise auf eine Osteogenese während die Ergebnisse der qRT-PCR dem widersprachen. Ursächlich könnte hier die unterschiedlich lange Differenzierungszeit sein. Möglicherweise zeigen MSC aus Fettgewebe ein niedrigeres osteogenes Differenzierungspotential als beispielsweise MSC aus Knochenmark. Nach in vitro Myogenese war ein signifikanter Anstieg des myogenen Markergens Transgelin zu verzeichnen, nicht jedoch für Myh11.

Weiterer Forschungsbedarf besteht auch noch darin, alle Protokolle von der Isolation über die Expansion und Differenzierung als effiziente GMP-konforme Prozesse zu gestalten.

Bezüglich der verschiedenen in dieser Arbeit eingesetzten GMP-konformen Expansionsmedien zeigte sich, dass es nicht von Bedeutung war, welches der drei Medien verwendet worden war. Ein Einfluss auf den Phänotyp und die Differenzierungsfähigkeit konnte nicht festgestellt werden.

Aktuellen Studien zufolge kann ein langfristiger Therapieerfolg sogar durch die periurethrale Injektion von autologen Stammzellen aus Fettgewebe erzielt werden, ohne dass diese zuvor expandiert oder differenziert werden (Gotoh et al., 2019). Dies bietet sicherlich eine interessante Alternative.

## 6. Literaturverzeichnis

- ABRAMS, P., CARDOZO, L., FALL, M., GRIFFITHS, D., ROSIER, P., ULMSTEN, U., VAN KERREBROECK, P., VICTOR, A., WEIN, A. & STANDARDISATION SUB-COMMITTEE OF THE INTERNATIONAL CONTINENCE, S. 2003. The standardisation of terminology in lower urinary tract function: report from the standardisation sub-committee of the International Continence Society. *Urology*, 61, 37-49.
- ADEGANI, F. J., LANGROUDI, L., AREFIAN, E., SHAFIEE, A., DINARVAND, P. & SOLEIMANI, M. 2013. A comparison of pluripotency and differentiation status of four mesenchymal adult stem cells. *Mol Biol Rep*, 40, 3693-703.
- AICHER, W. K., HART, M. L., STALLKAMP, J., KLUNDER, M., EDERER, M., SAWODNY, O., VAEGLER, M., AMEND, B., SIEVERT, K. D. & STENZL, A. 2014. Towards a Treatment of Stress Urinary Incontinence: Application of Mesenchymal Stromal Cells for Regeneration of the Sphincter Muscle. *J Clin Med*, 3, 197-215.
- ALEXANDER, M. R. & OWENS, G. K. 2012. Epigenetic control of smooth muscle cell differentiation and phenotypic switching in vascular development and disease. *Annu Rev Physiol*, 74, 13-40.
- AMORIN, B., ALEGRETTI, A. P., VALIM, V., PEZZI, A., LAUREANO, A. M., DA SILVA, M. A., WIECK, A. & SILLA, L. 2014. Mesenchymal stem cell therapy and acute graft-versus-host disease: a review. *Hum Cell*, 27, 137-50.
- AUMÜLLER, G., AUST, G., DOLL, A., ENGELE, J., KIRSCH, J., MENSE, S., REIßIG, D., SALVETTER, J., SCHMIDT, W., SCHMITZ, F., SCHULTE, E., SPANELBOROWSKI, K., WOLFF, W., WURZINGER, L. J. & ZILCH, H.-G. 2010. *Anatomie*, Stuttgart, Thieme.
- BIAN, Y., DENG, C., LI, W., LEI, Z., LI, Y. & LI, X. 2016. A Comparative Study on the Biological Characteristics of Human Adipose-Derived Stem Cells from Lipectomy and Liposuction. *PLoS One*, 11, e0162343.
- BILLING, A. M., BEN HAMIDANE, H., DIB, S. S., COTTON, R. J., BHAGWAT, A. M., KUMAR, P., HAYAT, S., YOUSRI, N. A., GOSWAMI, N., SUHRE, K., RAFII, A. & GRAUMANN, J. 2016. Comprehensive transcriptomic and proteomic characterization of human mesenchymal stem cells reveals source specific cellular markers. *Sci Rep*, 6, 21507.
- BRUN, J., ABRUZZESE, T., ROLAUFFS, B., AICHER, W. K. & HART, M. L. 2016. Choice of xenogenic-free expansion media significantly influences the myogenic differentiation potential of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, 18, 344-59.

- BRUN, J., LUTZ, K. A., NEUMAYER, K. M., KLEIN, G., SEEGER, T., UYNUK-OOL, T., WORGOTTER, K., SCHMID, S., KRAUSHAAR, U., GUENTHER, E., ROLAUFFS, B., AICHER, W. K. & HART, M. L. 2015. Smooth Muscle-Like Cells Generated from Human Mesenchymal Stromal Cells Display Marker Gene Expression and Electrophysiological Competence Comparable to Bladder Smooth Muscle Cells. *PLoS One*, 10, e0145153.
- CRAS, A., FARGE, D., CARMOI, T., LATAILLADE, J. J., WANG, D. D. & SUN, L. 2015. Update on mesenchymal stem cell-based therapy in lupus and scleroderma. *Arthritis Res Ther*, 17, 301.
- DE MUTH, J. E. 2006. *Basic Statistics and pharmaceutical statistical applications*, Chapman & Hall/CRC.
- DENU, R. A., NEMCEK, S., BLOOM, D. D., GOODRICH, A. D., KIM, J., MOSHER, D. F. & HEMATTI, P. 2016. Fibroblasts and Mesenchymal Stromal/Stem Cells Are Phenotypically Indistinguishable. *Acta Haematol*, 136, 85-97.
- DOMINICI, M., LE BLANC, K., MUELLER, I., SLAPER-CORTENBACH, I., MARINI, F., KRAUSE, D., DEANS, R., KEATING, A., PROCKOP, D. & HORWITZ, E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8, 315-317.
- ELAHI, K. C., KLEIN, G., AVCI-ADALI, M., SIEVERT, K. D., MACNEIL, S. & AICHER, W. K. 2016. Human Mesenchymal Stromal Cells from Different Sources Diverge in Their Expression of Cell Surface Proteins and Display Distinct Differentiation Patterns. *Stem Cells Int*, 2016, 5646384.
- EOM, Y. W., SHIM, K. Y. & BAIK, S. K. 2015. Mesenchymal stem cell therapy for liver fibrosis. *Korean J Intern Med*, 30, 580-9.
- FRASER, J. K., WULUR, I., ALFONSO, Z. & HEDRICK, M. H. 2006. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol*, 24, 150-4.
- GOTOH, M., YAMAMOTO, T., SHIMIZU, S., MATSUKAWA, Y., KATO, M., MAJIMA, T., TAKAI, S., FUNAHASHI, Y. & TORIYAMA, K. 2019. Treatment of male stress urinary incontinence using autologous adipose-derived regenerative cells: Long-term efficacy and safety. *Int J Urol*, 26, 400-405.
- GRONTHOS, S., FRANKLIN, D. M., LEDDY, H. A., ROBEY, P. G., STORMS, R. W. & GIMBLE, J. M. 2001. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol*, 189, 54-63.
- GUO, X., STICE, S. L., BOYD, N. L. & CHEN, S. Y. 2013. A novel in vitro model system for smooth muscle differentiation from human embryonic stem cell-derived mesenchymal cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 304, C289-98.

- GUO, Y., CHEN, B., CHEN, L. J., ZHANG, C. F. & XIANG, C. 2016. Current status and future prospects of mesenchymal stem cell therapy for liver fibrosis. *J Zhejiang Univ Sci B*, 17, 831-841.
- HUNSKAAR, S. & VINSNES, A. 1991. The quality of life in women with urinary incontinence as measured by the sickness impact profile. *J Am Geriatr Soc*, 39, 378-82.
- IM, G. I., SHIN, Y. W. & LEE, K. B. 2005. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *Osteoarthritis Cartilage*, 13, 845-53.
- IRWIN, D. E., KOPP, Z. S., AGATEP, B., MILSOM, I. & ABRAMS, P. 2011. Worldwide prevalence estimates of lower urinary tract symptoms, overactive bladder, urinary incontinence and bladder outlet obstruction. *BJU Int*, 108, 1132-8.
- IRWIN, D. E., MILSOM, I., HUNSKAAR, S., REILLY, K., KOPP, Z., HERSCHORN, S., COYNE, K., KELLEHER, C., HAMPEL, C., ARTIBANI, W. & ABRAMS, P. 2006. Population-based survey of urinary incontinence, overactive bladder, and other lower urinary tract symptoms in five countries: results of the EPIC study. *Eur Urol*, 50, 1306-14; discussion 1314-5.
- IRWIN, D. E., MUNGAPEN, L., MILSOM, I., KOPP, Z., REEVES, P. & KELLEHER, C. 2009. The economic impact of overactive bladder syndrome in six Western countries. *BJU Int*, 103, 202-9.
- IWEN, K. A., PRIEWE, A. C., WINNEFELD, M., ROSE, C., SIEMERS, F., ROHWEDEL, J., CAKIROGLU, F., LEHNERT, H., SCHEPKY, A., KLEIN, J. & KRAMER, J. 2014. Gluteal and abdominal subcutaneous adipose tissue depots as stroma cell source: gluteal cells display increased adipogenic and osteogenic differentiation potentials. *Exp Dermatol*, 23, 395-400.
- JANSEN, B. J., GILISSEN, C., ROELOFS, H., SCHAAP-OZIEMLAK, A., VELTMAN, J. A., RAYMAKERS, R. A., JANSEN, J. H., KOGLER, G., FIGDOR, C. G., TORENSMA, R. & ADEMA, G. J. 2010. Functional differences between mesenchymal stem cell populations are reflected by their transcriptome. *Stem Cells Dev*, 19, 481-90.
- JONSSON FUNK, M., SIDDIQUI, N. Y., KAWASAKI, A. & WU, J. M. 2012. Long-term outcomes after stress urinary incontinence surgery. *Obstet Gynecol*, 120, 83-90.
- LI, J., YANG, L., PU, C., TANG, Y., YUN, H. & HAN, P. 2013. The role of duloxetine in stress urinary incontinence: a systematic review and meta-analysis. *Int Urol Nephrol*, 45, 679-86.
- LI, W., ZHANG, Y., CHEN, C., TIAN, W. & WANG, H. 2018. Increased Angiogenic and Adipogenic Differentiation Potentials in Adipose-Derived Stromal Cells from Thigh Subcutaneous Adipose Depots Compared with Cells from the Abdomen. *Aesthet Surg J*.

- LIN, C. S., NING, H., LIN, G. & LUE, T. F. 2012. Is CD34 truly a negative marker for mesenchymal stromal cells? *Cytotherapy*, 14, 1159-63.
- LISINI, D., NAVA, S., POGLIANI, S., AVANZINI, M. A., LENTA, E., BEDINI, G., MANTELLI, M., PECCIARINI, L., CROCE, S., BONCORAGLIO, G., MACCARIO, R., PARATI, E. A. & FRIGERIO, S. 2018. Adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells for clinical application: An efficient isolation approach. *Curr Res Transl Med*.
- LIU, T. M., MARTINA, M., HUTMACHER, D. W., HUI, J. H., LEE, E. H. & LIM, B. 2007. Identification of common pathways mediating differentiation of bone marrow- and adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells into three mesenchymal lineages. *Stem Cells*, 25, 750-60.
- MILSOM, I., COYNE, K. S., NICHOLSON, S., KVASZ, M., CHEN, C. I. & WEIN, A. J. 2014. Global prevalence and economic burden of urgency urinary incontinence: a systematic review. *Eur Urol*, 65, 79-95.
- MITCHELL, J. B., MCINTOSH, K., ZVONIC, S., GARRETT, S., FLOYD, Z. E., KLOSTER, A., DI HALVORSEN, Y., STORMS, R. W., GOH, B., KILROY, G., WU, X. & GIMBLE, J. M. 2006. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells*, 24, 376-85.
- MOJICA-HENSHAW, M. P., JACOBSON, P., MORRIS, J., KELLEY, L., PIERCE, J., BOYER, M. & REEMS, J. A. 2013. Serum-converted platelet lysate can substitute for fetal bovine serum in human mesenchymal stromal cell cultures. *Cytotherapy*, 15, 1458-68.
- NYARANGI-DIX, J. N., SCHULTZ-LAMPEL, D., HOHENFELLNER, U., HUBER, J., HATIBOGLU, G., DJAKOVIC, N., HAFERKAMP, A. & HOHENFELLNER, M. 2010. [Conservative management of postoperative urinary incontinence in men]. *Urologe A*, 49, 498-503.
- OWENS, G. K., KUMAR, M. S. & WAMHOFF, B. R. 2004. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev*, 84, 767-801.
- RENN, H. 1975. *Nichtparametrische Statistik*, B.G. Teubner Stuttgart.
- RENSSEN, S. S., DOEVENDANS, P. A. & VAN EYS, G. J. 2007. Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Neth Heart J*, 15, 100-8.
- RICHTER, H. E., BURGIO, K. L., BRUBAKER, L., NYGAARD, I. E., YE, W., WEIDNER, A., BRADLEY, C. S., HANDA, V. L., BORELLO-FRANCE, D., GOODE, P. S., ZYCZYNSKI, H., LUKACZ, E. S., SCHAFFER, J., BARBER, M., MEIKLE, S., SPINO, C. & PELVIC FLOOR DISORDERS, N. 2010. Continence pessary compared with behavioral therapy or combined therapy for stress incontinence: a randomized controlled trial. *Obstet Gynecol*, 115, 609-17.

- ROTHDIENER, M., HEGEMANN, M., UYNUK-OOL, T., WALTERS, B., PAPUGY, P., NGUYEN, P., CLAUS, V., SEEGER, T., STOECKLE, U., BOEHME, K. A., AICHER, W. K., STEGEMANN, J. P., HART, M. L., KURZ, B., KLEIN, G. & ROLAUFFS, B. 2016. Stretching human mesenchymal stromal cells on stiffness-customized collagen type I generates a smooth muscle marker profile without growth factor addition. *Sci Rep*, 6, 35840.
- SIVASUBRAMANIYAN, K., LEHNEN, D., GHAZANFARI, R., SOBIESIAK, M., HARICHANDAN, A., MORTHA, E., PETKOVA, N., GRIMM, S., CERABONA, F., DE ZWART, P., ABELE, H., AICHER, W. K., FAUL, C., KANZ, L. & BUHRING, H. J. 2012. Phenotypic and functional heterogeneity of human bone marrow- and amnion-derived MSC subsets. *Ann N Y Acad Sci*, 1266, 94-106.
- TORENSMA, R., PRINS, H. J., SCHRAMA, E., VERWIEL, E. T., MARTENS, A. C., ROELOFS, H. & JANSEN, B. J. 2013. The impact of cell source, culture methodology, culture location, and individual donors on gene expression profiles of bone marrow-derived and adipose-derived stromal cells. *Stem Cells Dev*, 22, 1086-96.
- WOOD, L. N. & ANGER, J. T. 2014. Urinary incontinence in women. *BMJ*, 349, g4531.

## **7. Erklärungen zum Eigenanteil**

Die Arbeit wurde in der Universitätsklinik für Urologie, Tübingen, unter Betreuung von Prof. Dr. Wilhelm Aicher durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Wilhelm Aicher.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Labormitglieder (insb. Tanja Abruzzese) von mir eigenständig durchgeführt. In Einzelfällen (bei Abwesenheit / Krankheit) erfolgte eine Vertretung durch Labormitglieder (insb. Tanja Abruzzese, Juliane Brun und Kourosch Elahi).

Die statistische Auswertung erfolgte, nach Beratung durch Dr. Manfred Müller, durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Weilheim a. d. Teck, den 23.12.2020

## **Danksagung**

Meinen Dank möchte ich zu allererst meinem Doktorvater Prof. Dr. Wilhelm Aicher aussprechen, der mir diese Promotion ermöglicht hat und mir bis zuletzt in allen Angelegenheiten mit Rat und Tat zur Seite stand.

Dank seines Engagements war außerdem die Teilnahme am IZKF Promotionskolleg, Tübingen, möglich. Auch bei den Mitgliedern des IZKF Promotionskollegs möchte ich mich recht herzlich für die hilfreiche Unterstützung und große Expertise bedanken. Im Rahmen des Stipendiums war es uns zudem sogar möglich gewesen den eindrucksvollen „TERMIS World Congress“ in Boston, USA zu besuchen und dort aktiv an einer Poster Session teilzunehmen.

Für das Teilhabenlassen an ihrem Wissen und die freundliche Unterstützung insbesondere bei den Arbeiten im Zellkulturlabor möchte ich allen Mitgliedern der Forschergruppe, allen voran Tanja Abruzzese, danken.

Ein besonderer Dank gilt auch dem Team der Universitätsklinik für Urologie, unter der Leitung von Prof. Dr. A. Stenzl, für die Gewinnung von Probenmaterial und entsprechend natürlich den Patienten, deren Proben ich für diese wissenschaftliche Arbeit verwenden durfte.

Die Arbeiten der Forschergruppe wurden außerdem gefördert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (KFO273).

Für die seelische und moralische Unterstützung und den großen Rückhalt danke ich meiner Mutter Elisabeth Müller und meinem Vater Dr. Manfred Müller, der mir zudem in der statistischen Auswertung der Ergebnisse dieser Arbeit eine große Stütze war; sowie meinen Brüdern Matthias Müller, der mein Notebook generalüberholen und so für das Verfassen dieser Arbeit tauglich machen konnte, und Dr. Sebastian Müller mit seiner Frau Dr. Johanna Müller - auch für die Expertise bzgl. medizinischer Promotionen. Ebenso gilt mein Dank meinem Partner Florian Schumayer für die alltägliche Unterstützung in Form von Technik-Support, Verpflegung und Motivation zur Fertigstellung der Arbeit sowie für das „Zurückstecken“, wenn gemeinsame Unternehmungen zugunsten der Doktorarbeit

hintenangestellt wurden. Zu guter Letzt danke ich auch meinen lieben Freunden, die mir in allen Lebenslagen eine wertvolle Stütze sind – von dem viel gehörten Satz „Ich muss Doktorarbeit schreiben“ dürft ihr euch nun verabschieden!