

Aus der
Universitätsklinik für Urologie Tübingen

**Etablierung einer neuen Methode zur nadellosen
Injektion von Myoblasten in den Harnröhren-
Verschlussapparat am Großtiermodell der
Blaseninkontinenz**

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

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

**vorgelegt von
Rothfuß, Vera
2021**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. W. K. Aicher

2. Berichterstatter: Professor Dr. U. K. Hofmann

Tag der Disputation: 19.02.2020

Inhaltsverzeichnis

1	Abbildungsverzeichnis	6
2	Abkürzungsverzeichnis	11
3	Einleitung.....	12
3.1	Belastungsinkontinenz	12
3.2	Progenitor- und Stammzellen	14
3.3	Marker für muskuläre Progenitorzellen (MPCs).....	15
3.4	Zellbasierte Therapie der Belastungsinkontinenz	16
3.5	Beispiele für zellbasierte Therapien	18
3.6	Wasserstrahltechnik.....	18
4	Material und Methoden	21
4.1	Material	21
4.1.1	Reagenzien	21
4.1.2	Geräte	24
4.2	Zellkultur und Medien.....	27
4.2.1	Medienherstellung	27
4.2.2	Passagieren	30
4.2.3	Gelatinebeschichtung	30
4.2.4	Kollagenbeschichtung.....	30
4.2.5	Zellen einfrieren.....	31
4.2.6	Zellen auftauen.....	31
4.3	Bestimmung der Zellzahl.....	32
4.4	Isolierung von porcinen Muskelprogenitorzellen (sMPC) aus porciner Skelettmuskulatur	32
4.4.1	Methode 1	32
4.4.2	Methode 2	33
4.5	Proliferationskurven der isolierten porcinen Muskelprogenitorzellen ..	34
4.6	Durchflusszytometrie (FACS).....	34
4.7	Adipogene und osteogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen.....	36
4.8	Polymerasekettenreaktion (PCR)	37
4.8.1	Efficiency der Primer.....	37

4.8.2	Polymerasekettenreaktion der isolierten porcinen Muskelprogenitor-zellen.....	38
4.9	Größenbestimmung der porcinen Muskelprogenitorzellen via CASY .	39
4.10	Immunfluoreszenzfärbung.....	39
4.10.1	Wahl der Zellkulturkammern und Beschichtung.....	39
4.10.2	Paraformaldehyd-Fixierung	40
4.10.3	Methanol-Fixierung.....	40
4.10.4	Antikörper-Färbung	41
4.11	PKH26-Färbung.....	42
4.12	Versuchsaufbau Sprühversuch in Medium.....	42
4.13	Versuchsaufbau Sprühversuch in porcines Kadavergewebe.....	43
4.14	Mikroskopie.....	44
4.15	In Vivo Imaging System (IVIS)	44
4.16	Histologie des Kadavergewebes	45
5	Vorversuch zur Etablierung der Methodik	46
5.1	Injektion von humanen mesenchymalen Stammzellen in Kadavergewebe.....	46
5.1.1	PKH26-Markierung	46
5.1.2	Extraktion und Kolonisierung	46
5.1.3	Durchflusszytometrie der humanen mesenchymalen Stammzellreihe HNA vor und nach PKH26-Markierung und Sprühversuch in Kadavergewebe.....	50
5.1.4	Adipogene und osteogene Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen	52
5.2	PKH26-Markierung von humanen und porcinen Muskelprogenitorzellen (hMPCs) (hMPCs und sMPCs)	55
5.3	Immunfluoreszenzfärbung von porcinen Muskelprogenitorzellen	57
5.3.1	Wahl der Zellkulturkammern und Beschichtung	57
5.3.2	Fixierung der Zellen	62
5.3.3	Antikörper-Färbung der sMPC20 auf Chamber Slides aus Plastik mit unterschiedlichen Beschichtungen.....	66
6	Ergebnisse	69

6.1	Isolierung von porcinen Muskelprogenitorzellen aus porciner Skelettmuskulatur	69
6.2	Proliferationskurven	74
6.3	Größenbestimmung der porcinen Muskelprogenitorzellen via CASY .	75
6.4	Polymerasekettenreaktion (PCR)	76
6.4.1	Efficiency der Primer.....	76
6.4.2	Polymerasekettenreaktion der isolierten porcinen Muskelprogenitorzellen.....	77
6.5	Immunfluoreszenzfärbung.....	78
6.5.1	sMPC19.....	79
6.5.2	sMPC20.....	80
6.5.3	sMPC21.....	82
6.6	Injektion von porcinen Muskelprogenitorzellen in Medium.....	84
6.7	Injektion von porcinen Muskelprogenitorzellen in Kadavergewebe	86
6.7.1	Detektion der porcinen Muskelprogenitorzellen im Kadavergewebe via In Vivo Imaging System (IVIS)	87
6.7.2	Histologie des Kadavergewebe	88
7	Diskussion	94
7.1	Isolierung von porcinen Muskelprogenitorzellen aus porciner Skelettmuskulatur	94
7.2	Polymerasekettenreaktion.....	94
7.3	Immunfluoreszenzfärbung.....	96
7.4	Injektionsversuche in Medium mit unmarkierten Zellen	96
7.5	Injektionsversuche in Medium und Kadavergewebe mit PKH26-markierten Zellen	97
8	Zusammenfassung	99
9	Literaturverzeichnis	100
10	Erklärung zum Eigenanteil.....	104
11	Danksagung	105

1 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Injektion von humanen MSCs (hMSC) in porcines Kadavergewebe mit Williams-Nadel von Cook; aus eigenen Vorarbeiten, Daten der KFO 273 TP3	19
Abbildung 2: Wasserstrahlinjektion von Mikropartikeln mit 20µm Durchmesser in porcines Kadavergewebe; exemplarisch aus den Med. Dissertationsarbeiten von Johanna Schreiber, Florian Beck, den Masterarbeiten von Luise Jäger, Janet Xavier und den Bachelorarbeiten von Carolin Gillmann	20
Abbildung 3: Pipettier-Schema zur Efficiency-Bestimmung des Primers sMyoD1 bei 60°C	38
Abbildung 4: Pipettier-Schema zum Nachweis von muskulären Genen in den isolierten Zellen bei 60°C	39
Abbildung 5: porcine Blase nach Präparation für Zellinjektion	43
Abbildung 6: Water Jet von Erbe Elektromedizin GmbH - Versuchsaufbau.....	44
Abbildung 7: PKH26-markierte hMSCs der Reihe HNA 2h nach Markierung ..	46
Abbildung 8: extrahierte hMSCs der Reihe HNA nach Water Jet-Injektion in Kadavergewebe nach 1Tag	47
Abbildung 9: extrahierte hMSCs der Reihe HNA nach Water Jet-Injektion in Kadavergewebe nach 2Tagen	47
Abbildung 10: extrahierte hMSCs der Reihe HNA nach Water Jet-Injektion in Kadavergewebe nach 12Tagen	48
Abbildung 11: extrahierte hMSCs der Reihe HNA nach Water Jet-Injektion in Kadavergewebe nach 13Tagen ohne Fluoreszenz	48
Abbildung 12: extrahierte hMSCs der Reihe HNA nach Injektion mit Williams Nadel nach 1Tag.....	49
Abbildung 13: extrahierte hMSCs der Reihe HNA nach Injektion mit Williams Nadel nach 6Tagen.....	49
Abbildung 14: Auswertung der Durchflusszytometrie der nicht-injizierten hMSCs der Reihe HNA.....	51
Abbildung 15: Auswertung der Durchflusszytometrie der hMSCs der Reihe HNA nach Injektion mit Williams Nadel.....	51

Abbildung 16: Auswertung der Durchflusszytometrie der hMSCs der Reihe HNA nach Injektion mit Wasserstrahl	52
Abbildung 17: Kontrollfeld mit hMSCs der Reihe HNA ohne Zusatz von Differenzierungsmedium mit Oil Red-Färbung.....	53
Abbildung 18: hMSCs der Reihe HNA nach Zugabe von adipogenem Differenzierungsmedium mit Oil Red-Färbung.....	53
Abbildung 19: Kontrollfeld mit hMSCs der Reihe HNA ohne Zusatz von Differenzierungsmedium mit von Kossa-Färbung	54
Abbildung 20: hMSCs der Reihe HNA nach Zugabe von osteogenem Differenzierungsmedium mit von Kossa-Färbung	54
Abbildung 21: adipogene und osteogene Differenzierungsplatte der hMSCs der Reihe HNA	55
Abbildung 22: PKH26-markierte hMPCs 2h nach Markierung	55
Abbildung 23: PKH26-markierte hMPCs 9Tage nach Markierung	56
Abbildung 24: PKH26-markierte sMPCs 2h nach Markierung	56
Abbildung 25: PKH26-markierte sMPCs 9Tage nach Markierung	57
Abbildung 26: sMPC20 auf unbeschichteten Chamber Slides aus Glas nach 2 Tagen.....	58
Abbildung 27: sMPC20 auf unbeschichteten Chamber Slides aus Plastik nach 2 Tagen.....	58
Abbildung 28: sMPC20 auf unbeschichteten Chamber Slides aus Plastik nach 4 Tagen.....	59
Abbildung 29: sMPC20 auf gelatinebeschichteten Chamber Slides aus Glas nach 2 Tagen	59
Abbildung 30: sMPC20 auf gelatinebeschichteten Chamber Slides aus Plastik nach 2 Tagen	60
Abbildung 31: sMPC20 auf gelatinebeschichteten Chamber Slides aus Plastik nach 4 Tagen	60
Abbildung 32: sMPC20 auf kollagenbeschichteten Chamber Slides aus Glas nach 2 Tagen	61
Abbildung 33: sMPC20 auf kollagenbeschichteten Chamber Slides aus Plastik nach 2 Tagen	61

Abbildung 34: sMPC20 auf kollagenbeschichteten Chamber Slides aus Plastik nach 4 Tagen	62
Abbildung 35: sMPC20 auf unbeschichteten Chamber Slides aus Plastik nach PFA-Fixierung	63
Abbildung 36: sMPC20 auf gelatinebeschichteten Chamber Slides aus Plastik nach PFA-Fixierung	63
Abbildung 37: sMPC20 auf kollagenbeschichteten Chamber Slides aus Plastik nach PFA-Fixierung	64
Abbildung 38: sMPC20 auf unbeschichteten Chamber Slides aus Plastik nach Methanol-Fixierung	64
Abbildung 39: sMPC20 auf gelatinebeschichteten Chamber Slides aus Plastik nach Methanol-Fixierung.....	65
Abbildung 40: sMPC20 auf kollagenbeschichteten Chamber Slides aus Plastik nach Methanol-Fixierung.....	65
Abbildung 41: Antikörper-Färbung der sMPC20 auf unbeschichtetem Chamber Slide aus Plastik nach PFA-Fixierung	66
Abbildung 42: Antikörper-Färbung der sMPC20 auf gelatinebeschichtetem Chamber Slide aus Plastik nach PFA-Fixierung	66
Abbildung 43: Antikörper-Färbung der sMPC20 auf kollagenbeschichtetem Chamber Slide aus Plastik nach PFA-Fixierung	67
Abbildung 44: Antikörper-Färbung der sMPC20 auf unbeschichtetem Chamber Slide aus Plastik nach Methanol-Fixierung.....	67
Abbildung 45: Antikörper-Färbung der sMPC20 auf gelatinebeschichtetem Chamber Slide aus Plastik nach Methanol-Fixierung	68
Abbildung 46: Antikörper-Färbung der sMPC20 auf kollagenbeschichtetem Chamber Slide aus Plastik nach Methanol-Fixierung	68
Abbildung 47: sMPCs der Reihe sMPC18 Kalbe 8 Tage nach Isolierung aus porcinem Skelettmuskelgewebe.....	70
Abbildung 48: sMPCs der Reihe sMPC18 Mau 8 Tage nach Isolierung aus porcinem Skelettmuskelgewebe.....	70
Abbildung 49: sMPCs der Reihe sMPC18 Kalbe 14 Tage nach Isolierung aus porcinem Skelettmuskelgewebe.....	71

Abbildung 50: sMPCs der Reihe sMPC18 Mau 14 Tage nach Isolierung aus porcinem Skelettmuskelgewebe	71
Abbildung 51: sMPCs der Reihe sMPC19 7 Tage nach Auftauen des Aliquots	72
Abbildung 52: sMPCs der Reihe sMPC20 7 Tage nach Auftauen des Aliquots	73
Abbildung 53: sMPCs der Reihe sMPC21 10 Tage nach Isolierung aus porcinem Skelettmuskelgewebe	73
Abbildung 54: Duplikationsrate der sMPC19 in den Passagen 3-6.....	74
Abbildung 55: Duplikationsrate der sMPC20 in den Passagen 3-6.....	74
Abbildung 56: Duplikationsrate der sMPC21 in den Passagen 2-5.....	75
Abbildung 57: Größenbestimmung der sMPCs der Reihe sMPC19.....	75
Abbildung 58: Größenbestimmung der sMPCs der Reihe sMPC20.....	76
Abbildung 59: PCR-Ergebnisse der Muskelmarkergene in den, nach verschiedenen Methoden isolierten, sMPCs	77
Abbildung 60: sMPC19 auf unbeschichtetem Chamber Slide aus Plastik nach 2Tagen.....	79
Abbildung 61: sMPC19 auf unbeschichtetem Chamber Slide aus Plastik nach Methanol-Fixierung	79
Abbildung 62: sMPC19 auf unbeschichtetem Chamber Slide aus Plastik mit Methanol-Fixierung nach Antikörper-Färbung gegen Desmin, Slow Myosin und Fast Myosin.....	80
Abbildung 63: sMPC20 auf unbeschichtetem Chamber Slide aus Plastik nach 2Tagen.....	80
Abbildung 64: sMPC20 auf unbeschichtetem Chamber Slide aus Plastik nach Methanol-Fixierung	81
Abbildung 65: sMPC20 auf unbeschichtetem Chamber Slide aus Plastik mit Methanol-Fixierung nach Antikörper-Färbung gegen Desmin, Slow Myosin und Fast Myosin.....	81
Abbildung 66: sMPC21 auf unbeschichtetem Chamber Slide aus Plastik nach 2Tagen.....	82
Abbildung 67: sMPC21 auf unbeschichtetem Chamber Slide aus Plastik nach Methanol-Fixierung	82

Abbildung 68: MPC21 auf unbeschichtetem Chamber Slide aus Plastik mit Methanol-Fixierung nach Antikörper-Färbung gegen Desmin, Slow Myosin und Fast Myosin.....	83
Abbildung 69: Vergleich der Vitalität von PKH26-markierten und unmarkierten sMPCs nach Sprühen mit Wasserstrahl mit verschiedenen Druckprofilen.....	84
Abbildung 70: Vergleich der Vitalität von PKH26+BacMam-markierten und unmarkierten hMSCs nach Sprühen mit Wasserstrahl bei einheitlichem Druckprofil (Profil 1)	85
Abbildung 71: Vitalität der unmarkierten hMSCs und sMPCs nach Versprühen durch Williams Nadel und Wasserstrahl	86
Abbildung 72: IVIS Imaging nach Injektion von PKH26-markierten sMPCs durch Wasserstrahl.....	87
Abbildung 73: IVIS Imaging nach Injektion von PKH26-markierten sMPCs durch Williams-Nadel	87
Abbildung 74: Gefrierschnitt des Kadavergewebes nach Injektion von PKH26-markierten sMPCs durch Wasserstrahl in 4facher Vergrößerung	88
Abbildung 75: Gefrierschnitt des Kadavergewebes nach Injektion von PKH26-markierten sMPCs durch Wasserstrahl in 20facher Vergrößerung	89
Abbildung 76: Gefrierschnitt des Kadavergewebes nach Injektion von PKH26-markierten sMPCs durch Wasserstrahl in 20facher Vergrößerung	89
Abbildung 77: Gefrierschnitt des Kadavergewebes nach Injektion von PKH26-markierten sMPCs durch Wasserstrahl in 40facher Vergrößerung	90
Abbildung 78: Gefrierschnitt des Kadavergewebes nach Injektion von PKH26-markierten sMPCs durch Williams-Nadel in 4facher Vergrößerung	91
Abbildung 79: Gefrierschnitt des Kadavergewebes nach Injektion von PKH26-markierten sMPCs durch Williams-Nadel in 20facher Vergrößerung	91
Abbildung 80: Gefrierschnitt des Kadavergewebes nach Injektion von PKH26-markierten sMPCs durch Williams-Nadel in 20facher Vergrößerung	92
Abbildung 81: Gefrierschnitt des Kadavergewebes nach Injektion von PKH26-markierten sMPCs durch Williams-Nadel in 40facher Vergrößerung	92

2 Abkürzungsverzeichnis

ADSC *adipose-derived stem cell*

AK *Antikörper*

bFGF *basic fibroblast growth factor*

BMSC *bone-marrow-derived mesenchymal stem cell*

BSA *Bovine Serum Albumin*

CD *Clusters of Differentiation*

cDNA *complementary desoxyribonucleinacid*

DMEM/F12 *Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient F-12 Ham*

DMSO *Dimethylsulfoxid*

EDTA *Ethylendiamintetraessigsäure*

FBN *Forschungsinstitut für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere*

FCS *Fetal Calf Serum*

FFP *Fresh Frozen Plasma*

hEGF *human Epidermal growth Factor*

hMPC *humane Muskelprogenitorzellen*

hMSC *humane mesenchymale Stammzellen*

IVIS *In Vivo Imaging System*

MDSC *muscle-derived stem cell*

MEM *Modified Eagle Medium*

NEA *Nicht essentielle Aminosäuren*

NTC *non-template control*

NTW *non-template water*

PBS *phosphate-buffered saline*

PCR *Polymerasekettenreaktion*

Pen./Strep. *Penicillin/Streptomycin*

PLL *Plättchenlysat*

RNA *ribonucleic acid*

sMPC *porcine Muskelprogenitorzellen*

sMSC *porcine mesenchymale Stammzellen*

3 Einleitung

3.1 Belastungsinkontinenz

Weltweit leiden ca. zweihundert Millionen Menschen an Harninkontinenz. Dabei wird zwischen drei verschiedenen Formen der Harninkontinenz unterschieden, Dranginkontinenz, Belastungsinkontinenz und Misch-Harninkontinenz (Aragon, Imbroda et al. 2018), wobei die Belastungsinkontinenz die prozentual häufigste Form darstellt (Gerullis, Eimer et al. 2012). Hierbei erfolgt ein unfreiwilliger Harnabgang, wenn der intraabdominale Druck ansteigt (Peters, Dmochowski et al. 2014). Dies ist vor allem beim Husten, Niesen und körperlicher Belastung der Fall. Ist die Belastungsinkontinenz besonders stark ausgeprägt, kann der Urinabgang allerdings auch ohne Auslöser, z.B. im Liegen, erfolgen (Vaegler, DaSilva et al. 2014). Ursächlich ist eine schwache Beckenbodenmuskulatur, urethrale Hypermobilität und/oder eine Schwäche des quergestreiften Musculus sphincter urethrae externus (Peters, Dmochowski et al. 2014). Belastungsinkontinenz betrifft Frauen dreimal häufiger als Männer, wobei die Prävalenz mit zunehmendem Alter ansteigt. Für Frauen sind die größten Risikofaktoren Schwangerschaft und eine vaginale Entbindung (Aragon, Imbroda et al. 2018), wohingegen bei Männern eine iatrogene Sphinkterschädigung im Rahmen einer radikalen Prostatektomie, einer transurethralen Prostataresektion oder einer Radiotherapie im Vordergrund steht (Herrera-Imbroda, Lara et al. 2015).

Leichtere Varianten der Belastungsinkontinenz werden medikamentös, mit krankengymnastischen Übungen, Änderung des Lebensstils oder auch mit elektrophysiologischer Stimulationstherapie behandelt. Adipositas korreliert stark mit Belastungsinkontinenz (Imamura, Williams et al. 2015). In einer Studie von L.L. Subak et al. an 338 übergewichtigen Frauen mit Belastungsinkontinenz konnte gezeigt werden, dass die Belastungsinkontinenz bei den Frauen, die an einem 6monatigen Abnehmprogramm teilnahmen und dadurch durchschnittlich 8% ihres Körpergewichts verloren, um 47% nachließ. Bei den Frauen der Kontrollgruppe, die durchschnittlich einen Gewichtsverlust von 1,6% aufwiesen, verbesserte sich die Inkontinenzsymptomatik nur um 28% (Subak, Wing et al.

2009). Eine weitere konservative Behandlungsoption ist das Beckenbodentraining. In einer Übersichtsarbeit von Dumoulin et al. wurden 18 Studien bewertet, die den Erfolg von Beckenbodentraining verglichen mit keiner Behandlung diskutieren. Hierbei ergab sich eine Heilungsrate von 56% nach Beckenbodentraining und 6% in der Kontrollgruppe (Dumoulin, Hay-Smith et al. 2014). Allerdings gibt es keine zuverlässigen Langzeitergebnisse über den Erfolg von Beckenbodentraining ohne zusätzliche Behandlung (de Vries and Heesakkers 2018). Je nach Schwere der Inkontinenz sind diese Behandlungsmethoden jedoch nicht ausreichend, weshalb dann zu operativen Optionen gegriffen wird (Vaegler, DaSilva et al. 2014). Eine minimal invasive Variante stellen urethrale Bulking Agents dar, die periurethral injiziert werden, um den urethralen Widerstand zu erhöhen (Boctor 2014). Allerdings haben die Bulking Agents eine niedrigere Erfolgsrate als andere chirurgische Verfahren (Kirchin, Page et al. 2017). Des Weiteren kommt es häufig zu Nebenwirkungen wie allergische Reaktionen, Migration des eingebrachten Materials oder Bildung von Abszessen (Davis, Kheradmand et al. 2013). Eine weitere operative Variante stellt die Kolposuspension nach Burch dar. Bei dieser Operation wird die Scheide angehoben, beidseitig werden auf Höhe des Blasenhalses Nähte gesetzt, die an der Symphyse befestigt werden. So wird der Blasen Hals an die Hinterwand der Symphyse gedrückt und das Kontinenzorgan unterstützt (Riss 2009). Innerhalb des ersten Jahres liegt die Heilungsrate zwischen 85-90%. Nach 5 Jahren sind noch ca. 70% der therapierten Frauen kontinent. Bisher wird diese Operation offen durchgeführt, wodurch im Vergleich zu Schlingenoperationen ein erhöhtes Risiko für einen Prolaps der Beckenorgane besteht. Die Erfolgsquote bei laparoskopischer Kolposuspension ist noch nicht ausreichend bekannt (Lapitan and Cody 2012). Weniger invasive Operationen stellen die Tension-free Vaginal Tapes (TVT) dar. Es handelt sich hierbei um eine Schlinge, die spannungsfrei unter dem mittleren Teil der Urethra angebracht wird. Diese Technik bedarf einer kürzeren Operationszeit, die Regenerationszeit ist ebenfalls kürzer und die Erfolgsrate genauso hoch wie bei der Kolposuspension (Ford, Rogerson et al. 2015). Die häufigste intraoperative Komplikation dieser Methode ist die Blasenperforation. Postoperativ kommt es in 56% zu Miktionschwierigkeiten und

in 16,6% zu einer Harnretention (Kristensen, Eldoma et al. 2010). Eine der effektivsten Therapien der hochgradigen Belastungsinkontinenz stellt der artifizielle Sphinkter dar, welcher vor allem bei männlichen Patienten nach Prostatektomie zum Einsatz kommt. Er besteht aus einem Ballon, der durch Druck reguliert wird und einer Manschette, die um die Urethra gelegt wird. Den letzten Bestandteil bildet eine Pumpe, die eingeschaltet werden kann, um die Manschette aufzublasen. Dadurch kann die Urethra mechanisch verschlossen werden (de Vries and Heesakkers 2018). Dieses Verfahren hat eine hohe Heilungsrate von 76%–89%, ist jedoch mit verschiedenen Nebenwirkungen assoziiert, wie Infektion des Implantats oder Verletzung der Urethra im Langzeitverlauf. Bei schwerwiegendem Verlauf der Komplikationen oder bei Versagen des Sphinkters kann es notwendig sein, den artifiziellen Sphinkter wieder zu explantieren (Vayleux, Rigaud et al. 2011). Allerdings kann die hochgradige Belastungsinkontinenz mit weniger invasiven Methoden wie funktionellen Bändern, Bulking Agents oder spannungsfreien Vaginalbändern (TVT-TOT) nicht so suffizient behandelt werden (Yiou, Hogrel et al. 2013).

3.2 Progenitor- und Stammzellen

Per definitionem sind Stammzellen Zellen, die die Fähigkeit haben, sich selbst zu erneuern, klonale Populationen zu bilden und sich in verschiedene Zelltypen zu differenzieren. Des Weiteren produzieren Stammzellen bioaktive Faktoren und stimulieren dadurch z.B. Vaskularisierung, Regeneration und wirken anti-apoptotisch. Unterschieden werden muss hierbei zwischen embryonalen und adulten Stammzellen. Während embryonale Stammzellen noch pluripotent sind und sich in alle Gewebearten differenzieren können, befinden sich adulte Stammzellen in bestimmten Organen und können sich nicht mehr in jede Körperzelle differenzieren (Aragon, Imbroda et al. 2018). Trotzdem lässt sich ihr Differenzierungspotenzial nicht auf eine bestimmte Gewebeanzahl beschränken. Mit echten Stammzellen verwandt sind z.B. die mesenchymalen Stromazellen (Mesenchymal Stem Cells, MSC). Sie sind in der Lage, sich in Osteoblasten, Chondrozyten, glatte Muskelzellen und Adipozyten zu differenzieren (Gotoh, Yamamoto et al. 2014). Multipotente mesenchymale Stroma- bzw. Stammzellen werden mithilfe der drei minimalen Kriterien nach M. Dominici charakterisiert.

Diese besagen, dass MSCs die Oberflächenmarker CD73, CD90 und CD105 exprimieren müssen. Gleichzeitig darf kein CD14, CD34 und CD45 nachgewiesen werden. Des Weiteren müssen sie in Lage sein, sich in vitro zu Adipozyten, Chondroblasten und Osteoblasten zu differenzieren. Laut dem dritten Kriterium müssen die Zellen bei Standardbedingungen plastik-adhärenz sein (Dominici, Le Blanc et al. 2006).

Adulte multipotente Stammzellen gibt es auch in der Muskulatur, die sogenannten Satellitenzellen. Diese sind verantwortlich für postnatales Wachstum, Reparatur und Aufrechterhaltung des Muskels. Aus den Satellitenzellen entwickeln sich bei Verletzung oder vermehrter Beanspruchung des Muskels die Muskelvorläuferzellen (Muscle Progenitor Cells, abgekürzt MPCs) (Chen and Goldhamer 2003).

3.3 Marker für muskuläre Progenitorzellen (MPCs)

Muskelzellen exprimieren in ihren Stadien von Satellitenzellen zu differenzierten Muskelfasern unterschiedliche Marker. Satellitenstammzellen teilen sich in zwei Tochterzellen. Eine dieser Zellen exprimiert den Marker Myf5 und stellt die Zelle dar, die sich zu einer Muskelzelle differenziert. Die zweite Zelle, die diesen Marker nicht aufweist, füllt die Nische der Satellitenstammzellen wieder auf. Satellitenzellen befinden sich normalerweise im G₀-Stadium. In diesem Zustand exprimieren sie die Marker Pax7 und Myf5, aber kein MyoD1 oder Myogenin. Erst bei Verletzung des Muskels werden sie aktiviert und entwickeln sich zu Muscle Progenitor Cells. Gekennzeichnet ist dieser Prozess durch die Herunterregulation von Pax7, gleichzeitig beginnen die Zellen Myogenin und MyoD1 zu exprimieren (Yin, Price et al. 2013). MyoD1, bzw. Myogenic Differentiation 1, ist dafür zuständig, dass eine Zelllinie sich zu Myoblasten differenziert. Myogenin sorgt dafür, dass die Myoblasten wieder aus dem Zellzyklus austreten und zu multinukleären Muskelfasern fusionieren. MyoD1, Myogenin, Myogenic Factor 5 (Myf5) und Myogenic Regulatory Factor (MRF4), auch als Myf6 bezeichnet, bilden zusammen die „myogenic regulatory factor family“ (MRF). Gemeinsam sind sie dazu in der Lage verschiedene Zelltypen zu Myoblasten zu differenzieren (Zammit 2017). Myogenin und MyoD1 sind

außerdem für die Aktivierung der strukturellen und kontraktilen Gene in den MPCs zuständig (Yin, Price et al. 2013). Myostatin, kurz MSTN, ist ein Marker, der hauptsächlich in Myoblasten exprimiert wird, die sich noch in der Entwicklung befinden. Zeitgleich ist Myostatin dafür verantwortlich, die Proliferation der Muskulatur negativ zu regulieren (Walker, Poggioli et al. 2016).

3.4 Zellbasierte Therapie der Belastungsinkontinenz

Die Kosten für einen Patienten mit Belastungsinkontinenz sind hoch. Schon 1998 lagen die direkten medizinischen Kosten in den USA bei US\$5642 pro Patienten, die indirekten Kosten bei US\$4208. Diese Kosten stiegen über die letzten Jahre weiter an. Das klinische Management kann verschiedene konventionelle Behandlungen umfassen, zum Beispiel Beckenbodentraining und Pharmakotherapie oder auch chirurgische Behandlungsoptionen. Der Goldstandard bei Frauen ist hierbei eine Bandimplantation, welche eine Heilungsrate von 80-95% aufweist. 5-20% der Patientinnen leiden allerdings an persistierender Inkontinenz, postoperative Komplikationen treten in 7,2% der Fälle auf, Erosionen der Urethra und Harnwegsinfekte im Langzeitverlauf kommen bei 17,2% vor. Eine alternative Therapieoption stellt die zellbasierte Therapie dar (Vilsboll, Mouritsen et al. 2018). Besonders vielversprechend scheint hierbei die lokale Injektion von mesenchymalen, vom Muskel und von Fettgewebe abgeleiteten Vorläufer- oder Stammzellen zu sein. Für die Therapie wird eine Biopsie des Patienten benötigt, die unter lokaler Anästhesie entnommen werden kann (Tran and Damaser 2015). Vorteilhaft bei der Verwendung von MSCs ist hierbei deren Fähigkeit langfristig zu proliferieren, sich selbst zu erneuern und sich in verschiedene Gewebe zu differenzieren (Furuta, Jankowski et al. 2007). Durch die Differenzierung in vaskuläre (vaskuläre glatte Muskelzellen, Endothel und Perizyten) und neuronale Zelllinien (Schwann'sche Zellen und Perineurium) kann die funktionelle Versorgung der neugebildeten Muskulatur unterstützt werden (Kim, Lee et al. 2013). Im Jahr 2012 wurden verschiedene präklinische Studien über Stammzell-basierte Therapie für Belastungsinkontinenz von M. Vaegler et al. in einem Review verglichen (Vaegler, Lenis et al. 2012). In der Studie von G. Lin et al. wurden autologe MSCs aus Fettgewebe (ADSC) in weibliche Ratten mit verletztem Blasensphinkter

injiziert. Die Ratten wurden in drei Gruppen eingeteilt. 10 Tiere stellten die Kontrollgruppe dar, die eine urethrale Injektion mit physiologischer Kochsalzlösung erhielten. 12 Tiere wurden mit 5-Ethynyl-2'-Deoxyuridine markierten ADSCs behandelt, ebenfalls durch urethrale Injektion und 6 Tiere erhielten mit 5-Bromo-2'-Deoxyuridin markierte ADSCs, die durch die Schwanzvene injiziert wurden. Nach 4 Wochen konnten bei 80% der Kontrollratten Miktionsstörungen festgestellt werden, in den anderen beiden Gruppen bei je 33,3% (Lin, Wang et al. 2010). Kinebuchi et al. untersuchten die Therapie der Belastungsinkontinenz durch autologe MSCs aus Knochenmark (BMSC). Hierbei wurden 18 weibliche Ratten verwendet, deren Blasensphinkter verletzt wurde. 6 dieser Ratten wurden mit GFP-markierten BMSCs behandelt, bei 6 Ratten wurde zellfreies Medium injiziert und 6 Ratten wurden als Kontrolle scheinoperiert. Der Leak Point Pressure und die Blasenkapazität der Ratten wurden vor der Sphinkterverletzung, nach Verletzung vor Behandlung und 1, 4, 6, 8 und 12 Wochen nach Behandlung bestimmt. In den Gruppen, die mit BMSCs und zellfreiem Medium behandelt wurden, konnte eine Steigerung des Leak Point Pressure festgestellt werden. Die Blasenkapazität war bei allen Gruppen unverändert. Histologische Untersuchungen ergaben eine Zunahme von Skelettmuskelzellen und peripheren Nerven in den mit BMSCs behandelten Ratten. In den anderen Gruppen war keine Veränderung sichtbar (Kinebuchi, Aizawa et al. 2010). 2006 führten Kwon et al. eine Studie an 24 weiblichen Ratten mit verletztem Sphinkter durch. Je 6 Ratten bildeten eine Gruppe, von der eine mit muskulären Vorläuferzellen (MDSC), eine mit Fibroblasten und eine mit physiologischer Kochsalzlösung behandelt wurde. Die letzte Gruppe diente als Kontrolle und wurde gar nicht behandelt. 4 Wochen nach Behandlung wurde der Leak Point Pressure und die Kontraktilität des Sphinkters verglichen. Die mit Zellinjektion behandelten Ratten wiesen einen deutlich höheren Leak Point Pressure auf als die anderen beiden Gruppen. In der Gruppe, die mit MDSCs behandelt wurde, konnte eine reduzierte Atrophie der gestreiften Muskulatur sowie eine gesteigerte Kontraktion der schnell-kontrahierenden Muskelfasern festgestellt werden (Kwon, Kim et al. 2006).

3.5 Beispiele für zellbasierte Therapien

Zellbasierte Therapie ist nicht nur in der Urologie ein relevantes Thema. Auch in der Kardiologie spielt sie eine große Rolle. So werden hier vor allem autologe mononukleäre Zellen aus Knochenmark zur Therapie von Patienten mit Herzinsuffizienz, akutem Myokardinfarkt oder fortgeschrittener koronarer Herzerkrankung erforscht (M. Gyöngyösi 2018). Eine wichtige Therapieoption stellt die zellbasierte Therapie in der Onkologie dar, wo sie besonders bei hämatopoetischen Erkrankungen eingesetzt wird. Die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation mit vorausgehender myoablativer Konditionierung gilt als die potenteste Therapie für Patienten mit adulter akuter lymphoblastischer Leukämie, die sich in Remission befinden (Ribera 2011). Einen weiteren Anwendungsbereich für die Transplantation von MSCs stellt die Therapie von Diabetes mellitus Typ 1 dar. Hierbei senken die MSCs den Glukosespiegel durch parakrine Einflüsse. Zusammen mit der Transplantation von pankreatischen Inselzellen könnte die Transplantation eine Heilung dieses Diabetestypes sein (J. Katuchova 2015). Andere Beispiele für den Einsatz von zellbasierten Therapien stellen Hauterkrankungen dar (S. de Wilde 2016), wie zum Beispiel Lupus erythematodes. Hierbei werden mesenchymale Stammzellen eingesetzt um immunkompetente Zellen, wie T-Zellen, B-Zellen, natürliche Killerzellen und dendritische Zellen, zu unterdrücken (Sun 2015).

3.6 Wasserstrahltechnik

Das Schneiden durch Wasserstrahl ist eine Technik mit der man, im Gegensatz zum herkömmlichen Schneiden mit Schere oder Skalpell, das Gewebe durch Anpassung des Drucks spezifisch durchtrennen kann. So ist es mit dem ErbeJet2® möglich, endoskopische Mukosaresektionen von Polypen, en-bloc-Resektionen von nicht-Muskel-invasiven Blasenkarzinomen, partielle Leberresektionen und Nephrektomien, nervenschonende Prostatektomien und viele weitere Operationen durchzuführen. Vorteile sind hierbei das geringere Blutungs- und Perforationsrisiko, die selektive Elevation von spezifischen Gewebeschichten, geringerer Instrumentenwechsel, Schutz von Blutgefäßen und Nerven, kürzere Operationszeiten als auch die Eignung des Gerätes für offene und laparoskopische Operationen (Erbe Elektromedizin GmbH 2018).

Da man bei der Wasserstrahltechnik die Eindringtiefe des Wasserstrahls durch Druckeinstellung genau festlegen und das Gewebe durchtrennen kann, müsste es auch möglich sein, Material durch die Düse in das Gewebe einzubringen. Aus diesem Grund soll im Rahmen dieser Arbeit eine zellbasierte Therapie der Belastungsinkontinenz durch Injektion mit Wasserstrahl untersucht werden. Experimente, bei denen die Zellen mit einer Williams Cystoscopic Injection Needle von Cook in den M. sphincter urethrae externus eingebracht wurden, zeigten, dass auch bei erfahrenen Urologen ein großer Prozentsatz der Zellen außerhalb des Sphinkters injiziert wurde (Abb.1). Des Weiteren werden die Zellen bei einer Nadelinjektion nur an einer Lokalisation injiziert, sodass sie sich bei erfolgreicher Applikation selbstständig in der Muskulatur verteilen müssen. Bei Verwendung der Wasserstrahltechnik wäre es einerseits möglich, die Eindringtiefe der Zellen in den Sphinkter exakt festzulegen, andererseits kann man durch Rotation der Düse mehrere Injektionen vornehmen, ohne dass die Operation deutlich invasiver wird. Die Wasserstrahlinjektion von Mikropartikeln mit 20µm Durchmesser und von humanen MSCs (hMSCs) in den M. sphincter urethrae externus von porcinem Kadavergewebe wurde bereits im Jahr 2017 im Labor der Klinik für Urologie am Zentrum für Medizinische Forschung der Eberhard-Karls Universität etabliert (Abb.2).

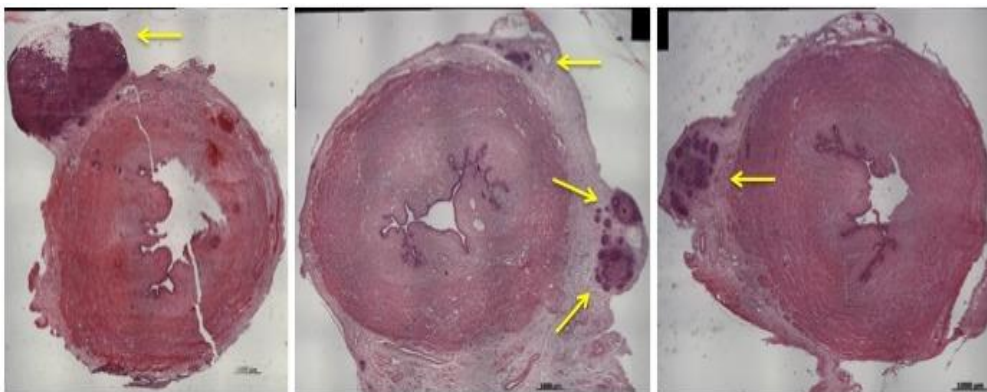


Abbildung 1: Injektion von hMSCs in porcines Kadavergewebe mit Williams Nadel von Cook; aus eigenen Vorarbeiten, Daten der KFO 273 TP3

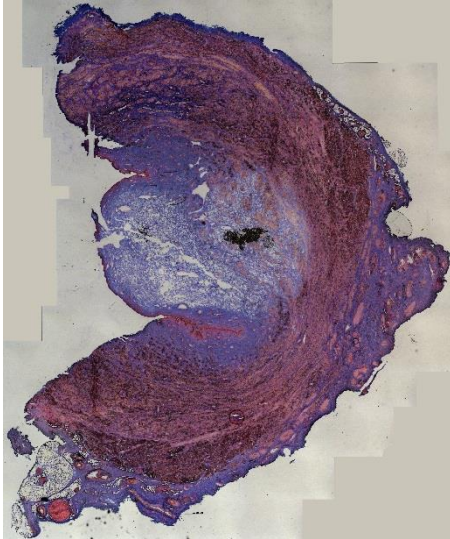


Abbildung 2: Wasserstrahlinjektion von Mikropartikeln mit 20µm Durchmesser in porcines Kadavergewebe; exemplarisch aus den Med. Dissertationsarbeiten von Johanna Schreiber, Florian Beck, den Masterarbeiten von Luise Jäger, Janet Xavier und den Bachelorarbeiten von Carolin Gillmann

Ziel dieser Dissertationsarbeit ist es, ein Protokoll zur Isolierung porciner Muskelvorläuferzellen aus Skelettmuskulatur zu etablieren und diese Zellen zu charakterisieren. Nach erfolgreicher Etablierung solcher Zellkulturen sollen die porcinen MPCs (sMPC) mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert werden, um sie so in späteren Injektionsversuchen in Kadaver und in vitalem Gewebe lokalisieren zu können. Des Weiteren soll die Vitalität der Fluoreszenz-markierten und unmarkierten Myoblasten vor und nach den verschiedenen Injektionsversuchen verglichen werden. Zum Abschluss der Arbeit sollen die Fluoreszenz-markierten Myoblasten mit Wasserstrahl und mit der Williams Nadel von Cook in Kadavergewebe injiziert werden. Anschließend soll eine histologische Untersuchung des Gewebes erfolgen, um die Qualität der verschiedenen Injektionsverfahren besser beurteilen zu können.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Reagenzien

MEM Alpha Medium (1X)	Gibco
Dulbecco's Modified Eagle Medium F-12 Nutrient Mixture DMEM/F-12 (1:1) (1X)	Gibco
Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM (1X)	Gibco
PKH26GL-1KT	Sigma
BioWhittaker L-Glutamine	Lonza
Pen Strep	Gibco
Amphotericin B solution	Sigma
Accutase solution	Sigma
FBS Superior	Biochrom GmbH
Trypsin – EDTA Solution	Sigma
Horse Serum, Donor Herd	Sigma
Cy™3 AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch
Cy™3 AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch
Anti-Desmin antibody	Abcam
Anti-Slow Skeletal Myosin Heavy chain antibody	Abcam
Anti-Fast Myosin Skeletal Heavy chain antibody	Abcam
Gelatine from porcine skin	Sigma
Dimethyl sulfoxide	Sigma
Trypan Blue 0.4% 0.85% NaCl	Lonza

Percoll	Sigma
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma
BD Pharmingen™ PE Mouse Anti-Human CD73	BD Biosciences
BD Pharmingen™ FITC Mouse Anti-Human CD14	BD Biosciences
PE anti-human CD45 Antibody Clone: HI30	BioLegend
PE anti-human CD34 Antibody Clone: 581	BioLegend
PE anti-human CD105 Antibody Clone: 43A3	BioLegend
Human CD90/Thy1 PE-conjugated Antibody	R&D Systems
Human MCAM/CD146 PE-conjugated Antibody	R&D Systems
Anti-SUSD2-PE human	MACS Miltenyi Biotec
Bovine Serum Albumin 25%	Gibco
Collagenase Type 1	Gibco
Gentamycin	Biochrom GmbH
Goat Serum	Sigma
QuantiTect Primer Assay Position 70 Hs_TAGLN_2_SG	Qiagen
sACT forward	Eurofins Genomics
sACT reverse	Eurofins Genomics
sMSTN forward	Eurofins Genomics
sMSTN reverse	Eurofins Genomics
sMyoD1 forward	Eurofins Genomics
sMyoD1 reverse	Eurofins Genomics
sMyf6 forward	Eurofins Genomics

sMyf6 reverse	Eurofins Genomics
sMyf5 forward	Eurofins Genomics
sMyf5 reverse	Eurofins Genomics
sB2M forward	Eurofins Genomics
sB2M reverse	Eurofins Genomics
SYBR-Green	
Advantage RT-for-PCR Kit	TaKaRa
Kaffeeweisser Leicht löslich	TiP
Ampuwa Spüllösung	Fresenius Kabi
Insulin solution human	Sigma
Gamunex 10%	Grifols Deutschland GmbH
Braunol	Braun
Sodium Pyruvate 100mM	Gibco
HEPES Buffer Solution	Gibco
Trypsin 1:250	Gibco
Dexamethasone, minimum 98% HPLC	Sigma
Dispase II (neutral protease, grade II)	Roche Diagnostics GmbH
Collagen from bovine achilles tendon	Sigma
Trypsin solution from porcine pancreas	Sigma
β -Glycerophosphat	Sigma
L-Ascorbinsäure	
Tween20	Merck
PBS Tablets	Gibco
10x Tris/Glycine Buffer	BioRad
MEM NEAA (100X)	Gibco
RNeasy Mini Kit (250)	Qiagen
RNase-Free DNase Set (50)	Qiagen
β -Mercaptoethanol	AppliChem
Tylosin solution	Sigma
Heparin Natriumsalz	Roth

Ethanol absolute p.A.	PanReac AppliChem
Methanol	VWR International
2-Propanol	Honeywell
Human FGF-basic	PeptoTech
hEGF	Sigma
CASYton	Roche Diagnostics GmbH
Formaldehyd-Lösung 4,0%	Otto Fischer GmbH&Co. KG
Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA)	Sigma
D- (+)-Glucose	Sigma
Kaliumchlorid	Merck
Sodium Thiosulfate	Sigma
Triton X-100	Serva
Natriumcarbonat wasserfrei	Merck
Silbernitrat	Roth
Paraformaldehyd	Merck
D- (+)-Sucrose	PanReac AppliChem
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natriumazid	Merck
Natriumchlorid	Merck
Sodium hydroxide solution	Merck
Indomethacin	Sigma
Urea	Sigma
Mounting Medium with DAPI	Vectashield
Acetic Acid	Fluka
3-Isobutyl-1-methylxanthin	Sigma
Plättchenlysat	Aus Blutbank des UKT

4.1.2 Geräte

HERAEUS Multifuge 3SR+	Thermo Scientific
Centrifuge 5804	Eppendorf

Centrifuge 5424	Eppendorf
Eppendorf Research plus 0.1 – 2.5µL	Eppendorf
Eppendorf Research plus 0.5 – 10µL	Eppendorf
Eppendorf Research plus 2 – 20µL	Eppendorf
Eppendorf Research plus 10 – 100µL	Eppendorf
Eppendorf Research plus 20 – 200µL	Eppendorf
Eppendorf Research plus 100 – 1000µL	Eppendorf
Eppendorf Research plus 1000µL	Eppendorf
Multipette M4	Eppendorf
Eppendorf Safe-Lock Röhrchen, 0,5ml	Eppendorf
Eppendorf Safe-Lock Röhrchen, 1,5ml	Eppendorf
Eppendorf Safe-Lock Röhrchen, 2,0ml	Eppendorf
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte
5ml Stripette	Costar
10ml Stripette	Costar
25ml Stripette	Costar
50ml Stripette	Costar
2ml Serological Pipet	Falcon
15ml Cellstar Röhrchen	Greiner bio-one
50ml Cellstar Röhrchen	Greiner bio-one
Tissue Culture Flask, 250ml, 75cm ²	Falcon
75cm ² C/N Flask Corning CellBIND Surface	Corning
6 Well Cell Culture Plate	Cellstar
Disposable Hemocytometer Chips Neubauer Improved	NanoEnTek
Lab-Tek II Chamber Slide RS Glass	Nalge Nunc International

x-well Zellkulturkammern	Sarstedt
Feather disposable Scalpel	Feather
Schere	Germany Stainless
Pinzette	Hammacher
Wasserbad W 12	Preiss Daimler
-80°C-Tiefkühlschrank	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH
-20°C-Tiefkühlschrank	Liebherr Premium
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank, Klasse II, MSC-Advantage	Thermo Scientific
CB 210 CO ₂ Brutschrank Inkubator	Binder
Kühlschrank	Liebherr
Primovert	Carl Zeiss Microscopy GmbH
Axiovert 200M	Carl Zeiss Microscopy GmbH
Axiophot	Carl Zeiss Microscopy GmbH
Light Cycler 480II	Roche
PCR 96 well Platte	Roche
Vortexer Heidolph REAX top	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG
Nano Photometer	Implen
Uno II PCR-Maschine	Biometra
Kern 770 Feinwaage	Kern & Sohn GmbH
Kern 440-47N Feinwaage	Kern & Sohn GmbH
MS1 Probenschüttler	IKA
HERACELL 240i CO ₂ Incubator	Thermo Scientific
CASY	Innovatis
Cell Strainer 100µm Nylon	Falcon
Cell Strainer 70µm Nylon	Falcon

5ml Polystyrene Round-Bottom Röhrchen	Falcon
Williams Cystoscopic Injection Needle	Cook Medical
BD Microlance 3 22G × 1¼" – Nr. 12 (0,7mm × 30mm)	BD Biosciences
U-40 Insulin 1ml Luer	BD Biosciences
Cryo Röhrchen Vials	Thermo Scientific
Durchflusszytometer (FACS) LSRII	BD Biosciences
Leica CM 1860 UV Kryotom	Leica
Objektträger	Laborfachhandel
Deckglas	Laborfachhandel

4.2 Zellkultur und Medien

4.2.1 Medienherstellung

Die unterschiedlichen Zelllinien wurden in verschiedenen Medien kultiviert.

4.2.1.1 „Eberli“-Medium

Zu Beginn der Versuche mit MPCs (hMPC H68 und sMPC 11) wurden sowohl die humanen als auch die porcinen MPCs mit dem gleichen Medium, dem „Eberli“-Medium, behandelt. Dieses Medium wird auf der Basis von DMEM/F12 hergestellt, welches am Ende 1% Pen. /Strep., 20% FCS, $1 \cdot 10^{-6}$ % hEGF, 1ng/ml bFGF, $1 \cdot 10^{-7}$ % Insulin und $8 \cdot 10^{-8}$ % Dexamethason enthält.

Die neu isolierten sMPC18 wurden in zwei verschiedenen Medien kultiviert. Eines wurde von Frau Dr. rer. nat. Claudia Kalbe aus dem Leibniz Institute for Farm Animal Biology (FBN), Institute of Muscle Biology and Growth, übermittelt, das zweite stammte von Marcus Mau (M. Mau, 2008).

4.2.1.2 „Kalbe“-Medium

Das „Kalbe“-Medium bestand aus DMEM high glucose mit 10% FCS, 10% Horse Serum, 1% L-Glutamin, 1% Pen. /Strep. und 1% Amphotericin B.

4.2.1.3 „Mau“-Medium

Für das „Mau“-Medium wurde MEM α mit 4% L-Glutamin, 2% Pen. / Strep., 1% Amphotericin B und 10% FCS versetzt (M. Mau 2008).

4.2.1.4 PBS-D

Um PBS-D herzustellen wurde PBS-Lösung mit 144mM Natriumchlorid, 5,4mM Kaliumchlorid, 25mM Glucose, 14mM Sucrose, 5mM Dinatriumhydrogenphosphat und 1% Pen. /Strep. versetzt. Anschließend wurde die Lösung mit Natriumhydroxid auf einen pH-Wert von 7,4 titriert. Abschließend wurde die PBS-D-Lösung sterilfiltriert.

4.2.1.5 Entnahmemedium

Das Entnahmemedium für den Transport der porcinen Muskelstücke bestand aus PBS-D mit 10% Pen. /Strep. und 10% Amphotericin B.

4.2.1.6 „sMSC“-Medium

Die aus dem viszeralen Fettgewebe der Schweine gewonnenen MSCs wurden im „sMSC“-Medium kultiviert. Zusammengesetzt war dieses aus DMEM low glucose (1g/l) mit Hepes 25mM, 1% L-Glutamin, 10% FCS, 0,1% Tylosin, 0,1% Gentamycin und 1% Pen. /Strep.

4.2.1.7 „GMP⁺/P⁺“-Medium

Für humane MSCs wurde das „GMP⁺/P⁺“-Medium verwendet. Es bestand aus DMEM low glucose plus 2,5% HEPES 1M. Aus diesem Gemisch wurden 50ml verworfen und anschließend 0,2% Heparin (1000IE), 1% L-Glutamin, 1% Pen. /Strep. 5% Fresh Frozen Plasma (FFP) und 5% Plättchenlysate (PLL) hinzugefügt.

4.2.1.8 „Antibiotika-GMP⁺/P⁺“-Medium

Zellen, die in das porcine Kadavergewebe injiziert und wieder extrahiert wurden, wurden anschließend in Medium kultiviert, das vermehrt mit Antibiotika versetzt war. Hierfür wurde dem sonst verwendeten „GMP⁺/P⁺“-Vollmedium pro 100ml 1% Amphotericin B, 1% Pen. / Strep., 0,1% Tylosin und 0,1% Gentamycin zugefügt.

4.2.1.9 Kontrollmedium für adipogene und osteogene Differenzierung

Für die Kontrolle der Differenzierung wurde DMEM high glucose mit 1% MEM NEAA (100X), 1% Natrium Pyruvat, 1% Pen. / Strep. und 10% FCS versetzt.

4.2.1.10 Adipogenes Differenzierungsmedium

Für dieses Medium wurde DMEM high glucose Mediums verwendet. Diesem wurden 10% FCS, 1,2% Amphotericin B, 1% Pen. / Strep., 0,1% Dexamethason, 0,4% Indomethacin, 0,1% Insulin und 1% 3-Isobutylxanthin beigemischt.

4.2.1.11 Osteogenes Differenzierungsmedium

Das Medium wurde mit DMEM high glucose hergestellt, welchem 10% FCS, 0,1% Dexamethason, 1% β -Glycerophosphat, 1% Pen. / Strep., 1,2% Amphotericin B und 0,35% L-Ascorbinsäure hinzugefügt wurden.

4.2.1.12 Einfriermedium

Das Einfriermedium wurde immer frisch hergestellt. Hierfür wurden 50% des entsprechenden Zellkulturmediums, 40% FCS und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) benötigt. Nach Herstellung wurde das Medium bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

4.2.1.13 „hMSC-Minus“-Medium

Das „hMSC-Minus“-Medium bestand aus DMEM low glucose, das 25mM HEPES enthielt. Diesem wurde 1% L-Glutamin und 1% Pen. / Strep. zugesetzt.

4.2.1.14 „hMSC-Stopp“-Medium

Für das „hMSC-Stopp“-Medium wurde dem „hMSC-Minus“-Medium 20% FCS hinzugefügt.

4.2.1.15 „sMPC-Minus“-Medium

Dieses Medium bestand aus DMEM high glucose, welchem 1% L-Glutamin, 1% Pen. / Strep. und 1% Amphotericin B zugesetzt wurde.

4.2.1.16 „sMPC-Stopp“-Medium

Das „sMPC-Stopp“-Medium entsprach dem „sMPC-Minus“-Medium, welchem 20% FCS zugegeben wurde.

4.2.2 Passagieren

Sobald die Zellen in den T75-Zellkulturflaschen zu ca. 80% konfluent waren, wurden sie gesplittet und auf neue T75-Zellkulturflaschen verteilt. So konnten sie mit optimalen Bedingungen weiter expandiert werden. Hierfür wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 5-10ml PBS-Lösung (ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) gewaschen, welches direkt im Anschluss ebenfalls abgesaugt wurde. Nachfolgend wurden 3ml Trypsin zugegeben. Nach dreiminütiger Inkubation bei 37°C und 5% CO_2 zum Ablösen der Zellen voneinander und von der Flaschenwand wurden 3ml des Vollmediums der jeweiligen Zellkultur zugegeben. Dadurch wurde die Enzymreaktion gestoppt und das Trypsin inaktiviert. Die Zellsuspension wurde mit Hilfe einer 10ml Pipette entnommen und in ein 50ml Röhrchen überführt. Nach 7minütiger Zentrifugation bei 1500rpm wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in Vollmedium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in neue T75-Zellkulturflaschen verteilt und diese mit Vollmedium auf ein Gesamtvolumen von 10ml aufgefüllt.

4.2.3 Gelatinebeschichtung

Sowohl die sMPCs als auch die hMPCs, die zu Beginn in T75 CellBIND Zellkulturflaschen expandiert wurden, wurden im Verlauf in gelatinebeschichtete T75-Zellkulturflaschen umgesetzt, da sie darin genauso gut proliferierten. Für die Beschichtung wurde erst eine 2%ige Gelatinelösung hergestellt. Hierfür wurden 2g Gelatine in 100ml Ampuwa gelöst. Nach Autoklavierung wurde diese für den sofortigen Gebrauch zu 0,1%iger Gelatinelösung verdünnt, indem 2,5ml der 2%igen Lösung in 47,5ml PBS gegeben wurden. Von dieser Lösung wurden je 10ml in eine T75-Zellkulturflasche, bzw. 2ml in ein well einer 6 well Platte gegeben. Anschließend erfolgte eine 30minütige Inkubation bei 37°C und 5% CO_2 . Nachfolgend wurde die restliche Gelatinelösung abgesaugt und die T75-Zellkulturflaschen bzw. 6 well Platten mit geöffnetem Deckel unter der Sterilbank für ein bis zwei Stunden luftgetrocknet.

4.2.4 Kollagenbeschichtung

Zu Beginn der Experimente mit Myoblasten wurden kollagenbeschichtete Zellkulturflaschen und 6 well Platten verwendet. Hierfür wurde 0,02N Essigsäure

hergestellt, indem man 69µl Eisessig mit destilliertem Wasser auf 60ml verdünnte. Dies wurde sterilfiltriert. 6ml der 0,02N Essigsäure wurden zu 200µl Kollagen gegeben und gut vermischt. Nachdem die Kollagenlösung in die Zellkulturflasche oder auf die 6 well Platte gegeben wurde, wurden diese für 30min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend erfolgte ein Absaugen der Kollagenlösung und das jeweilige Gefäß wurde zweimal mit PBS gewaschen. Danach konnte die Aussaat der Zellen stattfinden oder das Gefäß mit PBS-Lösung zum Feuchthalten der Kollagenbeschichtung bei 4°C aufbewahrt werden.

4.2.5 Zellen einfrieren

Zum Einfrieren wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin abgelöst, wie bereits beim Passagieren beschrieben. Anschließend wurden die Zellen in Medium aufgenommen und bei 1500rpm 7min abzentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands wurde das Pellet in eiskaltem Einfriermedium resuspendiert. 1,5ml der Zellsuspension wurden in ein Kryoröhrchen gefüllt. Die Kryoröhrchen wurden bis zu 4 Wochen bei -80°C gelagert und anschließend in einen Stickstofftank zur Langzeitlagerung überführt.

4.2.6 Zellen auftauen

Die eingefrorenen Zellen waren in einem mit Flüssigstickstoff gefüllten Tank oder einem -80°C-Gefrierschrank gelagert. Zum Auftauen wurden die Zellen entnommen und auf Eis gelagert transportiert, um ein vorzeitiges Auftauen zu vermeiden. Dies wäre problematisch, da die Zellen in DMSO-Medium eingefroren wurden, welches ab 0°C zytotoxisch wirkt. Die Zellen wurden in einem 37°C warmen Wasserbad soweit aufgetaut, dass sie gelöst werden konnten, aber zum Großteil noch gefroren waren. In diesem Zustand wurden sie in 15ml vorgelegtes Vollmedium überführt, was die toxische Wirkung des DMSOs reduzierte. Anschließend wurde die Zellsuspension für 7min bei 1500rpm zentrifugiert, der Überstand wurde abgesaugt und das abgesenkte Zellpellet mit „Eberli“-Medium resuspendiert, in T75-Zellkulturflaschen gegeben und bei 37°C mit 5% CO₂ inkubiert.

4.3 Bestimmung der Zellzahl

Die adhärennten Zellen wurden, wie bereits beschrieben, mit Trypsin abgelöst, in ein 50ml Röhrchen überführt und bei 1500rpm 7min abzentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands wurde das Zellpellet in 10ml Medium resuspendiert. 20µl der Suspension wurden 1:2 mit Trypanblaulösung gemischt. Mit 20µl dieser Mischung wurde eine Neubauer improved Zählkammer gefüllt. Anschließend wurden am Mikroskop alle hellen Zellen in den äußeren vier Eckquadraten ausgezählt, die dunkel gefärbten Zellen waren bereits tot und wurden nicht mitgezählt. Beide Kammern A und B wurden ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Damit konnte die Zellzahl mit folgender Formel berechnet werden.

$$\frac{\text{Zellzahl}}{4} \times 10^4 \times 2 = \text{Zelldichte} \left(\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} \right)$$

Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl musste das Ergebnis mit dem Gesamtvolumen in ml multipliziert werden.

4.4 Isolierung von porcinen Muskelprogenitorzellen (sMPC) aus porciner Skelettmuskulatur

4.4.1 Methode 1

Um MPCs aus der Skelettmuskulatur des Schweins zu extrahieren, wurde ein ca. 10Wochen altes, 20kg schweres, männliches Schwein steril operiert. Der Exitus erfolgte hierbei einmal mit dem Nervengift T61, bei den nachfolgenden Operationen wurde Troponal verwendet, da Nervengifte auch den muskulären Zellen schaden. Nach Desinfektion des Operationsbereiches mit 7,5%iger Braunol-Lösung, wurden drei je ca. 1cm³ Stücke des Musculus semimembranosus entnommen, in ein 50ml Röhrchen überführt und direkt ins Labor gebracht. Dort wurden die Muskelstücke in wenig PBS-D zerkleinert und in 0,25%igem Trypsin 1h bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Der Verdauungsprozess wurde dann mit 20%igem FCS-Vollmedium abgestoppt. Das Gemisch wurde 7 Minuten bei 1500rpm abzentrifugiert, der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet mit 5ml des FCS-Vollmediums resuspendiert. Diese Suspension wurde durch einen 100µm Zellsieb filtriert und in zwei 6well-Platten

ausgesät. Einer Platte wurden 2ml „Kalbe“-Medium pro well hinzugefügt, bei der anderen Platte wurde „Mau“-Medium verwendet.

4.4.2 Methode 2

Nach intensivem Austausch und Erlernen der Isolierungsmethode von sMPCs von Frau Dr. rer. nat. Claudia Kalbe aus dem Leibniz Institute for Farm Animal Biology (FBN), Institute of Muscle Biology and Growth, wurden die sMPCs wie folgt isoliert. Ein 4-5Tage altes, männliches Ferkel wurde durch einen Bolzenschuss betäubt und ausgeblutet. Auf diese Weise kamen die Zielzellen nicht mit schädlichen oder gar toxischen Medikamenten in Kontakt. Anschließend wurde der Musculus longissimus dorsi entnommen, in Entnahmemedium überführt und auf Eis gelagert transportiert. Vor der Aufarbeitung wurde der Muskel in frischem Entnahmemedium gespült und danach in einer unbeschichteten Schale mit einer Schere zerkleinert. Pro Ansatz wurden hierbei 10g Muskelmasse benötigt. Auf die Reinigung folgte ein dreiteiliger Verdauungsprozess. In eine 250ml Flasche wurden 25ml Verdauungslösung plus 5g des zerkleinerten Muskels gegeben. Der 20minütige Verdau erfolgte dann mit Hilfe eines sterilen Rührfischs rührend mit 500rpm und bei 37°C. Im Anschluss wurde die Flasche für 2min auf Eis gestellt. Der Überstand wurde mit einer 10ml Pipette aufgenommen und in 50ml Röhrchen überführt, in welchen je 15ml MEM α -Medium vorgelegt waren. Das Verhältnis von Medium zu Überstand sollte hierbei 1:1 betragen. Diese Mischung wurde durch ein 100 μ m Zellsieb gefiltert und bei 4°C mit 800g für 10min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 5ml MEM α -Medium resuspendiert und anschließend auf Eis gestellt. Dem Rückstand mit den Muskelstücken wurden erneut 25ml Verdauungslösung zugegeben. Die Schritte von Verdau bis Resuspendierung wurden wie zuvor ausgeführt und ein drittes Mal wiederholt. Nach Abschluss des Verdauungsprozesses wurden die Suspensionen in zwei 50ml Röhrchen gepolt und durch ein 70 μ m Zellsieb gefiltert. Das Filtrat wurde bei 4°C mit 800g für 10min abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die beiden Pellets in je 6ml PBS resuspendiert und gepolt. Um nun die Satellitenzellen zu isolieren und eine Kontamination mit Fibroblasten zu vermeiden, müssen die Zellen einen Percollgradienten durchlaufen. Hierfür wurden eine 20%ige und eine 60%ige

Percolllösung angesetzt. In ein 15ml Röhrchen wurden 1,5ml der 60%igen Percolllösung vorgelegt, dieser wurden 11,5ml der 20%igen Lösung langsam aufgeschichtet. Als oberste Schicht wurden 2ml der Zellsuspension hinzugefügt. Für eine Gradientenzentrifuge wurden sechs dieser Röhrchen benötigt. Die Zentrifugation erfolgte bei 4°C mit 15000g für 9min ohne Bremse, um den erzeugten Gradienten nicht zu zerstören. Dann wurde zuerst der ölige Überstand oben abgesaugt und anschließend die Zellen an der Grenzschicht zwischen 20%iger und 60%iger Percolllösung mit einer Pasteur-Pipette entnommen. Pro Röhrchen wurden hierbei ca. 2ml übertragen, sodass letztendlich vier 15ml Röhrchen mit Zelllösung befüllt wurden. Diese wurden mit MEM α -Medium auf 14ml aufgefüllt und bei 4°C mit 700g für 10min abzentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands wurden die Pellets in je 1ml resuspendiert, in einem Röhrchen vereint und dieses auf 10ml mit MEM α -Medium aufgefüllt. Anschließend wurde erneut bei 4°C mit 700g für 10min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet mit 2ml des Kalbe-Mediums resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer wurden je 7×10^5 Zellen pro gelatinebeschichtete T75-Zellkulturflasche ausgesät.

4.5 Proliferationskurven der isolierten porcinen Muskelprogenitorzellen

Um die Duplikationsrate der isolierten sMPCs zu bestimmen, wurden die Zellen nach Ablösen mit Trypsin mit Hilfe der Neubauer improved Zählkammer gezählt. Anschließend wurden sie mit $2,5 \times 10^5$ Zellen pro T75-Zellkulturflasche ausgesät. Nachdem die Zellen konfluent gewachsen waren, wurden sie erneut abgelöst, gezählt und wieder mit $2,5 \times 10^5$ Zellen pro T75-Zellkulturflasche ausgesät. Dieser Vorgang wurde viermal wiederholt. Die Duplikationsrate der einzelnen Passagen wurde mit folgender Formel berechnet.

$$\text{Duplikationsrate} = \frac{\log_{10}(\text{Zellzahl bei Ernte} \div \text{Zellzahl bei Aussat})}{\log_{10}(\text{Anzahl der Tage zwischen Aussat und Ernte})}$$

4.6 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um eine Analysemethode, bei der Zellen, nach spezifischer Fluoreszenzfärbung ihrer Oberflächenmarker mit Hilfe von Antikörpern, analysiert und quantifiziert werden können. Zur Analyse der

hMSCs wurden acht Oberflächenmarker und eine Kontrolle gefärbt. Die Färbung erfolgte nach folgendem Schema.

1 = Kontrolle

Positiv-Marker

2 = CD73 (PE) 20µl AK + 35µl PFEA

3 = CD90 (PE) 10µl AK + 45µl PFEA

4 = CD105 (FITC) 10µl AK + 45µl PFEA

8 = CD146 (PE) 10µl AK + 45µl PFEA

9 = SushiD2 (PE) 5µl AK + 50µl PFEA

Negativ-Marker

5 = CD14 (FITC) 10µl AK + 45µl PFEA

6 = CD34 (PE) 5µl AK + 50µl PFEA

7 = CD45 (PE) 8,35µl AK + 46,65µl PFEA

Der PFEA-Puffer bestand aus PBS, welche 2% FCS, 0,2% Natriumazid-Stocklösung und 0,074% EDTA zugesetzt wurden.

Für einen Ansatz der Antikörper (AK)-Färbung wurden 400.000-500.000 Zellen benötigt. Eine konfluente T75-Zellkulturflasche reichte daher für maximal drei Ansätze. Zu Beginn wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 3ml Accutase zugegeben und bei 37°C für 3-9min inkubiert, um die Zellen abzulösen. Hierfür darf bei der FACS-Analyse kein Trypsin verwendet werden, da dieses Enzym die Oberflächenantigene der Zellen zerstört und sie dadurch nicht mehr nachweisbar wären. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit 1500rpm 7min abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 13,5ml PFEA-Puffer resuspendiert. Pro AK wurden 1,5ml der Zellsuspension in 2ml Eppendorf Safe-Lock Röhrchen verteilt. Diese wurden bei 0,3rcf 4min abzentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurden 50µl Gamunex in jedes Röhrchen zugegeben, welche dann gevortext und 20min bei 4°C und Dunkelheit inkubiert wurden. Die Analyse erfolgte mit Hilfe des LSRII von Becton Dickinson, die Auswertung wurde mit FlowJo Version 7.6.5.exe durchgeführt.

4.7 Adipogene und osteogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen

Um die adipogene und osteogene Differenzierung zu stimulieren, wurden spezielle Differenzierungsmedien hergestellt – das adipogene und das osteogene Differenzierungsmedium. Eine Woche nach Aussaat der zu untersuchenden Zellen in einer 6 well Platte mit 5×10^4 Zellen pro well konnte die Differenzierung gestartet werden. In zwei wells wurde Kontrollmedium gegeben, in zwei wells das adipogene und in zwei wells das osteogene Differenzierungsmedium. Mediumwechsel fand zweimal pro Woche statt. Nach 14 Tagen wurde die Differenzierung gestoppt. Um die adipogene Differenzierung nachzuweisen, wurden ein Kontrollwell und ein well mit adipogenem Differenzierungsmedium mit Oil Red angefärbt. Für die Oil Red Stammlösung wurden 0,5g Oil Red in 100ml Isopropanol gelöst. Diese Stammlösung wurde im Verhältnis 3:2 mit destilliertem Wasser verdünnt und 24 Stunden stehen gelassen. Anschließend wurde die Färbelösung filtriert und konnte zur Färbung verwendet werden. Hierfür wurde das Medium in den jeweiligen wells abgesaugt, die Färbelösung zugegeben und bei Raumtemperatur für 30min inkubiert. Nach dreimaligem waschen mit PBS, welches am Ende im well belassen wurde, um ein Austrocknen der Zellen zu vermeiden, konnte die Differenzierung histologisch bewertet werden. Zum Nachweis der osteogenen Differenzierung wurde die Von Kossa Färbung durchgeführt. Dazu wurde das Medium in einem Kontrollwell und einem well mit osteogenem Differenzierungsmedium abgesaugt und die Zellen 5min durch eiskaltes Methanol bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden sie zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen und 5%ige Silbernitratlösung (0,6g Silbernitrat in 12ml destilliertem Wasser) zugegeben, die im Dunkeln inkubierte. Nach 60min wurden die Zellen erneut zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen und mit Natrium-Carbonat-Lösung (5g Natrium-Carbonat in 25ml 36%igem Formalin und 75ml destilliertem Wasser) 2min reduziert. Nachdem erneut zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen wurde, wurde 2min Natrium-Thiosulfat-Lösung (5g Natrium-Thiosulfat in 100ml destilliertem Wasser) zugegeben. Im Anschluss wurde wieder zweimal mit destilliertem

Wasser gewaschen. Um Austrocknen zu vermeiden, wurde das destillierte Wasser zur Dokumentation im well belassen.

4.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)

4.8.1 Efficiency der Primer

Um die Effizienz der Primer zu testen, wurde an drei verschiedenen Tagen eine Test-PCR mit einem bereits analysierten cDNA-Pool gemacht. Der cDNA-Pool für den Primer sMyoD1 bei 60°C bestand aus cDNA von fünf verschiedenen Myoblastenlinien mit je 6µl cDNA pro Myoblastenlinie. Aus diesem Pool wurde eine Verdünnungsreihe von unverdünnt bis zu einer 1:64 Verdünnung hergestellt. Die verschiedenen Ansätze wurden in eine 96well-Platte pipettiert. Als Positiv-Kontrolle wurden 2µl SMC (smooth muscle cell)-cDNA verwendet, auf welcher nach dem Gen Transgelin gesucht wurde. Der Mastermix hierfür bestand aus 10µl SYBR Green, 2µl Tag-Primer und 6µl NTW (non-template water). Für die NTC (non-template control) wurden 2µl NTW als Probe verwendet, der 18µl des Mastermixes für sMyoD1 zugegeben wurde. Der Mastermix für sMyoD1 bestand aus 10µl SYBR Green, 2µl sMyoD1-Primer und 6µl NTW. Darauf folgend wurden die cDNA-Proben unverdünnt und verdünnt je 2mal pipettiert, ebenfalls 2µl pro Probe und 18µl Mastermix sMyoD1 (Abb. 3). Nach Abzentrifugation der 96well-Platte bei 1000rpm für 1min konnte die PCR gestartet werden. Diese wurde mit dem LightCycler® 480 II durchgeführt. Die Efficiency-Bestimmung wurde an drei verschiedenen Tagen durchgeführt, die Auswertung erfolgte mit der LightCycler® 480 Software.

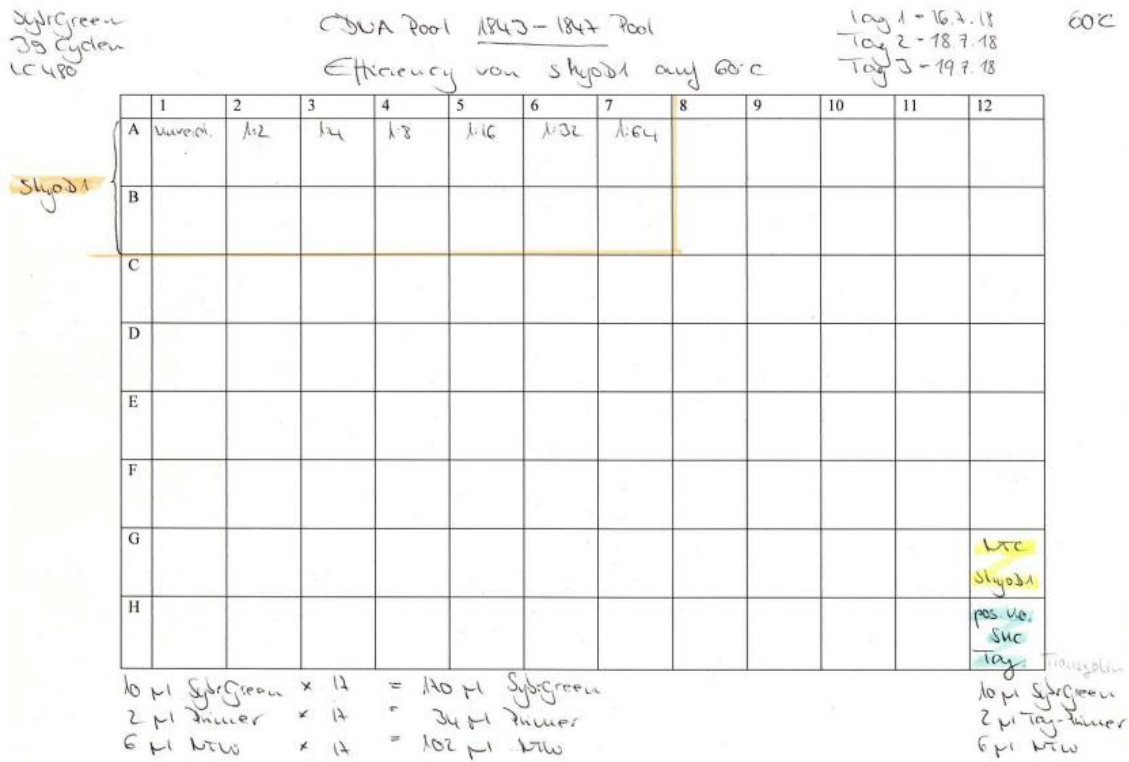


Abbildung 3: Pipettier-Schema zur Efficiency-Bestimmung des Primers sMyoD1 bei 60°C

4.8.2 Polymerasekettenreaktion der isolierten porcinen Muskelprogenitorzellen

Zur Analyse der isolierten sMPCs wurde eine PCR durchgeführt, die nach den Genen sMyf5, sMyf6, sMSTN, sACT und sMyoD1 suchte. Als Referenzgen diente hierbei sB2M (Abb. 4). Die verwendete Positiv-Kontrolle entsprach der der Efficiency-Bestimmung. Für jedes Gen wurde eine NTC erstellt. Der Mastermix für jedes Gen bestand aus 10µl SYBR Green, 2µl des jeweiligen Primers und 6µl NTW. Pipettiert wurde nach untenstehendem Schema (Abb. 4).

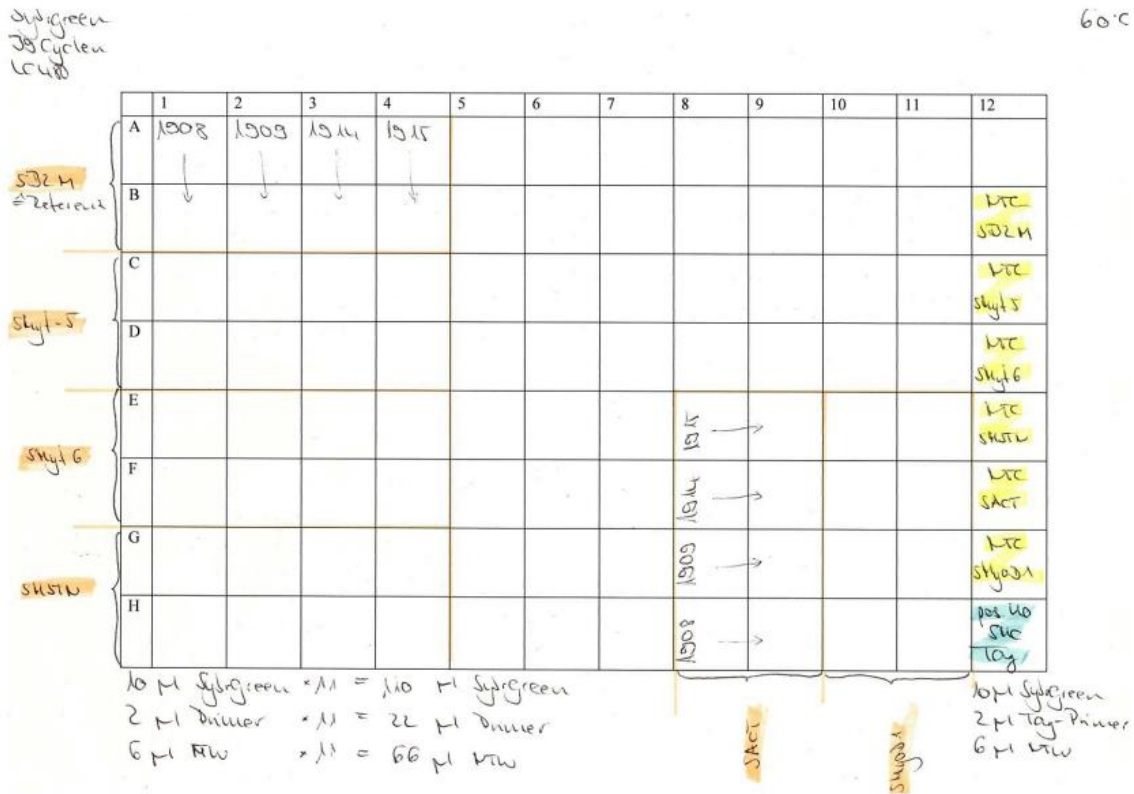


Abbildung 4: Pipettier-Schema zum Nachweis von muskulären Genen in den isolierten Zellen bei 60°C

4.9 Größenbestimmung der porcinen Muskelprogenitorzellen via CASY

Um die Zellen mit der Wasserstrahltechnik von Erbe versprühen zu können, musste die Größe der sMPCs bestimmt werden. So konnte sichergestellt werden, dass die Zellen nicht auf Grund ihrer Größe in der Sonde zerstört werden. Zur Größenbestimmung wurden die Zellen wie gewohnt mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin abgelöst. Nach Abstoppen der Trypsinreaktion mit Vollmedium und anschließender Abzentrifugation wurden die Zellen in 10ml Vollmedium resuspendiert. 100µl dieser Suspension wurden in 10ml CASYTon überführt. Mit dieser Lösung wurde die Messung am CASY durchgeführt.

4.10 Immunfluoreszenzfärbung

4.10.1 Wahl der Zellkulturkammern und Beschichtung

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die Zellen auf sogenannten Chamber Slides mit je 20.000 Zellen pro Chamber ausgesät. Das Ablösen der Zellen erfolgte wie beim Passagieren. Die Zellen wurden mit 500µl Medium versorgt. Um herauszufinden, ob die Zellen auf Chamber Slides aus Glas oder Plastik

besser wachsen, welche Beschichtung und welche Fixierung am besten ist, wurden die Zellen auf Glas Chamber Slides Lab-Tek II ausgesät, je auf unbeschichtetem, gelatine- und kollagenbeschichtetem Träger. Die gleichen Varianten wurden auf Plastik Chamber Slides von Sarstedt getestet.

4.10.1.1 Gelatinebeschichtung

Für die Beschichtung der Chamber Slides wurde die gleiche Gelatinelösung und das gleiche Protokoll verwendet wie für die Beschichtung der T75-Zellkulturflaschen. (Verweis auf 5.3.3)

4.10.1.2 Kollagenbeschichtung

Für die Beschichtung der Chamber Slides wurde die gleiche Kollagenlösung und das gleiche Protokoll verwendet wie für die Beschichtung der T75-Zellkulturflaschen. (Verweis auf 5.3.4)

4.10.2 Paraformaldehyd-Fixierung

Nachdem die Zellen konfluent gewachsen waren, erfolgte die Fixierung mit Paraformaldehyd. Hierfür wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimal mit PBS (+/+), also PBS mit Calcium- und Magnesiumzusatz, gewaschen. Anschließend wurden 200µl 4%iges Paraformaldehyd pro Chamber zugegeben. Nach 15minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Chambers wieder zweimal mit PBS (+/+) gewaschen. Daraufhin wurden je 200µl 0,1% Triton X-100 pro Chamber zugegeben. Nach 10minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Chambers wieder zweimal mit PBS (+/+) gewaschen. Daraufhin konnten die Träger direkt gefärbt oder mit PBS (+/+) bedeckt bei 4°C gelagert werden.

4.10.3 Methanol-Fixierung

Nach Verwerfen des Mediums wurden die Zellen zweimal mit PBS (+/+) gewaschen. Anschließend wurden 200µl eiskaltes Methanol pro Chamber zugegeben und bei -20°C für 10min inkubiert. Nach Entfernung des Methanols wurden die Chamber Slides 10min bei Raumtemperatur getrocknet. Daraufhin folgte erneutes zweimaliges Waschen mit PBS (+/+). Im Anschluss konnten die

Träger direkt gefärbt oder nach Trocknen bei Raumtemperatur bei -20°C gelagert werden.

4.10.4 Antikörper-Färbung

Nach Fixierung der Zellen folgte dreimaliges Waschen mit PBS/0,1% Tween20, welches jeweils für 4min bei Raumtemperatur inkubierte. Im Anschluss erfolgte die Blockierung, die mit 5% Milchpulver-PBS/0,1% Tween20 und 30minütiger Inkubation bei Raumtemperatur stattfand. Nach diesem Schritt wurden die Chambers erneut dreimal je 4min mit PBS/0,1% Tween20 gewaschen.

Um die Antikörper zugeben zu können, mussten diese mit 0,1% BSA(Bovine Serum Albumin) /PBS verdünnt werden. Für die Immunfluoreszenzfärbung der sMPCs wurden Antikörper gegen Desmin (Rabbit-Antikörper), Slow Myosin und Fast Myosin (Mouse-Antikörper) als Erstantikörper verwendet. Desmin wurde 1:200 verdünnt, Fast und Slow Myosin jeweils 1:500. Von jedem Erstantikörper wurden 100µl in ein Chamber gegeben, in die Kontrolle wurden 100µl 0,1% BSA/PBS zugegeben. Nach 90minütiger Inkubation bei 37°C in einer feuchten Kammer wurden die Chamber Slides erneut dreimal je 4min mit PBS/0,1% Tween20 gewaschen. Danach konnten je 100µl des Zweitantikörpers zugegeben werden. Als Zweitantikörper wurde ein anti-mouse bzw. anti-rabbit-Antikörper verwendet, die zuvor 1:300 mit 0,1% BSA/PBS verdünnt wurden. Auch diese Antikörper wurden bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert, allerdings nur 45min. Hierauf folgte ein Waschschrift, wieder dreimal je 4min mit PBS/0,1% Tween20.

Die Kammern, die auf den Objektträgern aufgebracht waren, konnten daraufhin abgelöst werden. Im Anschluss wurde Mounting Medium with DAPI auf die Objektträger gegeben, um die Zellkerne anzufärben. Zum Abschluss wurde ein Deckglas aufgelegt und versiegelt.

Analysiert wurde die Immunfluoreszenzfärbung mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskopes Axiophot von Carl Zeiss Microscopy GmbH.

4.11 PKH26-Färbung

Die PKH26-Markierung erfolgte mindestens 24h vor Verwendung der Zellen. Es wurden T75-Zellkulturflaschen mit subkonfluentem Monolayer benötigt. Für jeden Zelltyp, der gefärbt wurde, wurde ein spezielles „Minus“-Medium hergestellt. Der Färbecocktail wurde direkt vor der Verwendung angesetzt. Für eine T75-Zellkulturflasche wurden 20µl PKH26 in 280µl Diluent gegeben, zudem wurden 1,5ml „Minus“-Medium hinzugefügt. Wichtig war hierbei, den Ansatz vor Lichteinwirkung zu schützen, weshalb Alufolie um das Röhrchen gewickelt und die Färbung in einem abgedunkelten Raum durchgeführt wurde. Zu Beginn des Färbeprozesses wurden die T75-Zellkulturflaschen zweimal mit je 5ml Minus-Medium gewaschen. Das Medium wurde direkt wieder abgesaugt. Anschließend wurden 1,8ml des Färbecocktails pro T75-Zellkulturflasche in diese überführt. Dieser bedeckte den gesamten Flaschenboden. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurde die Färbung mit 5ml des vorbereiteten „Stopp“-Mediums 2min abgestoppt, auch hierbei war das Licht aus. Färbecocktail plus „Stopp“-Medium wurden abgesaugt und die T75-Zellkulturflaschen erneut zweimal mit je 5ml „Minus“-Medium gewaschen. Zuletzt wurden 10ml Vollmedium zugefügt und die Zellen konnten bei Standardbedingungen weiterkultiviert werden. Nach 3h konnte die Fotodokumentation beginnen.

4.12 Versuchsaufbau Sprühversuch in Medium

Um porcine Myoblasten mit dem Water Jet von Erbe und zum Vergleich mit der Williams Nadel von Cook in Medium zu versprühen, wurden die Zellen in 18 T75-Zellkulturflaschen expandiert. Nachdem sie konfluent gewachsen waren, wurden sieben der Flaschen mit PKH26 markiert. Ein Tag nach der PKH26-Markierung wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst und mit Hilfe der Neubauer improved Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt. $1,5 \times 10^7$ Zellen mit PKH26-Markierung wurden in 2,5ml Medium resuspendiert. Von den unmarkierten Myoblasten wurden ebenfalls zweimal $1,5 \times 10^7$ Zellen in 2,5ml Medium resuspendiert, einmal zum Versprühen durch Wasserstrahltechnik und einmal zum Versprühen durch die Williams Nadel. Nach Versprühen der Zellen wurden sie erneut mit Hilfe der Neubauer improved Zählkammer gezählt und die Vitalität der versprühten Zellen bestimmt. Für das Versprühen durch die Wasserstrahltechnik von Erbe war eine

Mitarbeiterin der Firma Erbe anwesend. Es wurden zwei verschiedene Druckprofile verwendet, Profil 1 und Profil 2. Für jedes Druckprofil wurde viermal gesprüht. Bei Fragen zu technischen oder physikalischen Details darf sich gerne an Herrn Prof. Aicher und Herrn Prof. Enderle gewendet werden.

4.13 Versuchsaufbau Sprühversuch in porcines Kadavergewebe

Das Kadavergewebe wurde frisch von einem lokalen Schlachthof bezogen. Die Blase wurde freipräpariert und mit einem ca. 10cm langen Urethraabschnitt abgesetzt. Die Urethra wurde dorsal von distal bis zum Blasen Hals aufgeschnitten. Auf Höhe des Musculus sphincter urethrae externus (in Abb. 5 mit einem schwarzen vertikalen Strich markiert) fand die Zellinjektion mit dem Water Jet von Erbe Elektromedizin GmbH statt. Physikalische und technische Details der Wasserstrahlapplikation sind geistiges Eigentum der Firma Erbe. Für Rückfragen stehen Herr Prof. Aicher und Herr Prof. Enderle gerne zur Verfügung.



Abbildung 5: porcine Blase nach Präparation für Zellinjektion

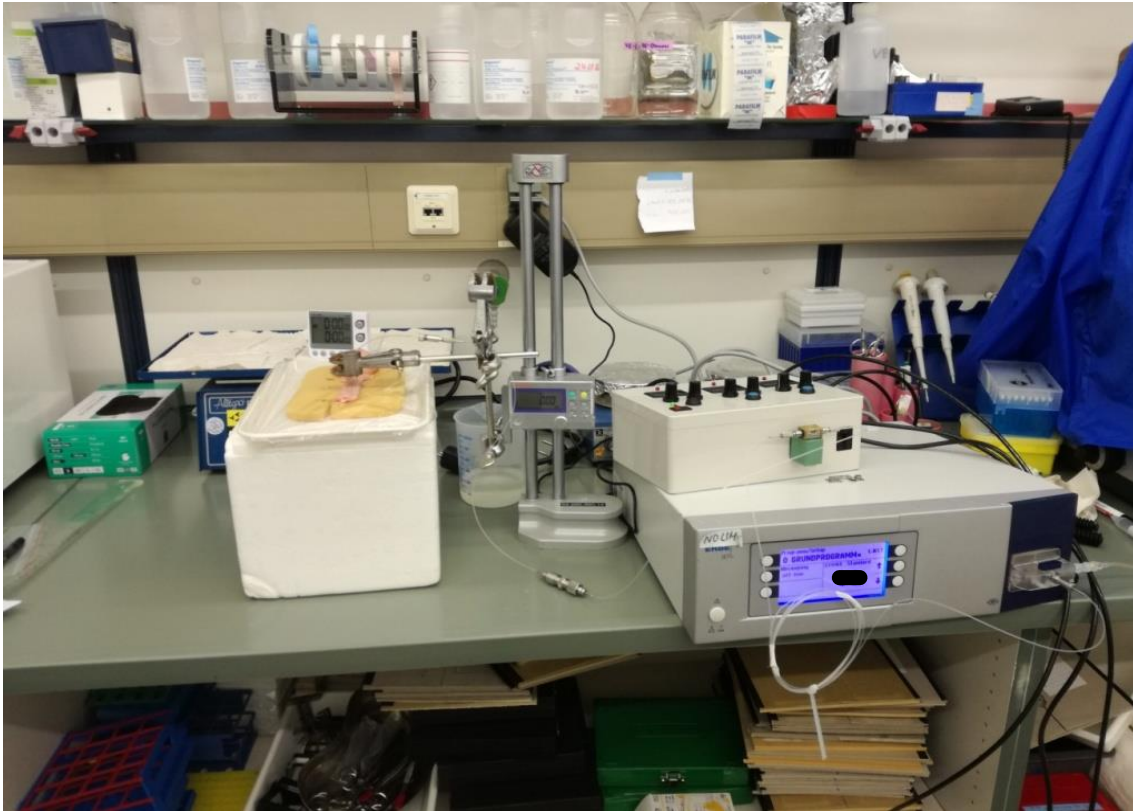


Abbildung 6: Water Jet von Erbe Elektromedizin GmbH - Versuchsaufbau

4.14 Mikroskopie

Die Mikroskopie wurde mit verschiedenen Mikroskopen durchgeführt. Die Durchlicht-Aufnahmen fanden am Primovert von Carl Zeiss Microscopy GmbH statt. Die Bildaufnahmen dazu wurden mit der Mikroskopsoftware ZEISS Efficient Navigation (ZEN) erzeugt. Die mikroskopische Beurteilung der Immunfluoreszenzfärbungen sowie die Histologie der Injektionsversuche der PKH26-markierten Myoblasten in Kadavergewebe wurden am Fluoreszenzmikroskop AxioPhot von Carl Zeiss Microscopy GmbH durchgeführt. Die zugehörigen Bilder wurden hierbei mit AxioVision von ZEISS erzeugt. Zur Beobachtung der PKH26-markierten Zellen im Vorversuch wurde das Axiovert 200M von ZEISS verwendet. Die zugehörige Mikroskopsoftware war hierbei ebenfalls AxioVision von ZEISS.

4.15 In Vivo Imaging System (IVIS)

Zur Detektion der PKH26-markierten sMPCs nach Injektion ins Kadavergewebe wurde ein spezielles Imaging System verwendet, mit dem Fluoreszenzsignale in

Zellkulturen, Kadavergewebe, aber auch im lebenden Tier nachgewiesen werden können. Dies fand in Zusammenarbeit mit dem Werner Siemens Imaging Center in Tübingen unter der Leitung von Prof. Dr. Bernd Pichler statt.

4.16 Histologie des Kadavergewebes

Um nach dem Injektionsversuch von porcinen Myoblasten in Kadavergewebe die Wasserstrahltechnik mit der Nadelinjektion vergleichen zu können, wurden Gefrierschnitte des Gewebes angefertigt. Hierfür wurden die Urethraabschnitte, die die Injektionsblasen enthielten, proximal und distal mit einer Schere abgesetzt und in Tissue Freezing Medium von Leica eingebettet. Nachdem sie in flüssigem Stickstoff eingefroren worden waren, konnten am Kryotom 20µm dicke Schnitte angefertigt werden. Nach Aufnahme auf einen Objektträger wurden die Schnitte mit Hilfe von Mounting Medium with DAPI angefärbt und mit einem Deckglas abgedeckt. Die Schnitte wurden bei -80°C gelagert.

5 Vorversuch zur Etablierung der Methodik

5.1 Injektion von humanen mesenchymalen Stammzellen in Kadavergewebe

5.1.1 PKH26-Markierung

Die zu versprühenden hMSCs der Reihe HNA wurden 24h vor dem Sprühversuch mit PKH26 markiert und anschließend wieder bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, bevor sie abgelöst und für das Sprühen in Kadavergewebe vorbereitet wurden.

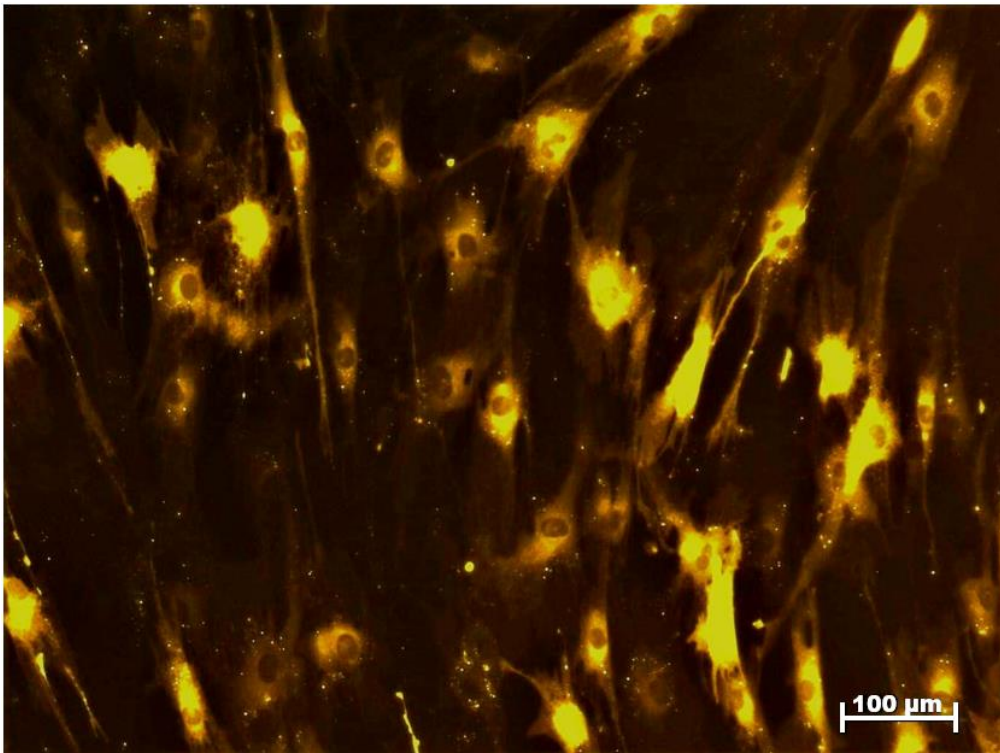


Abbildung 7: PKH26-markierte hMSCs der Reihe HNA 2h nach Markierung

5.1.2 Extraktion und Kolonisierung

Nachdem die Zellen entweder mit einer Williams Cystoscopic Injection Needle von Cook mit 23G oder dem Water Jet von Erbe in porcines Kadavergewebe injiziert wurden, wurden sie mit Hilfe einer 2ml Spritze und einer 18G Kanüle aus dem Gewebe extrahiert. In einer 6 well Platte, in welcher pro well je 2ml des „GMP⁺/P⁺“-Mediums mit hoher Antibiotikakonzentration vorgelegt waren, wurden die extrahierten hMSCs anschließend ausgesät.

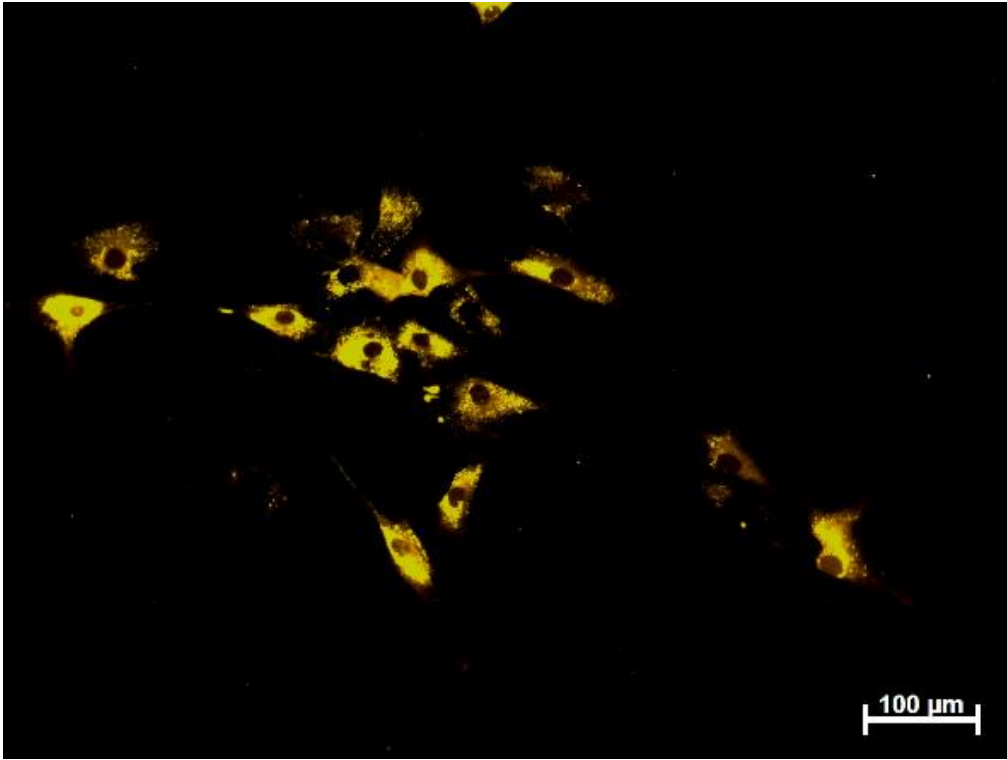


Abbildung 8: extrahierte hMSCs der Reihe HNA nach Water Jet-Injektion in Kadavergewebe nach 1Tag

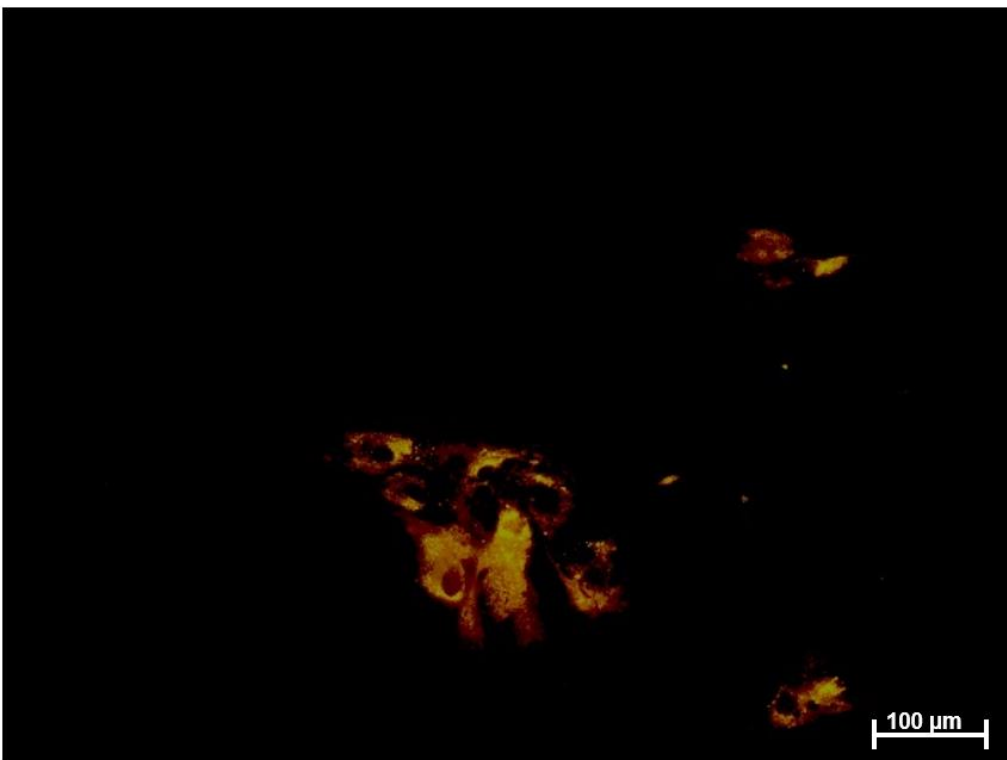


Abbildung 9: extrahierte hMSCs der Reihe HNA nach Water Jet-Injektion in Kadavergewebe nach 2Tagen

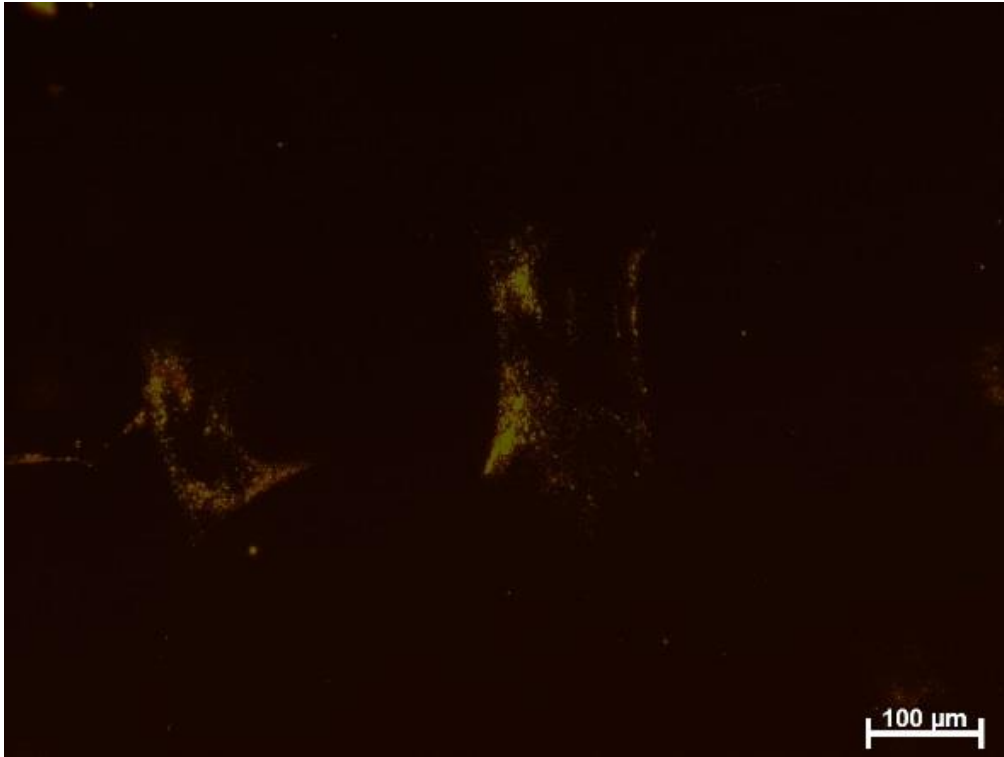


Abbildung 10: extrahierte hMSCs der Reihe HNA nach Water Jet-Injektion in Kadavergewebe nach 12Tagen

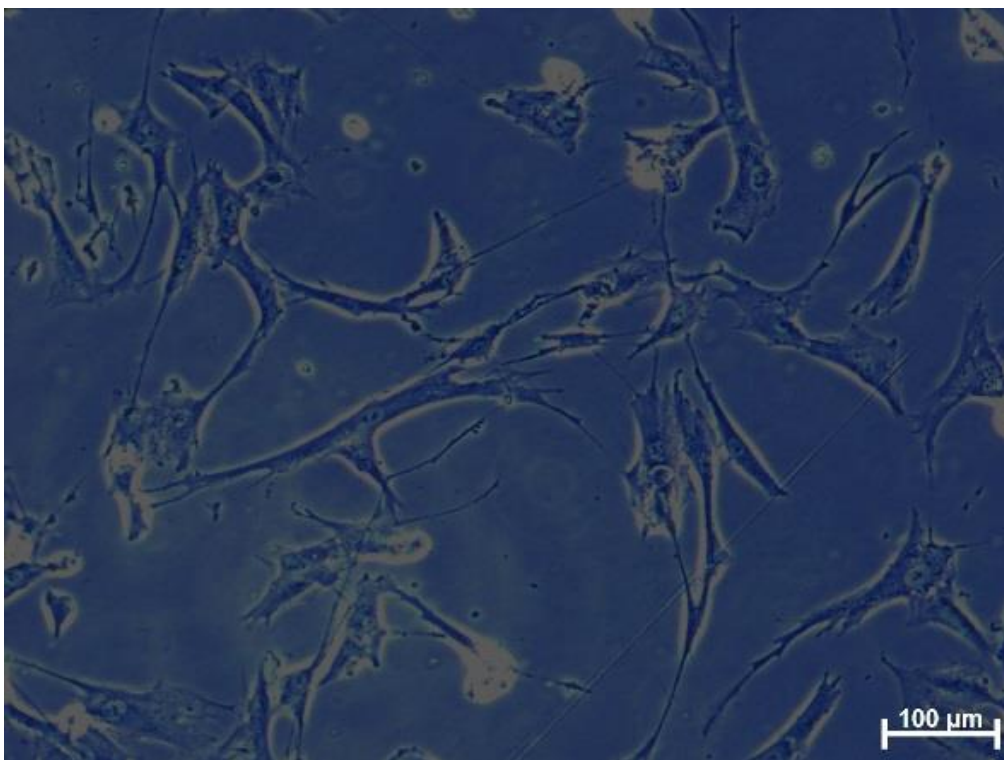


Abbildung 11: extrahierte hMSCs der Reihe HNA nach Water Jet-Injektion in Kadavergewebe nach 13Tagen ohne Fluoreszenz

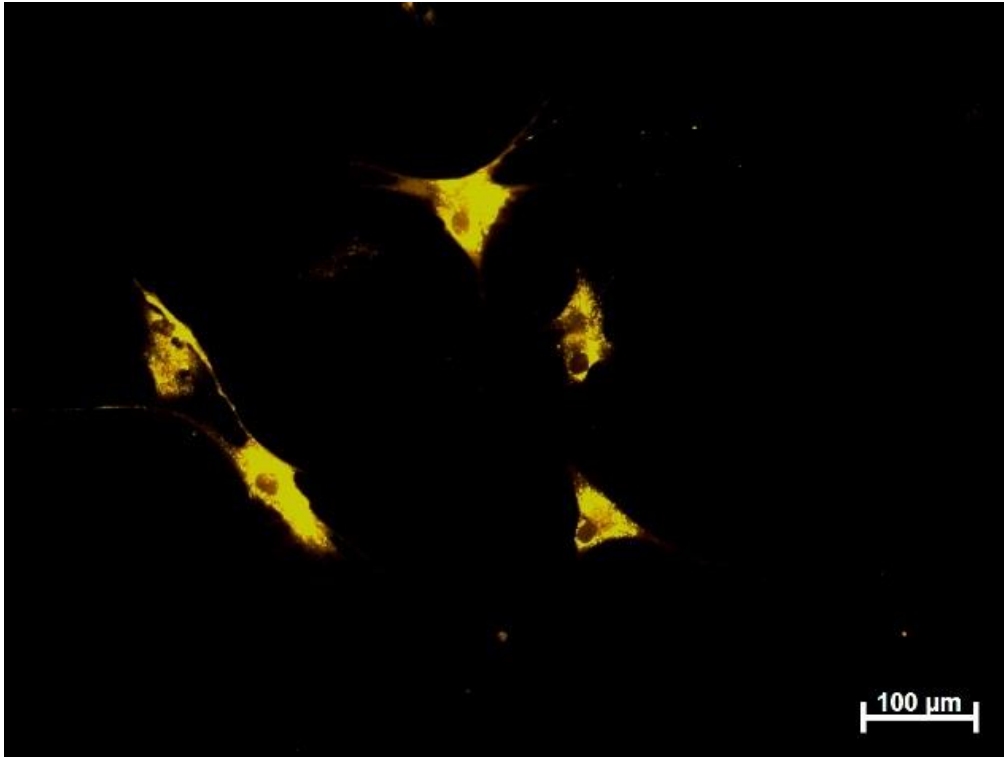


Abbildung 12: extrahierte hMSCs der Reihe HNA nach Injektion mit Williams Nadel nach 1Tag

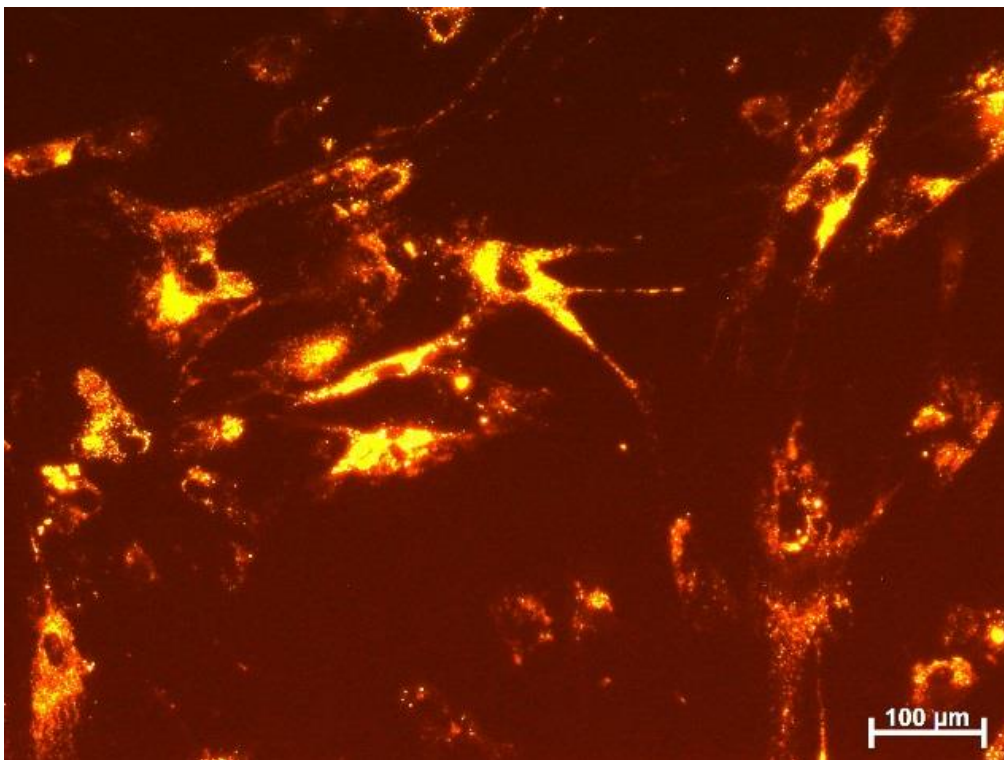


Abbildung 13: extrahierte hMSCs der Reihe HNA nach Injektion mit Williams Nadel nach 6Tagen

Wie in Abbildungen 8 bis 13 ersichtlich, konnten vitale humane mesenchymale Stammzellen sowohl nach Versprühen mit der Wasserstrahltechnik von Erbe als auch mit der Williams Nadel von Cook aus dem Kadavergewebe isoliert werden. Die Zellen wurden in der 6 well Platte expandiert und täglich fotografiert, um die Stärke der PKH26-Fluoreszenz zu dokumentieren. Nach 12 Tagen war kaum mehr Fluoreszenzsignal vorhanden, die Zellen waren aber weiterhin vital und konnten in T75-Zellkulturflaschen passagiert werden, worin sie für weitere Tests expandiert wurden.

5.1.3 Durchflusszytometrie der humanen mesenchymalen Stammzellreihe HNA vor und nach PKH26-Markierung und Sprühversuch in Kadavergewebe

Die Durchflusszytometrie der hMSCs wurde durchgeführt, um herauszufinden, ob sich die Oberflächenmarker der Zellen durch den Kontakt zur Oberfläche der Williams Nadel bzw. zu der des ErbeJets und der wirkenden Kräfte beim Sprühversuch verändern. Bei der Analyse wurden Zellen der Reihe HNA vor Injektion gemessen. Die injizierten Zellen wurden nach dem Versuch aus dem Kadavergewebe extrahiert und in eine 6 well Platte überführt. Nachdem diese expandiert wurden, konnte auch hier die Durchflusszytometrie durchgeführt werden. Versprüht wurde die HNA in der 3. Passage. Die Durchflusszytometrie fand bei allen Analysen in der 4. Passage statt. Analysiert wurden die Positivmarker CD90 und CD73, die Negativmarker CD14 und CD34, sowie der osteogene Marker CD146.

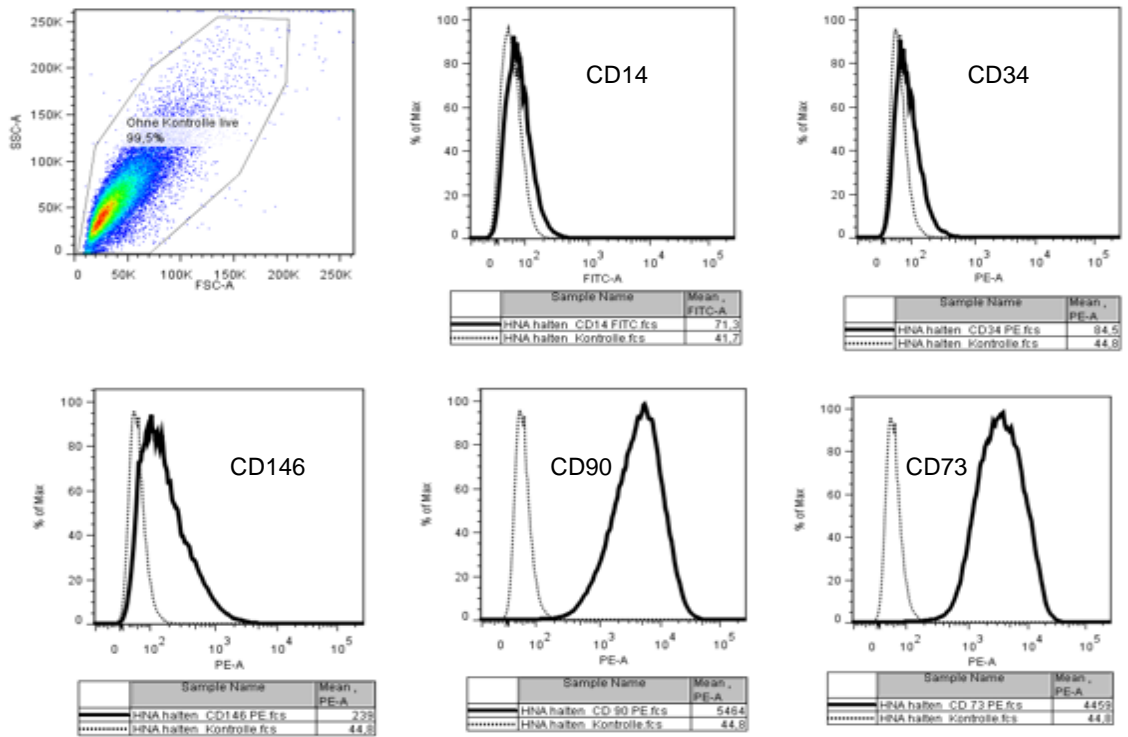


Abbildung 14: Auswertung der Durchflusszytometrie der nicht-injizierten hMSCs der Reihe HNA

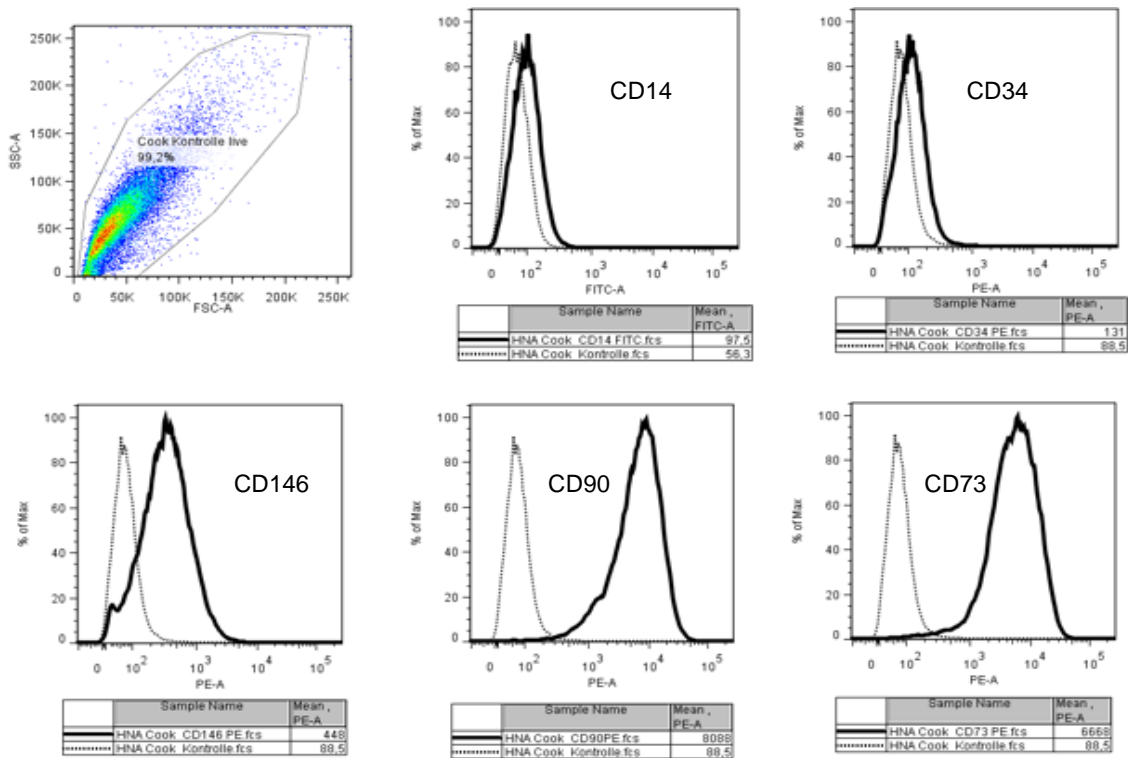


Abbildung 15: Auswertung der Durchflusszytometrie der hMSCs der Reihe HNA nach Injektion mit Williams Nadel

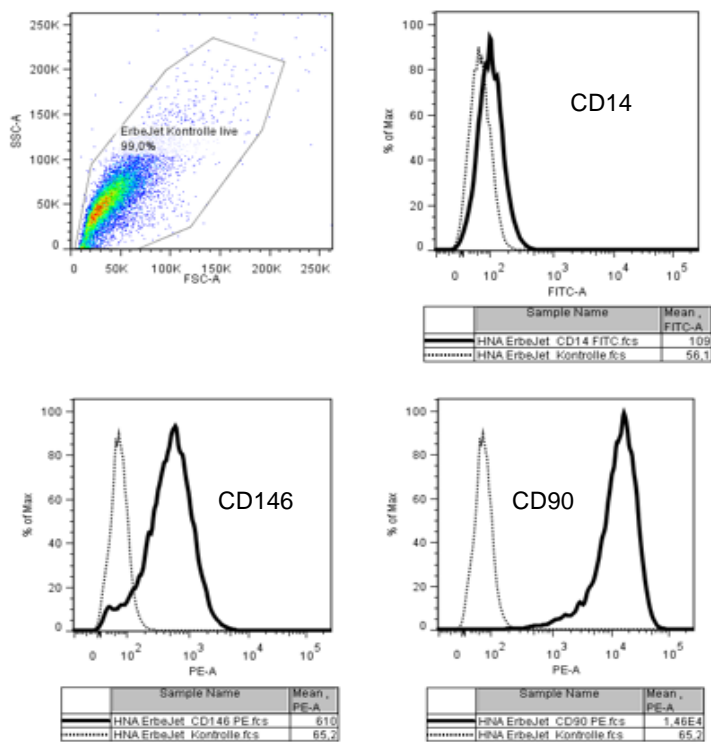


Abbildung 16: Auswertung der Durchflusszytometrie der hMSCs der Reihe HNA nach Injektion mit Wasserstrahl

Aus den Diagrammen in den Abbildungen 12 bis 14 wird erkennbar, dass sich die Expression der Oberflächenmarker auf den hMSCs durch die Injektion via Wasserstrahl und via Williams Nadel nicht verändert.

5.1.4 Adipogene und osteogene Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen

Um die Kriterien für Stammzellen zu erfüllen, wurde die Zellreihe HNA der humanen mesenchymalen Stammzellen auf ihre Fähigkeit zur adipogenen und osteogenen Differenzierung getestet. Diese ließ sich in beide Richtungen sehr gut stimulieren, womit eines der drei Dominici-Kriterien für diese Zellreihe bestätigt wurde. Allerdings fiel auf, dass auch in den Kontrollen adipogene und osteogene Differenzierung stattfand, wenn auch nur in deutlich geringerem Maße.

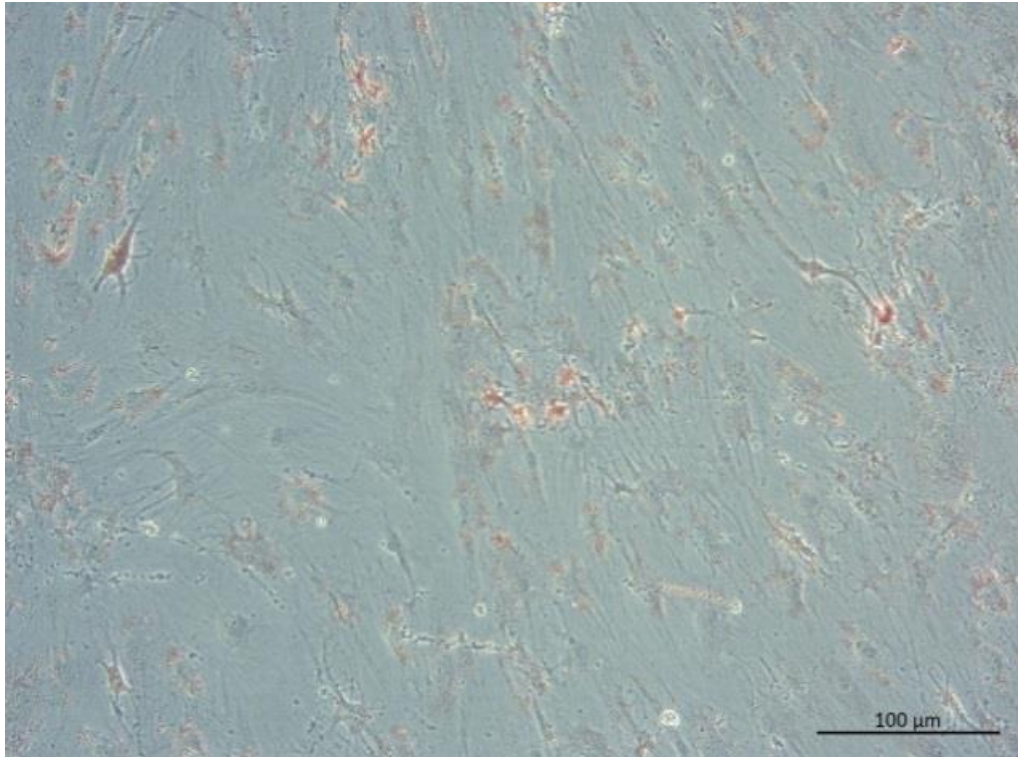


Abbildung 17: Kontrollfeld mit hMSCs der Reihe HNA ohne Zusatz von Differenzierungsmedium mit Oil Red-Färbung

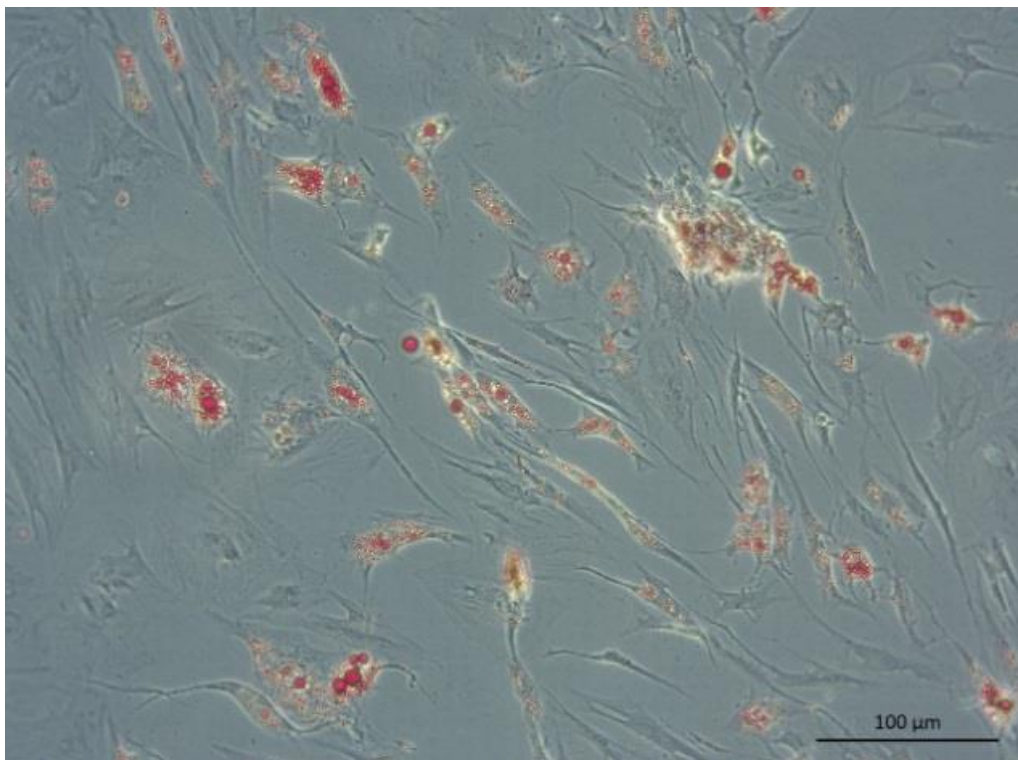


Abbildung 18: hMSCs der Reihe HNA nach Zugabe von adipogenem Differenzierungsmedium mit Oil Red-Färbung

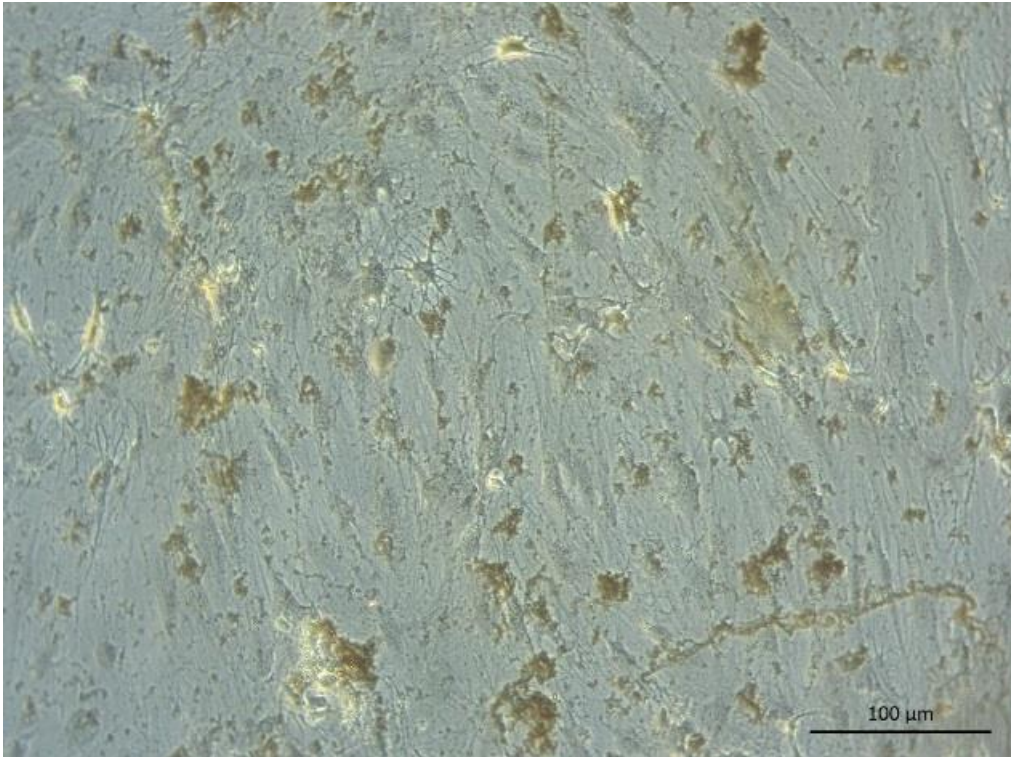


Abbildung 19: Kontrollfeld mit hMSCs der Reihe HNA ohne Zusatz von Differenzierungsmedium mit von Kossa-Färbung

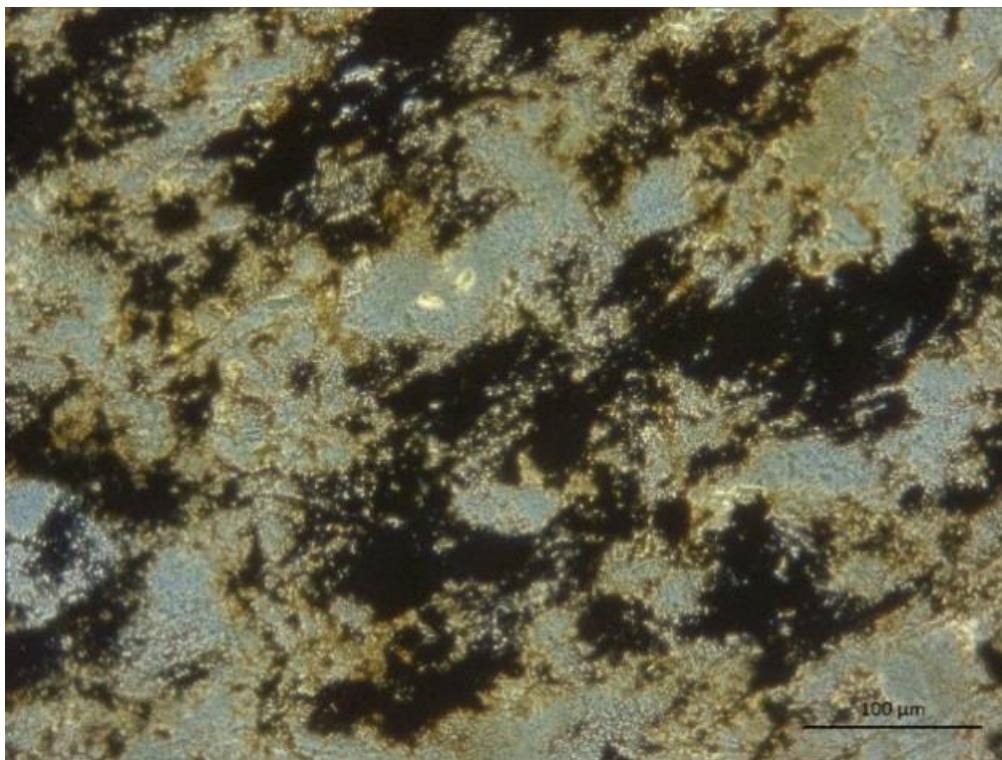


Abbildung 20: hMSCs der Reihe HNA nach Zugabe von osteogenem Differenzierungsmedium mit von Kossa-Färbung

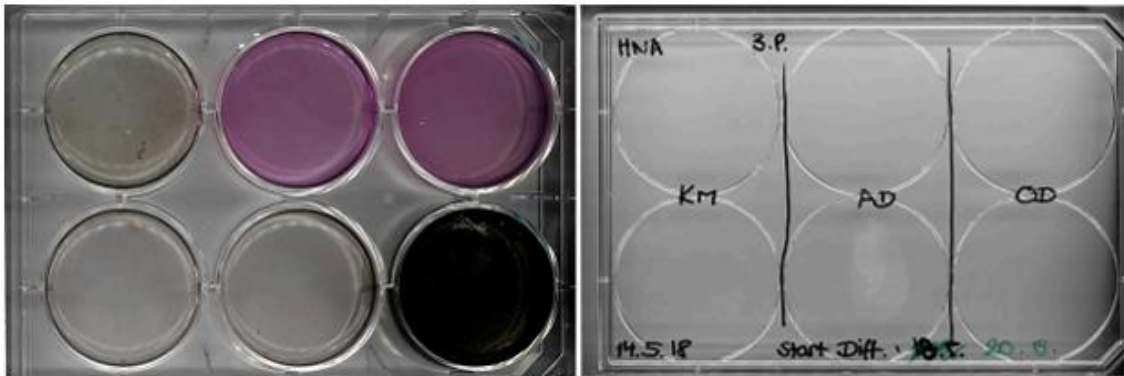


Abbildung 21: adipogene und osteogene Differenzierungsplatte der hMSCs der Reihe HNA

5.2 PKH26-Markierung von humanen und porcinen Muskelprogenitorzellen (hMPCs und sMPCs)

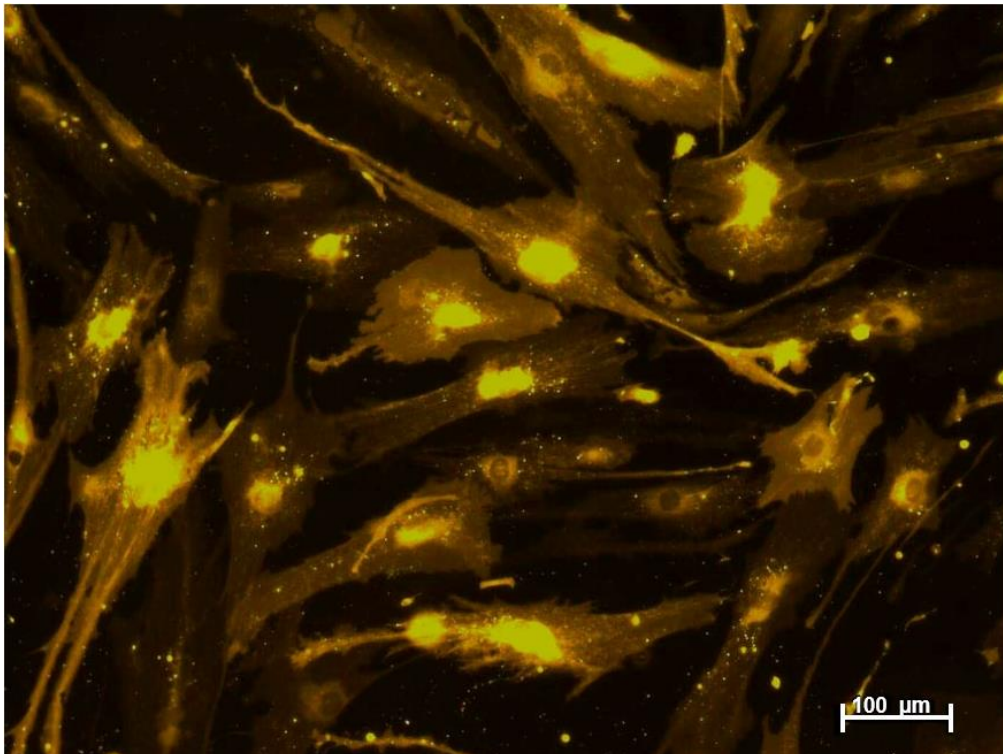


Abbildung 22: PKH26-markierte hMPCs 2h nach Markierung

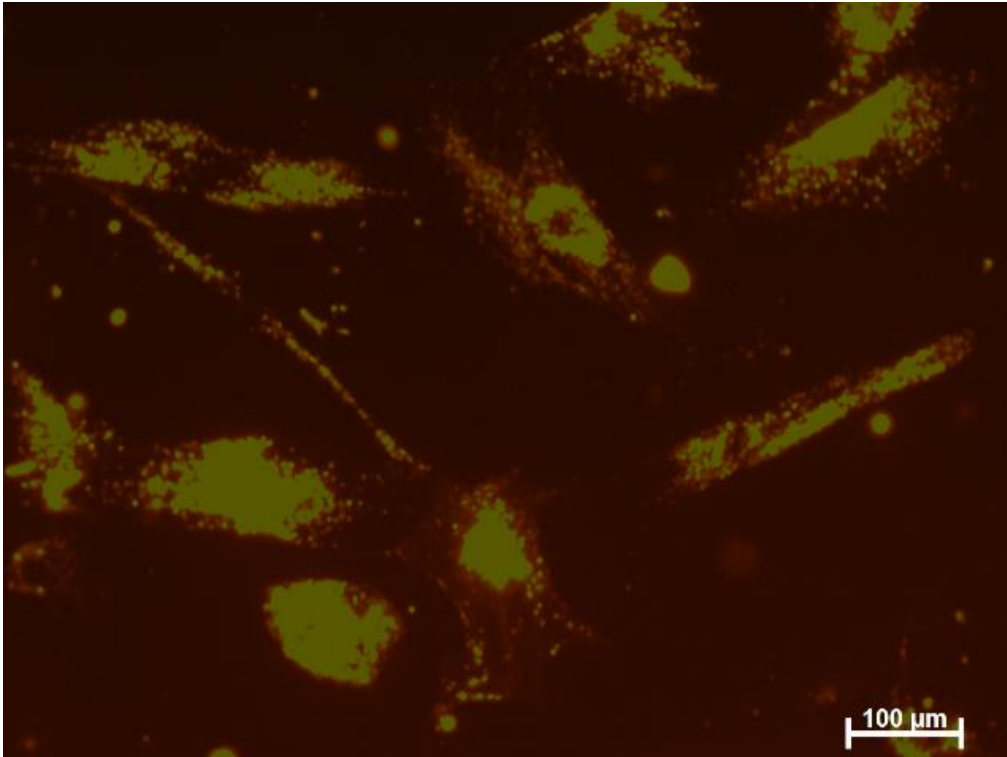


Abbildung 23: PKH26-markierte hMPCs 9Tage nach Markierung

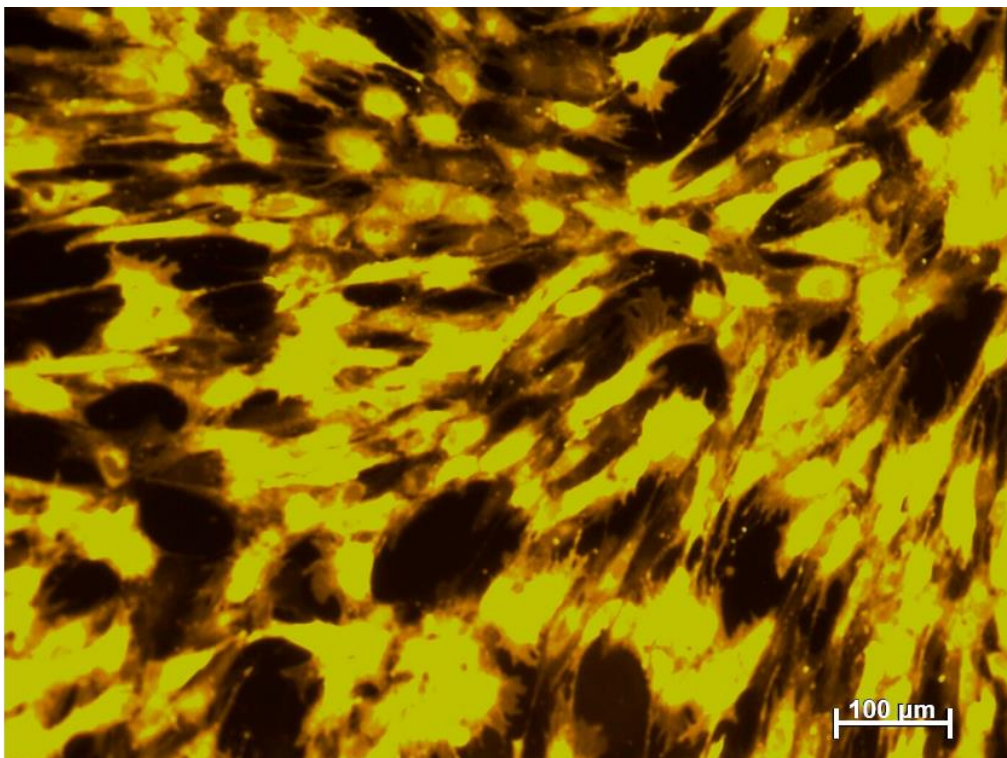


Abbildung 24: PKH26-markierte sMPCs 2h nach Markierung

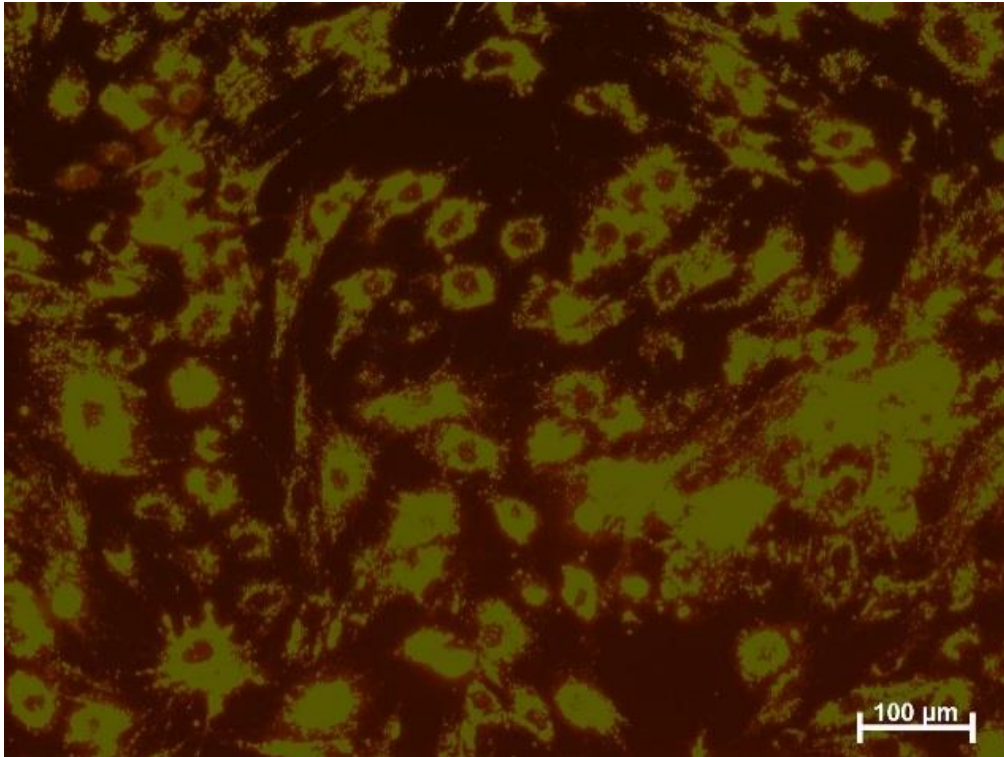


Abbildung 25: PKH26-markierte sMPCs 9Tage nach Markierung

Die PKH26-Markierung wurde an sMPCs und hMPCs durchgeführt, um die Dauer des Fluoreszenzsignals in muskulären Zellen zu beurteilen. Diese Dauer musste bekannt sein, um in späteren Sprühversuchen von markierten Zellen in Kadavergewebe oder auch in lebende Tiere die markierten Zellen wieder lokalisieren zu können. Da das Signal auch nach neun Tagen noch sehr stark war, konnte man davon ausgehen, dass diese Markierung ausreicht, um markierte Myoblasten im Kadavergewebe histologisch zu beurteilen oder diese am lebenden Tier drei Tage postoperativ wieder detektieren zu können.

5.3 Immunfluoreszenzfärbung von porcinen Muskelprogenitorzellen

5.3.1 Wahl der Zellkulturkammern und Beschichtung

In der Vorbereitung zur Immunfluoreszenzfärbung wurden porcine Muskelvorläuferzellen der Reihe sMPC20 auf Chamber Slides aus Glas und Plastik ausgesät, die entweder unbeschichtet, mit Gelatine oder mit Kollagen beschichtet waren. Eine Dokumentation des Zellzustands fand an Tag 2 und an Tag 4 nach Aussaat der Zellen statt.

5.3.1.1 sMPC20 auf unbeschichteten Chamber Slides

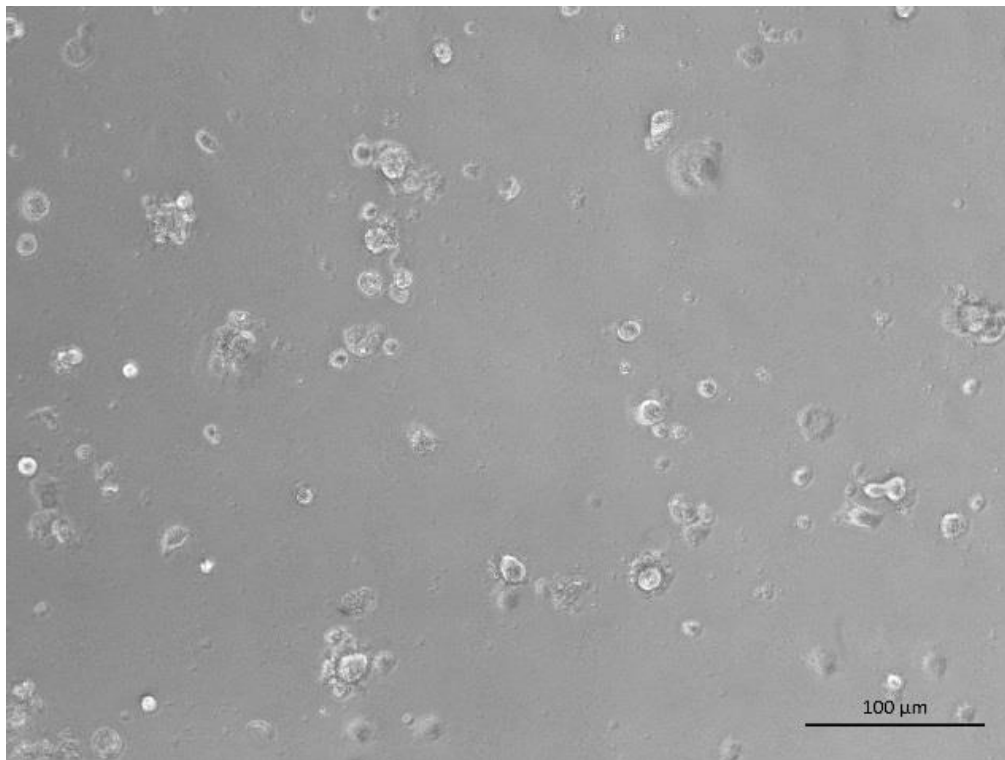


Abbildung 26: sMPC20 auf unbeschichteten Chamber Slides aus Glas nach 2 Tagen

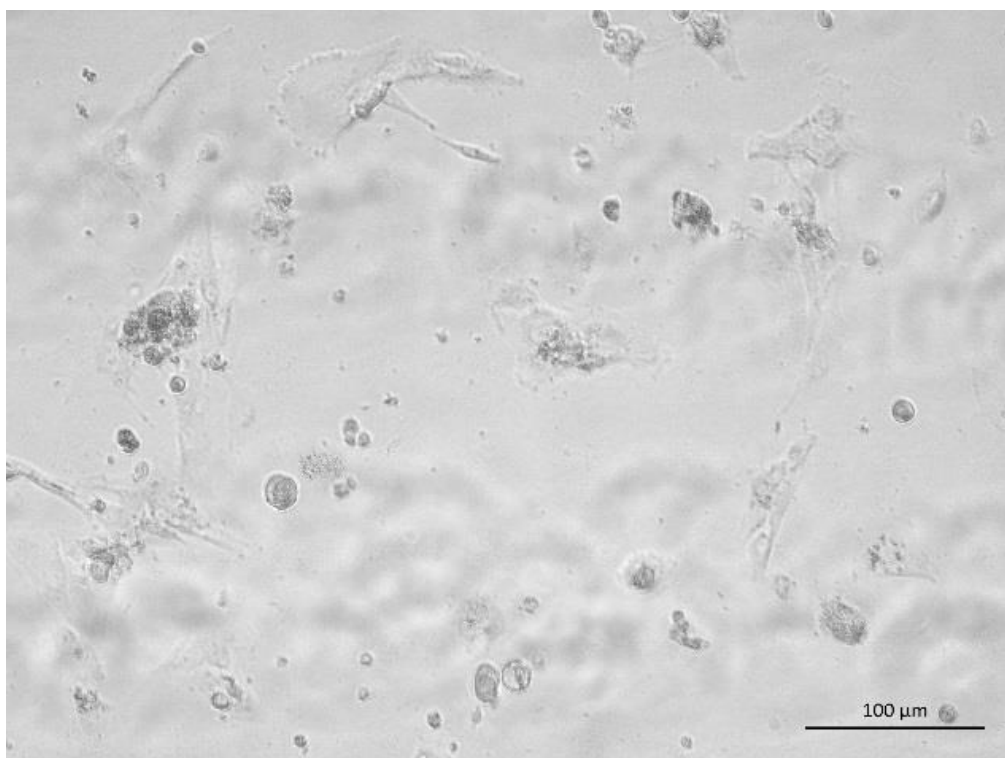


Abbildung 27: sMPC20 auf unbeschichteten Chamber Slides aus Plastik nach 2 Tagen

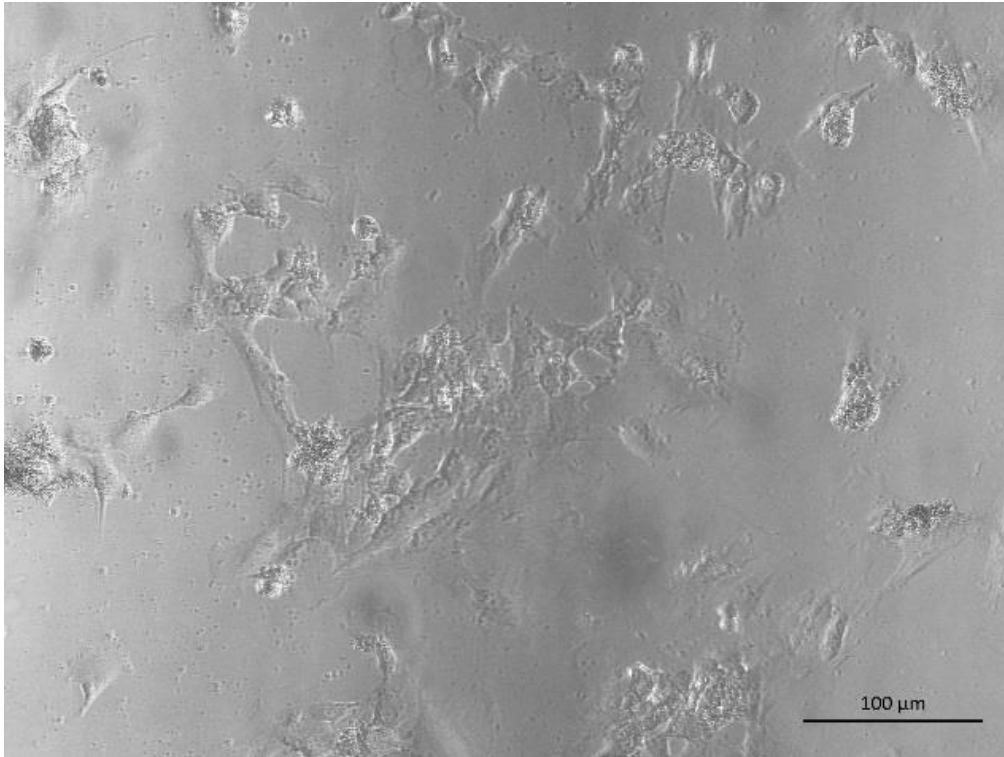


Abbildung 28: sMPC20 auf unbeschichteten Chamber Slides aus Plastik nach 4 Tagen

5.3.1.2 sMPC20 auf gelatinebeschichteten Chamber Slides

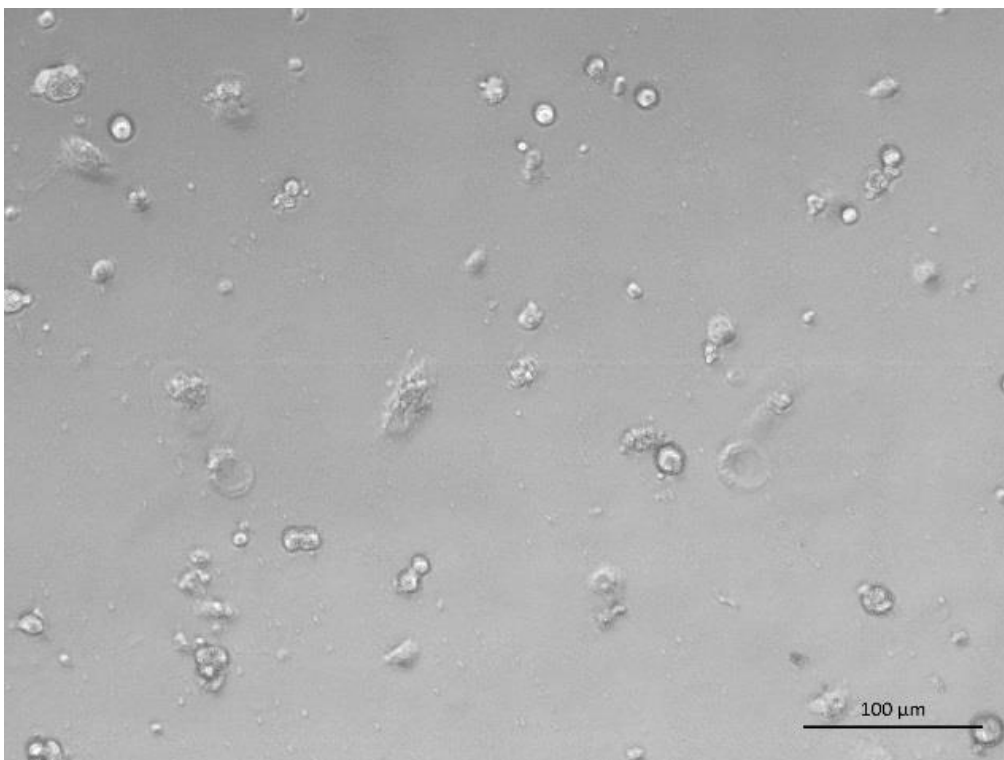


Abbildung 29: sMPC20 auf gelatinebeschichteten Chamber Slides aus Glas nach 2 Tagen

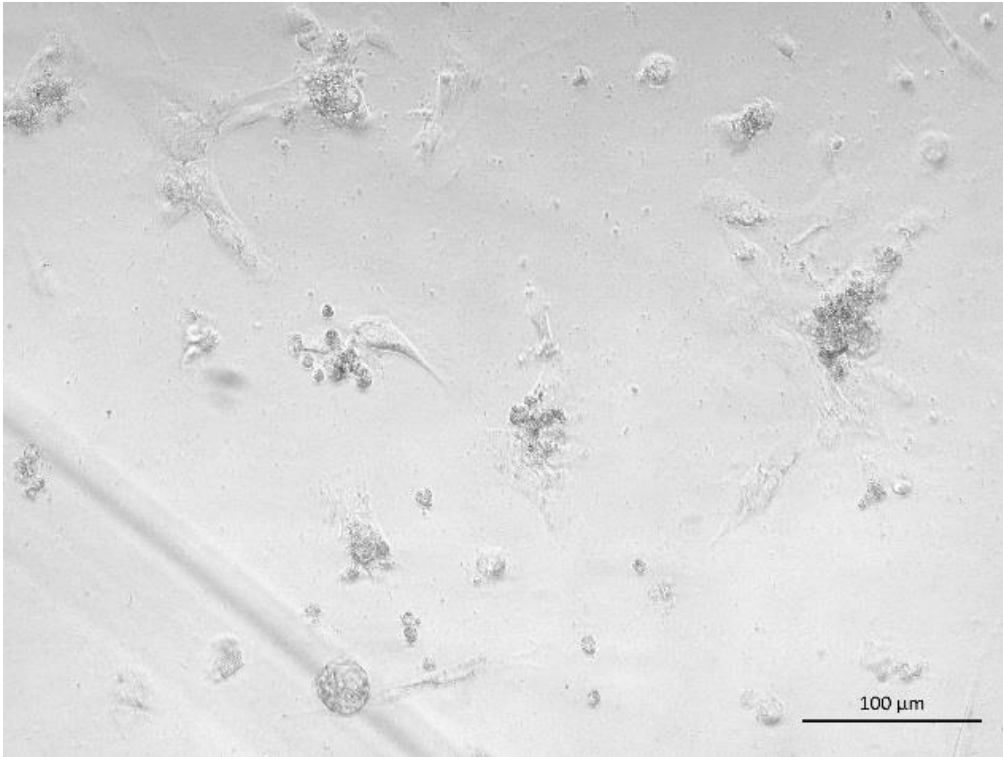


Abbildung 30: sMPC20 auf gelatinebeschichteten Chamber Slides aus Plastik nach 2 Tagen

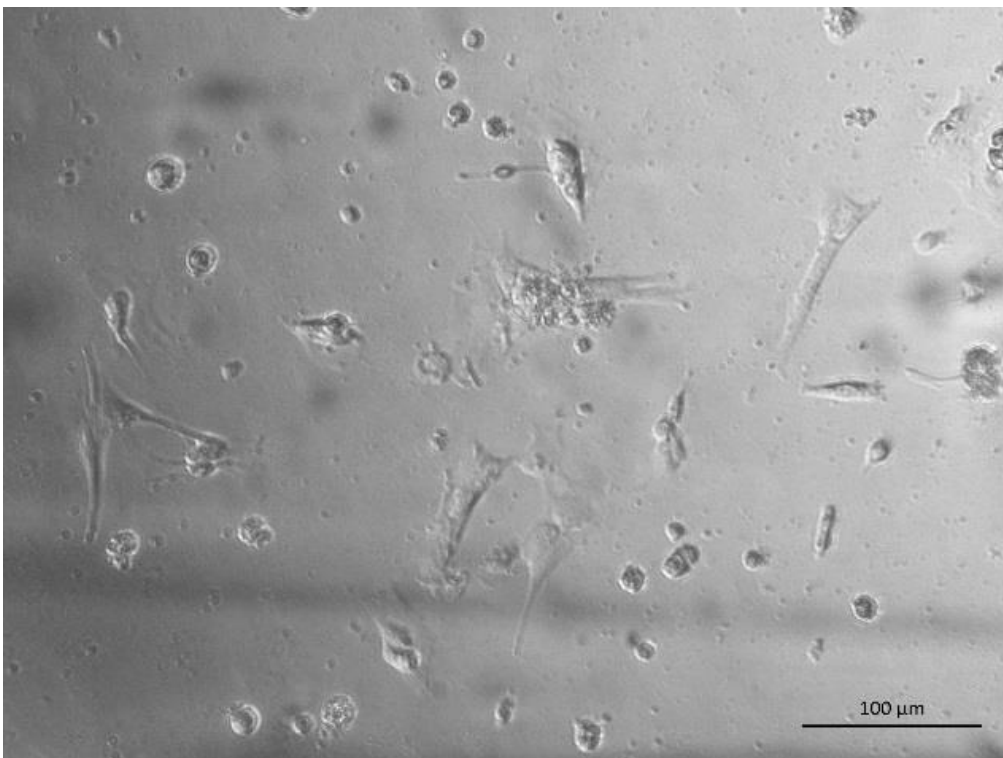


Abbildung 31: sMPC20 auf gelatinebeschichteten Chamber Slides aus Plastik nach 4 Tagen

5.3.1.3 sMPC20 auf kollagenbeschichteten Chamber Slides

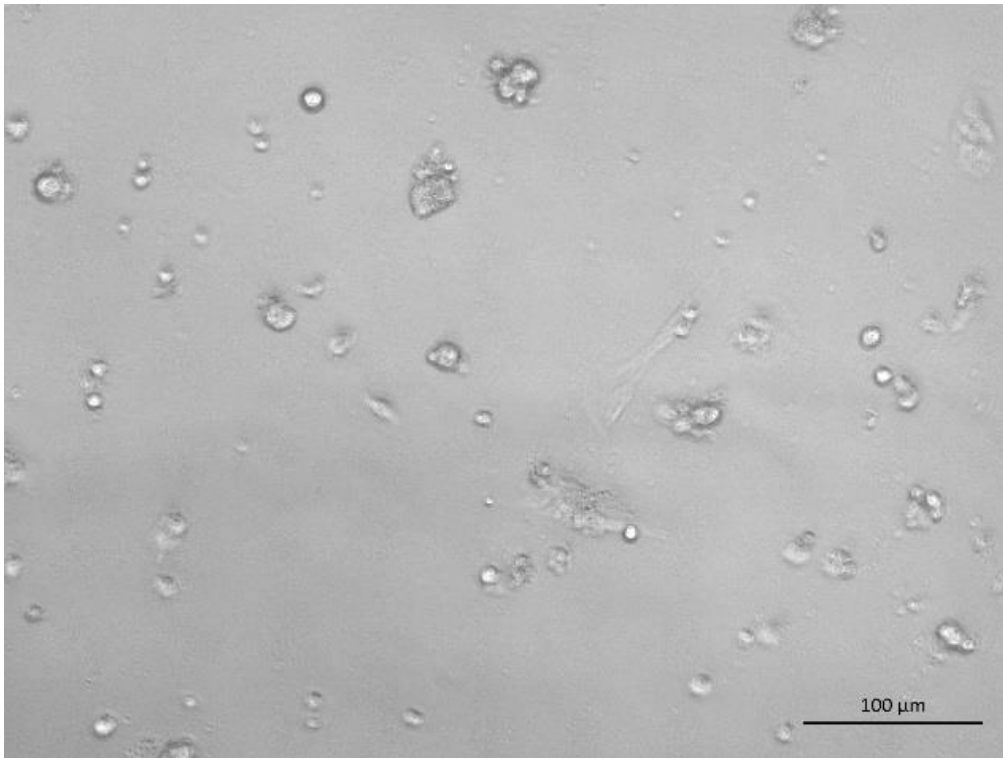


Abbildung 32: sMPC20 auf kollagenbeschichteten Chamber Slides aus Glas nach 2 Tagen

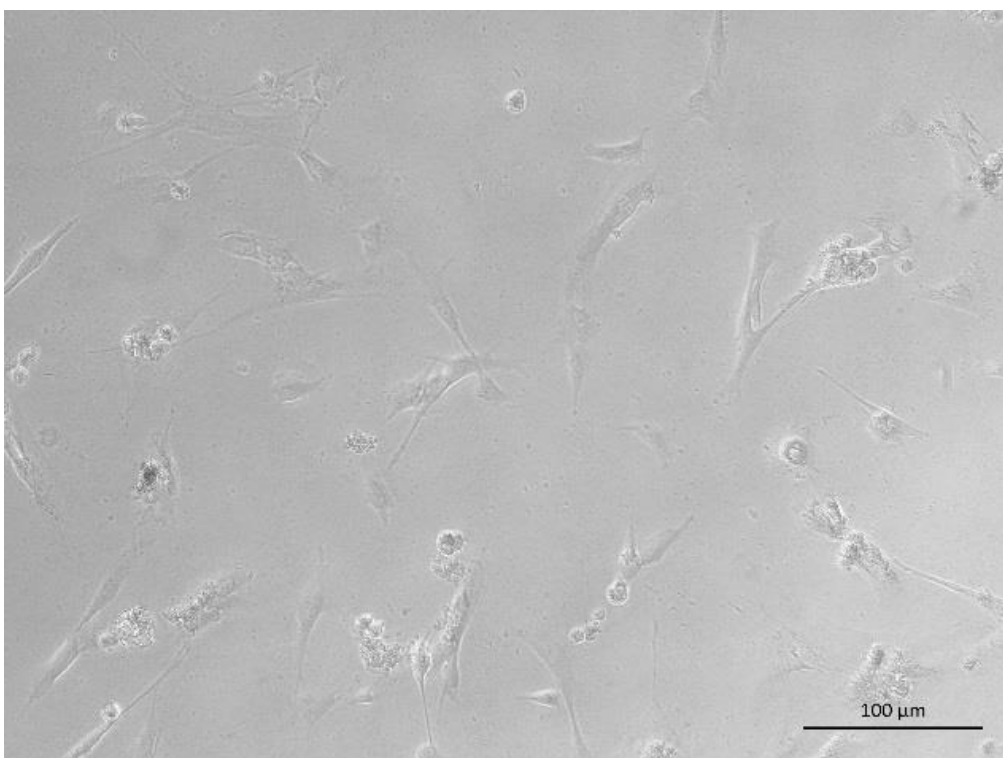


Abbildung 33: sMPC20 auf kollagenbeschichteten Chamber Slides aus Plastik nach 2 Tagen

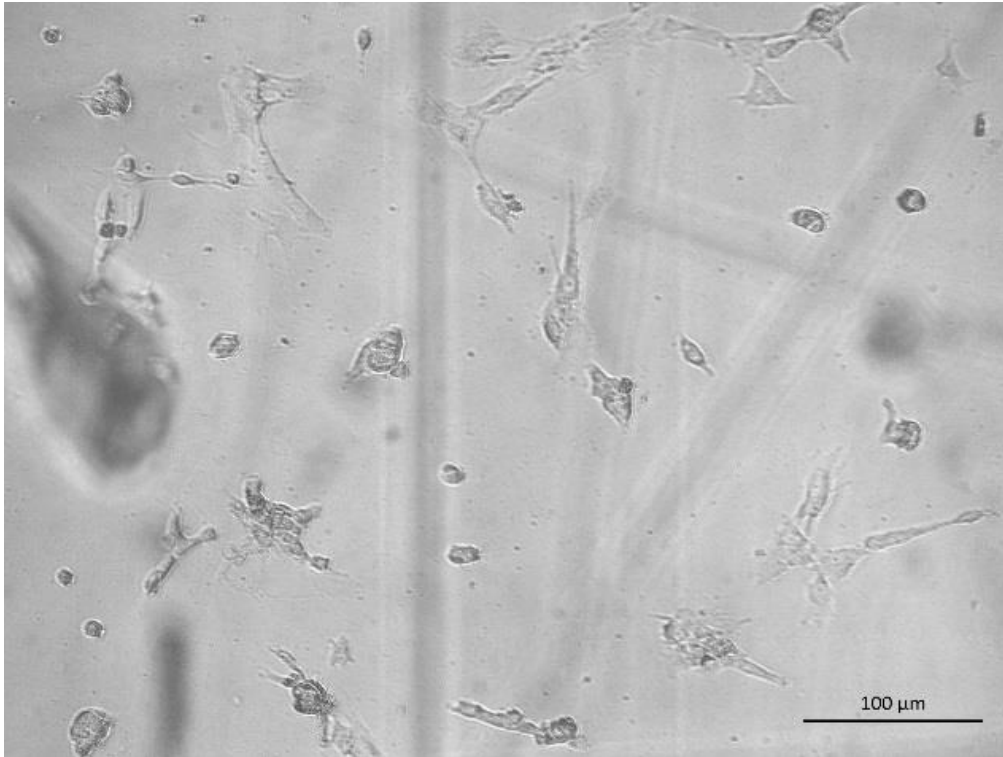


Abbildung 34: sMPC20 auf kollagenbeschichteten Chamber Slides aus Plastik nach 4 Tagen

Bei Testung der verschiedenen Chamber Slides mit unterschiedlichen Beschichtungen fiel auf, dass die sMPCs auf Glas nicht anhafteten und nicht proliferierten. Bereits an Tag 2 konnten keine lebenden Zellen mehr gefunden werden, sodass alle Chamber Slides aus Glas verworfen wurden. Bei den Chamber Slides aus Plastik wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen erneut 2 Tage inkubiert. Interessanterweise waren auf den unbeschichteten Objektträgern die meisten vitalen Zellen zu finden. Sowohl bei Kollagen- als auch bei Gelatinebeschichtung waren deutlich mehr tote Zellen vorhanden. Des Weiteren hatte sich im Vergleich von Tag 2 zu Tag 4 die Zahl der toten Zellen auf allen Objektträgern vergrößert.

5.3.2 Fixierung der Zellen

Um nach der Fixierung noch möglichst viele strukturell intakte Zellen auf den Objektträgern vorfinden zu können, wurden zwei verschiedene Fixierungsmethoden bei allen Beschichtungsvarianten getestet.

5.3.2.1 Paraformaldehyd (PFA) -Fixierung der sMPC20 auf Chamber Slides aus Plastik mit unterschiedlichen Beschichtungen

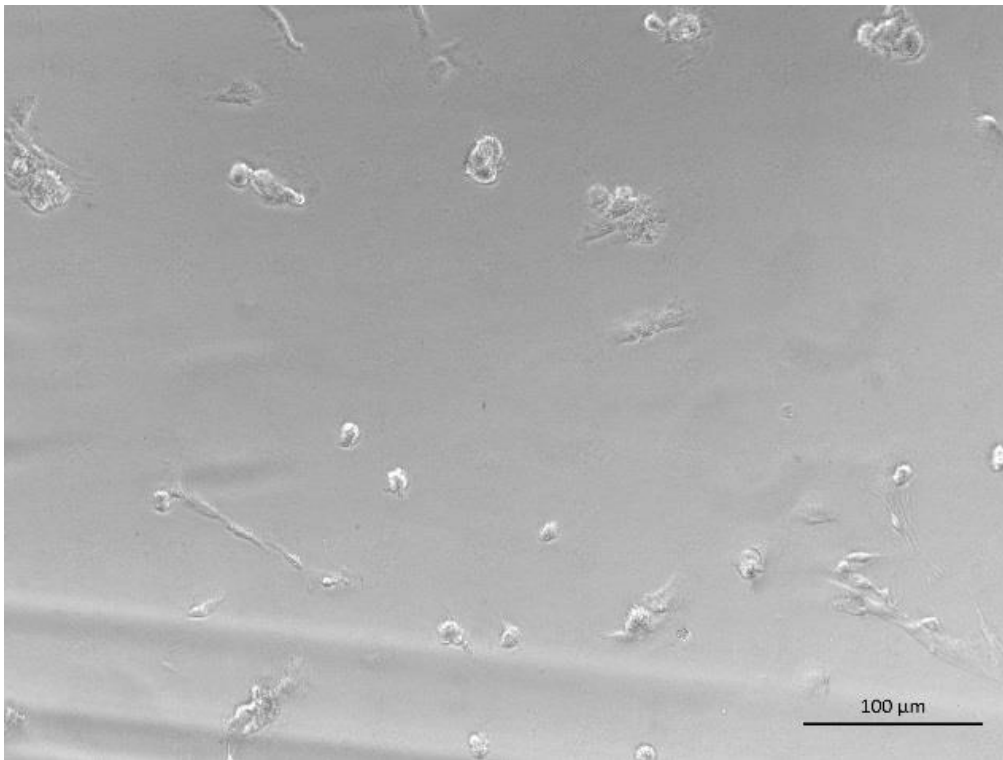


Abbildung 35: sMPC20 auf unbeschichteten Chamber Slides aus Plastik nach PFA-Fixierung

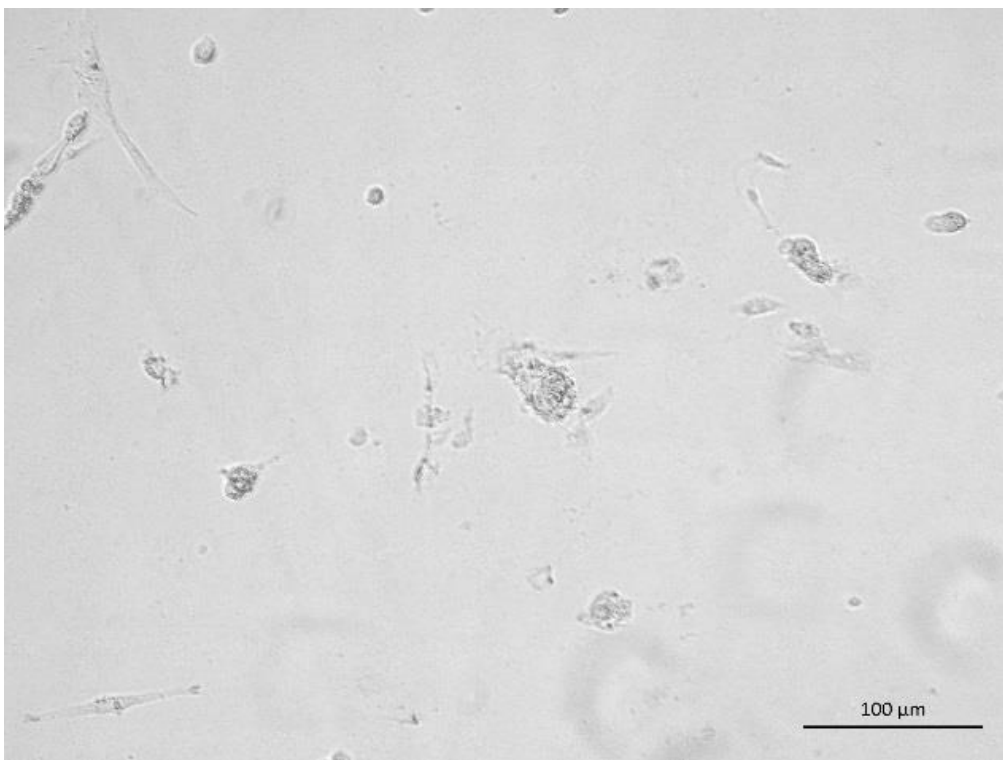


Abbildung 36: sMPC20 auf gelatinebeschichteten Chamber Slides aus Plastik nach PFA-Fixierung

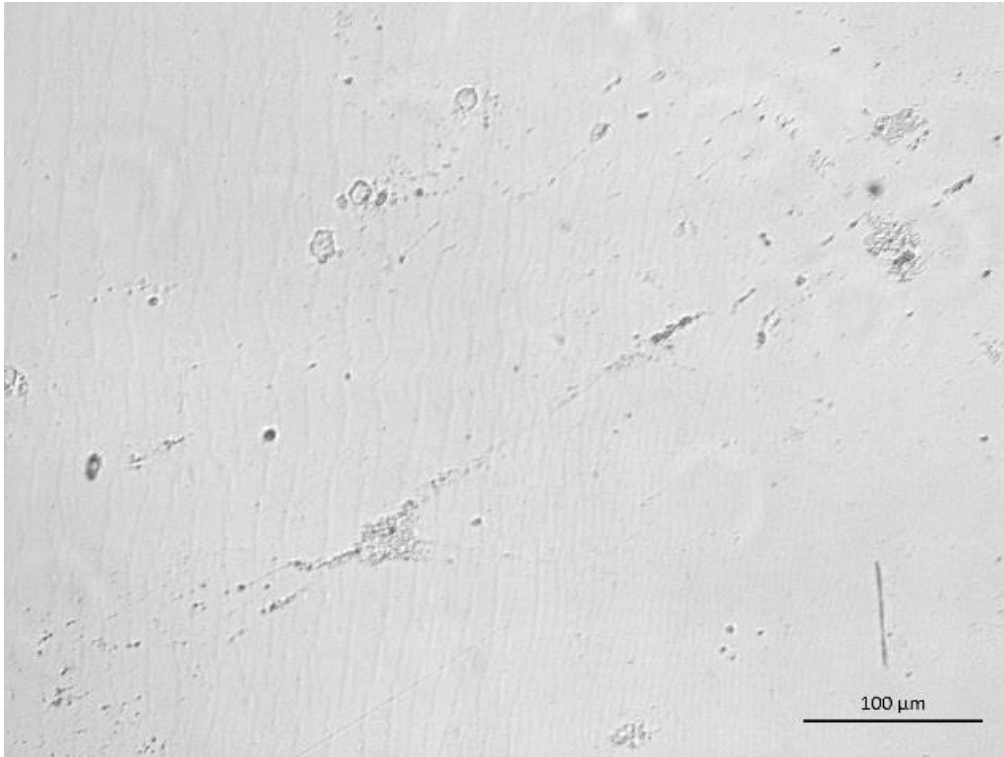


Abbildung 37: sMPC20 auf kollagenbeschichteten Chamber Slides aus Plastik nach PFA-Fixierung

5.3.2.2 Methanol-Fixierung der sMPC20 auf Chamber Slides aus Plastik mit unterschiedlichen Beschichtungen

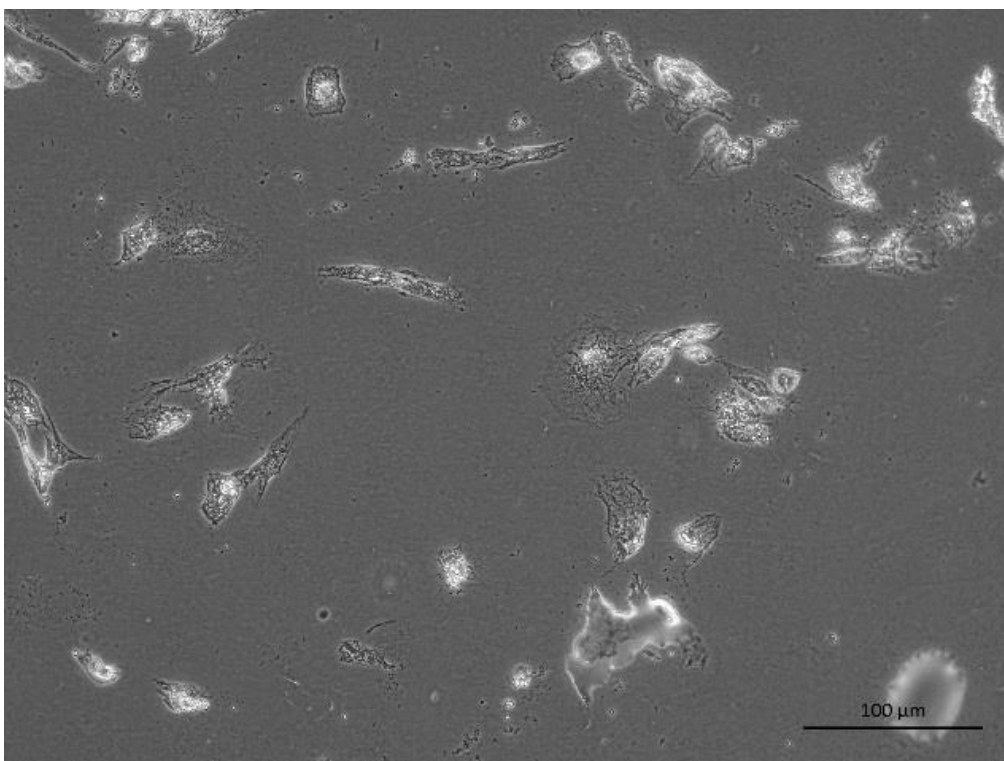


Abbildung 38: sMPC20 auf unbeschichteten Chamber Slides aus Plastik nach Methanol-Fixierung

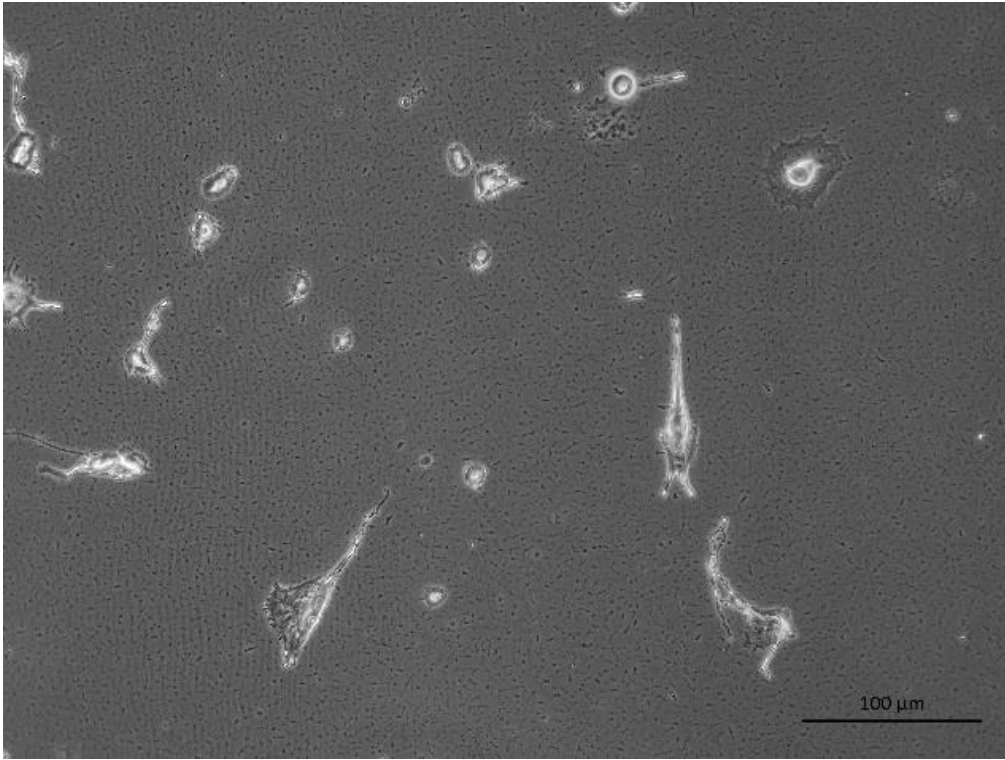


Abbildung 39: sMPC20 auf gelatinebeschichteten Chamber Slides aus Plastik nach Methanol-Fixierung

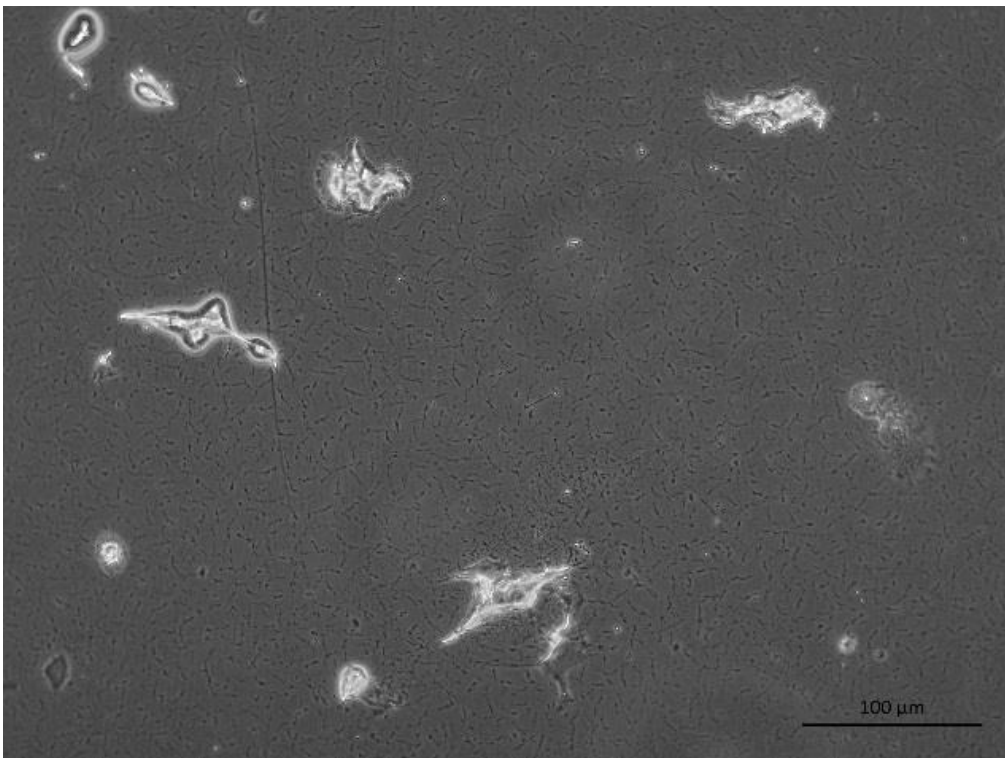


Abbildung 40: sMPC20 auf kollagenbeschichteten Chamber Slides aus Plastik nach Methanol-Fixierung

Der Vergleich von Paraformaldehyd- und Methanol-Fixierung ergab eine deutlich höhere Zahl an fixierten Zellen bei Fixierung durch Methanol. Auch hier war eine Überlegenheit der unbeschichteten Objektträger erkennbar.

5.3.3 Antikörper-Färbung der sMPC20 auf Chamber Slides aus Plastik mit unterschiedlichen Beschichtungen

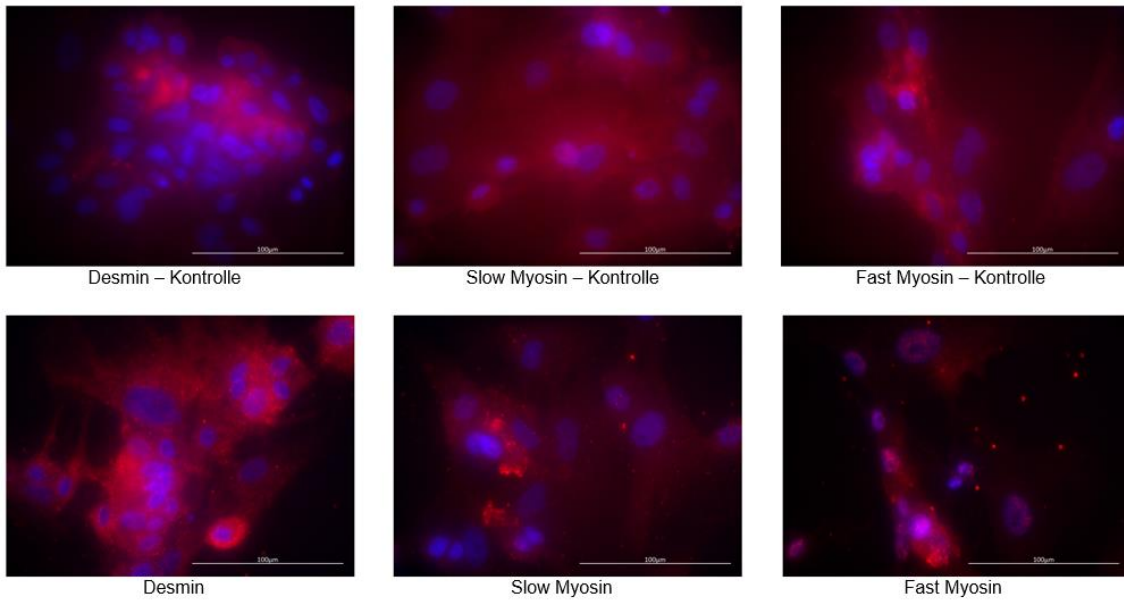


Abbildung 41: Antikörper-Färbung der sMPC20 auf unbeschichtetem Chamber Slide aus Plastik nach PFA-Fixierung

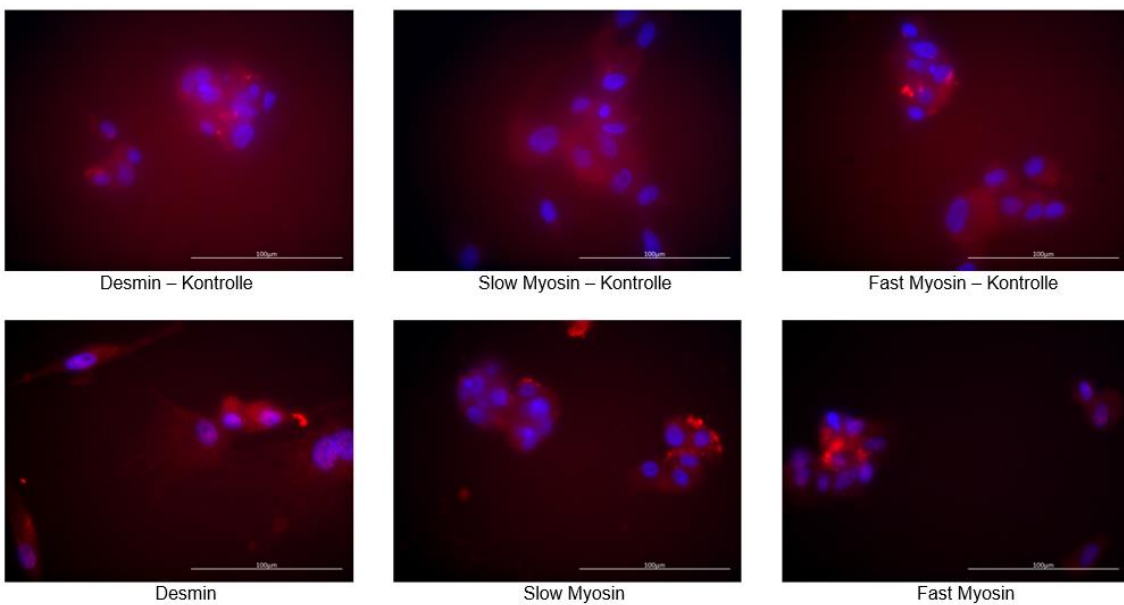


Abbildung 42: Antikörper-Färbung der sMPC20 auf gelatinebeschichtetem Chamber Slide aus Plastik nach PFA-Fixierung

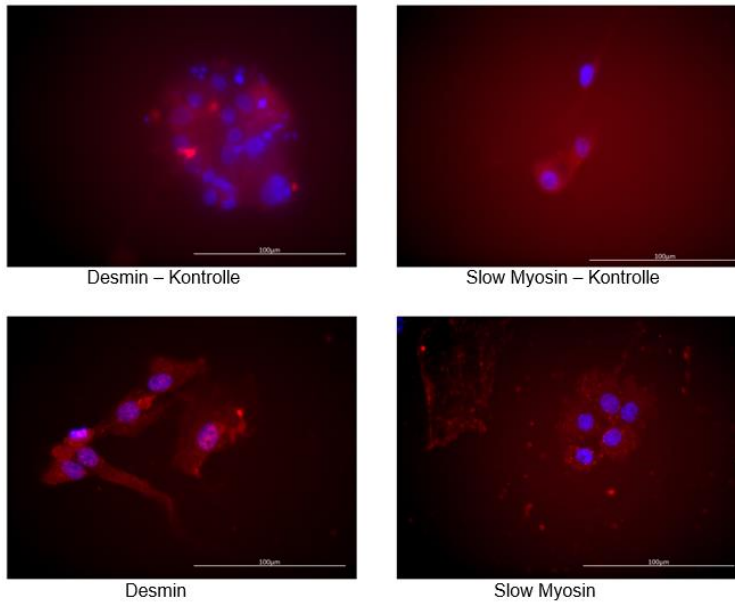


Abbildung 43: Antikörper-Färbung der sMPC20 auf kollagenbeschichtetem Chamber Slide aus Plastik nach PFA-Fixierung

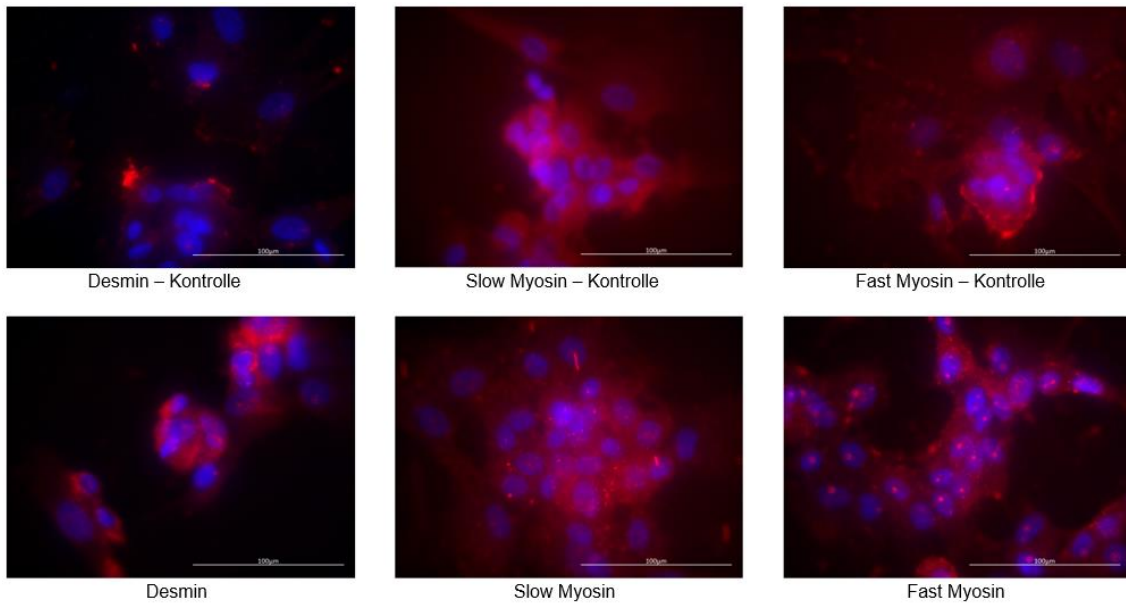


Abbildung 44: Antikörper-Färbung der sMPC20 auf unbeschichtetem Chamber Slide aus Plastik nach Methanol-Fixierung

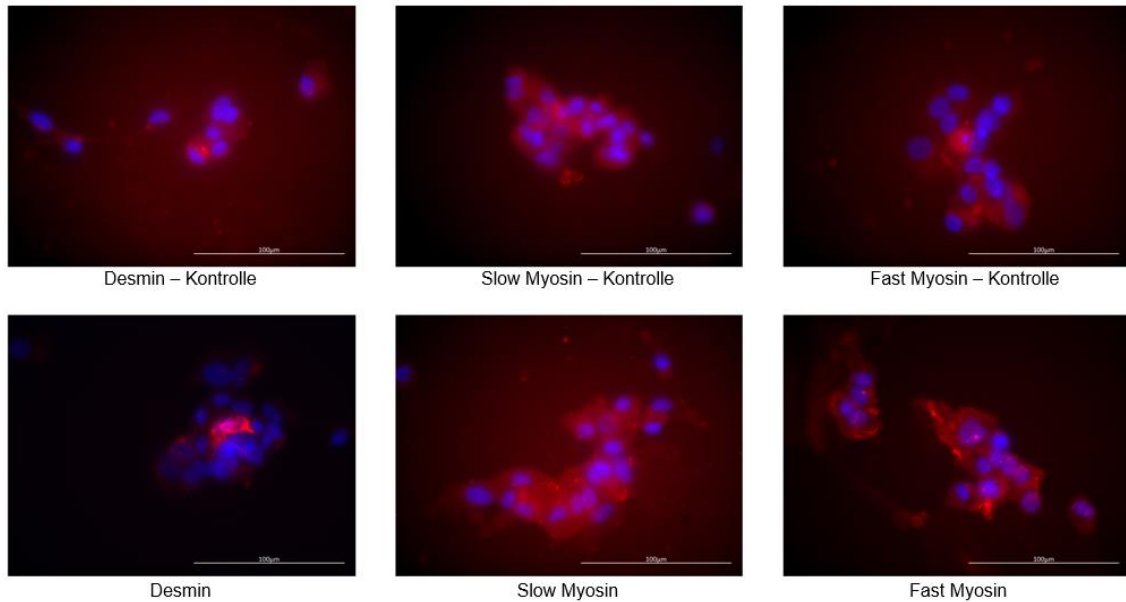


Abbildung 45: Antikörper-Färbung der sMPC20 auf gelatinebeschichtetem Chamber Slide aus Plastik nach Methanol-Fixierung

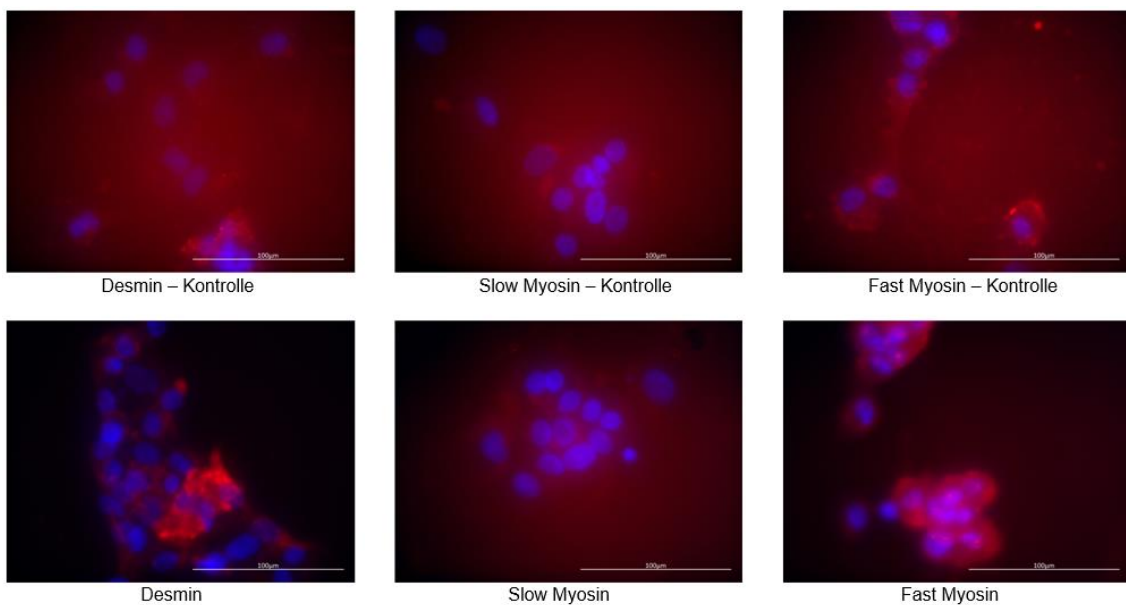


Abbildung 46: Antikörper-Färbung der sMPC20 auf kollagenbeschichtetem Chamber Slide aus Plastik nach Methanol-Fixierung

Bei Färbung der porcinen Muskelvorläuferzellen mit Antikörpern gegen Desmin, Slow Myosin und Fast Myosin wurde in allen Fällen auch ein Signal im Kontrollfeld erzeugt. Der Zweitantikörper bindet also auch unspezifisch. Dieses unspezifische Signal ist bei beschichtetem Untergrund stärker als bei unbeschichtetem. Um das Signal zu verringern wurde der Zweitantikörper bei den folgenden Immunfluoreszenzfärbungen 1:1000 anstatt 1:300 verdünnt.

6 Ergebnisse

6.1 Isolierung von porcinen Muskelprogenitorzellen aus porciner Skelettmuskulatur

Die Isolierung von sMPCs nach Methode 1 erfolgte an zwei Versuchstieren. Das erste Tier wurde durch das Nervengift T61 getötet. Nach Aussaat der Zellsuspension und Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ über mehrere Tage konnten keine vitalen adhärennten Zellen gefunden werden.

Das zweite Tier wurde durch Troponal getötet. Die Zellen wurden in zwei 6well-Platten ausgesät, wobei eine der Platten mit „Mau“-Medium, die andere mit „Kalbe“-Medium versorgt wurde. Nachfolgend sind die Zelllinien als sMPC18 Mau und sMPC18 Kalbe bezeichnet. Nach zwei Tagen waren in beiden Platten vitale adhärennte Zellen zu sehen, wobei die Zellen im „Kalbe“-Medium deutlich besser wuchsen. An Tag 8 fiel in beiden Platten eine Kontamination durch Bakterien auf. Daher wurden die Zellen mit PBS gewaschen, welchem 10% Pen. / Strep., 0,1% Amphotericin B und 0,1% Tylosin zugegeben wurden. Anschließend wurden die Zellen mit „Kalbe“- bzw. „Mau“-Medium versorgt, dem 0,1% Gentamycin zugesetzt war. Nach einer Woche war keine Kontamination mehr zu erkennen und die Zellen wurden wieder mit Vollmedium ohne zusätzliche Antibiose versorgt.

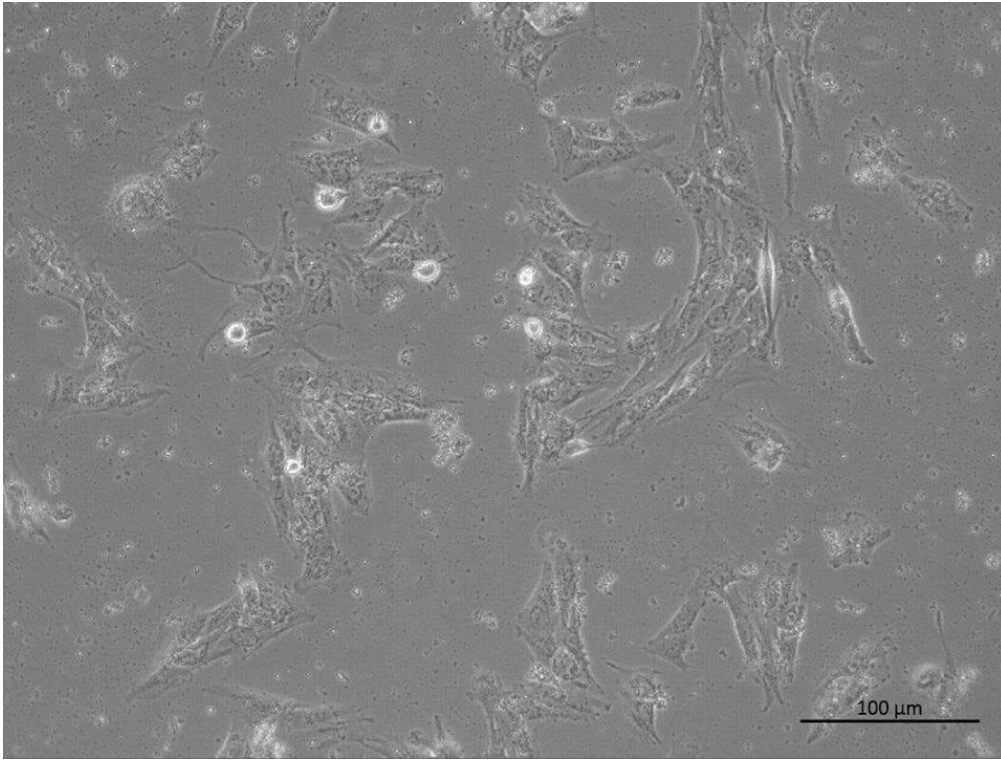


Abbildung 47: sMPCs der Reihe sMPC18 Kalbe 8 Tage nach Isolierung aus porcinem Skelettmuskelgewebe

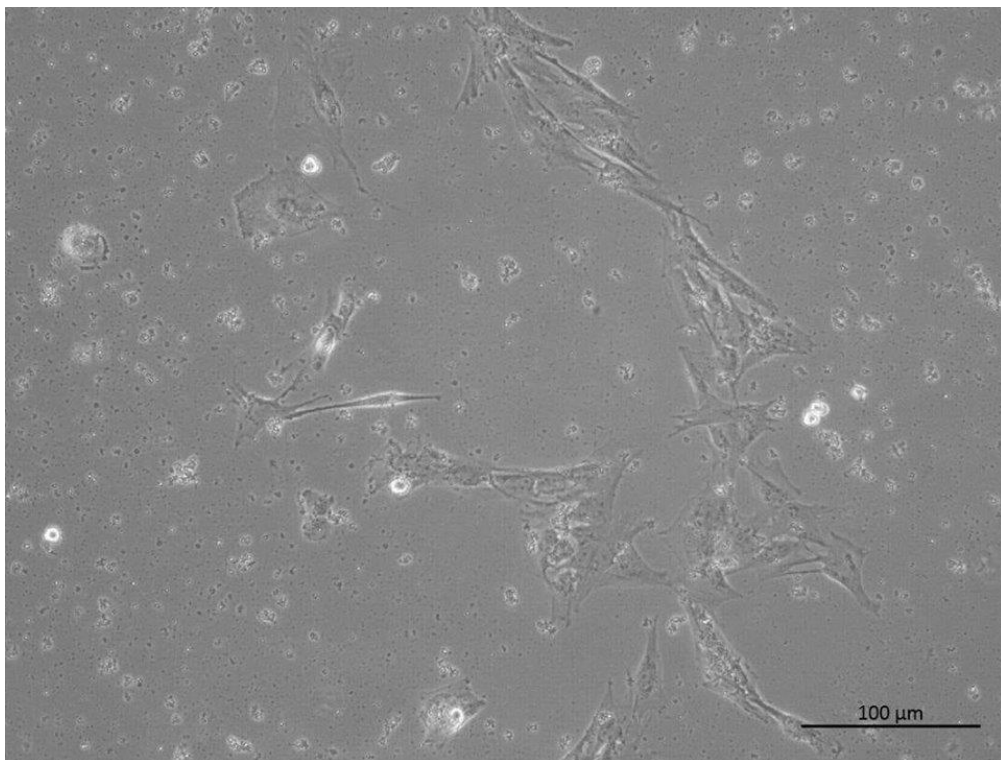


Abbildung 48: sMPCs der Reihe sMPC18 Mau 8 Tage nach Isolierung aus porcinem Skelettmuskelgewebe

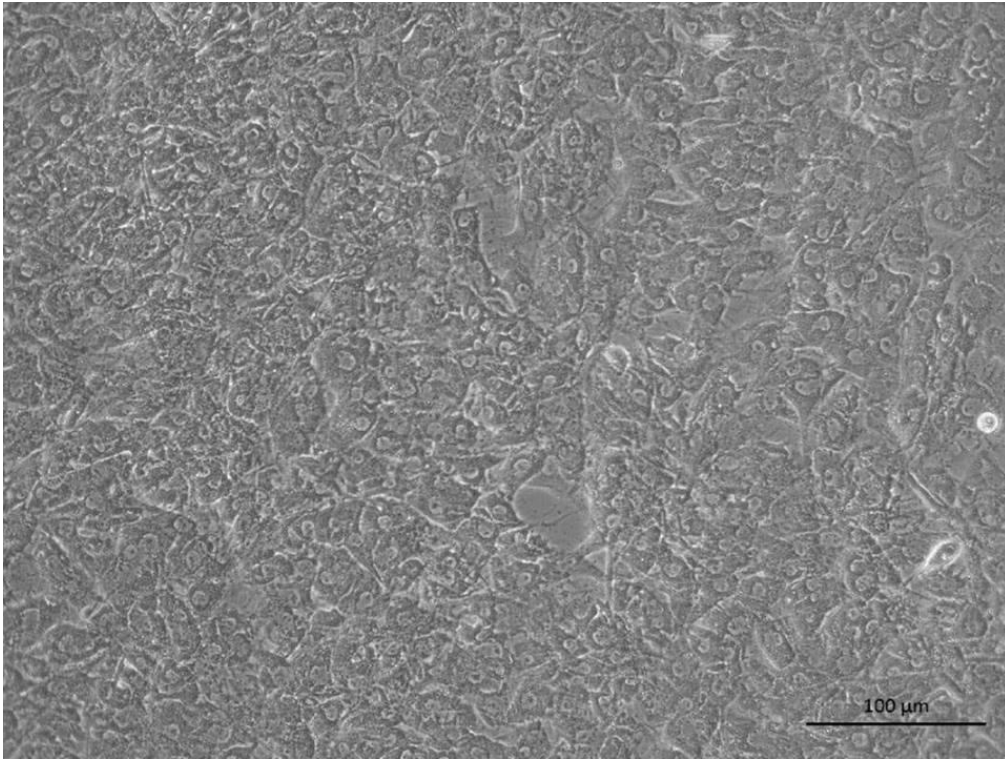


Abbildung 49: sMPCs der Reihe sMPC18 Kalbe 14 Tage nach Isolierung aus porcinem Skelettmuskelgewebe

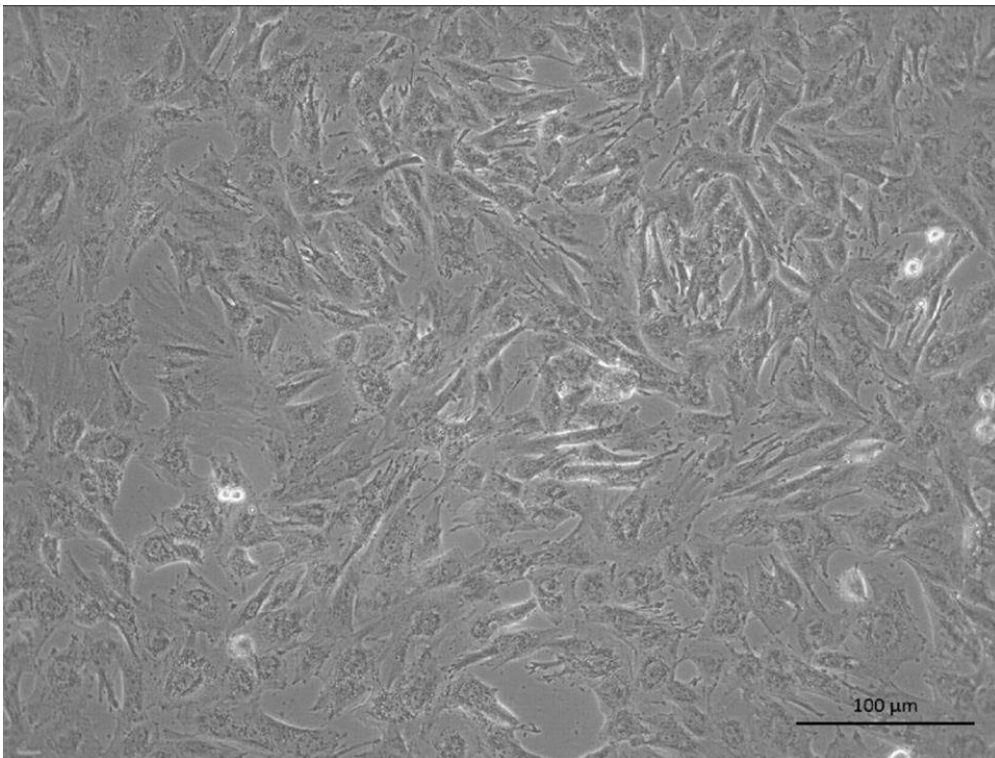


Abbildung 50: sMPCs der Reihe sMPC18 Mau 14 Tage nach Isolierung aus porcinem Skelettmuskelgewebe

Die Zellen, die nach Methode 2 isoliert wurden, wurden in gelatinebeschichtete T75-Zellkulturflaschen ausgesät. Das Medium wurde zweimal pro Woche gewechselt. Die sMPCs, die ich im Beisein von Frau Dr. rer. nat. Claudia Kalbe im Juni 2018 selbst isolierte, wurden als sMPC20 bezeichnet. Die Reihe sMPC19 wurden im November 2017 im FBN isoliert und als Vergleichsprobe verwendet. Im Juli 2018 wurden die sMPC21 im Labor in Tübingen isoliert, wobei der Exitus des Schweins hierbei durch gesättigte Kaliumchlorid-Lösung erfolgte.

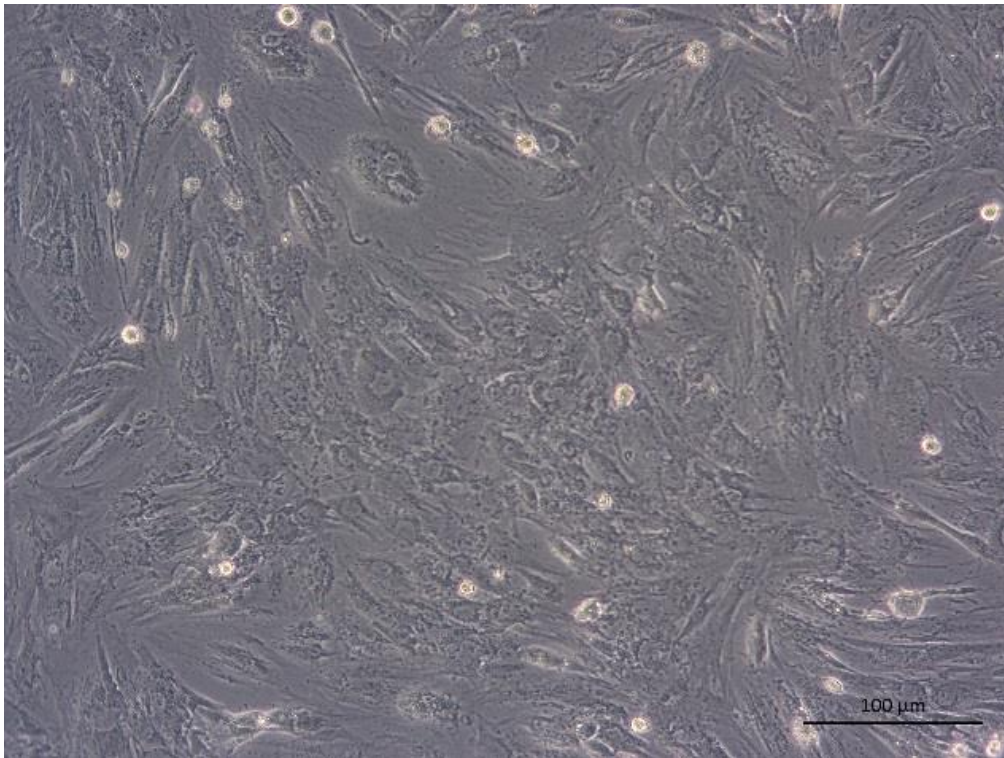


Abbildung 51: sMPCs der Reihe sMPC19 7 Tage nach Auftauen des Aliquots

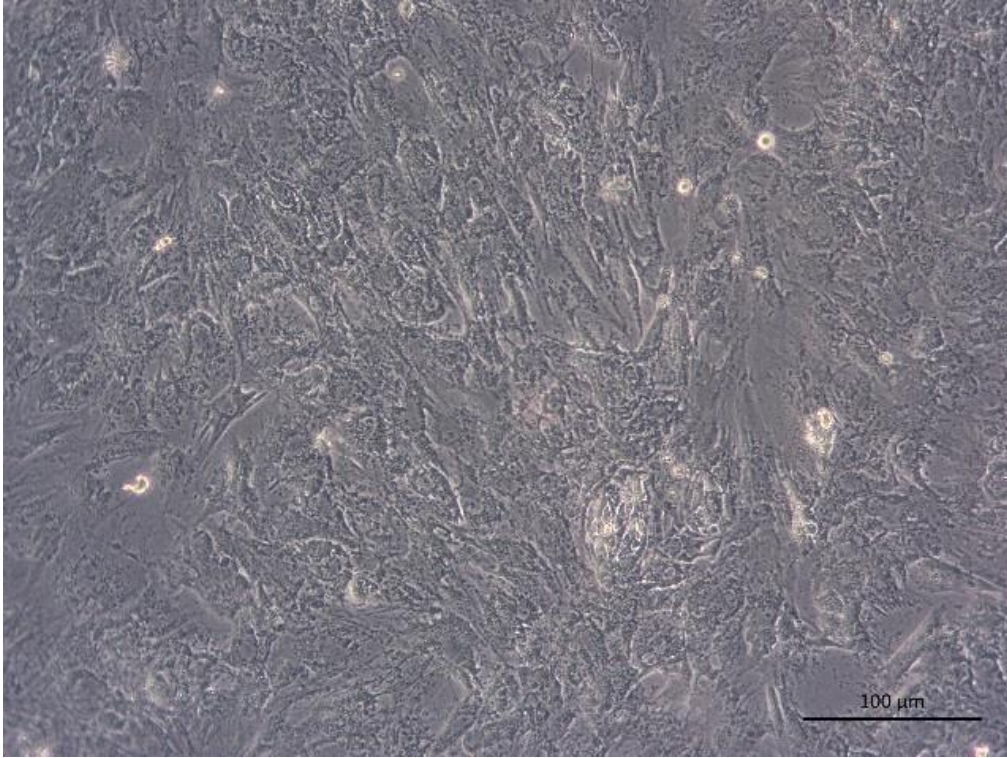


Abbildung 52: sMPCs der Reihe sMPC20 7 Tage nach Auftauen des Aliquots

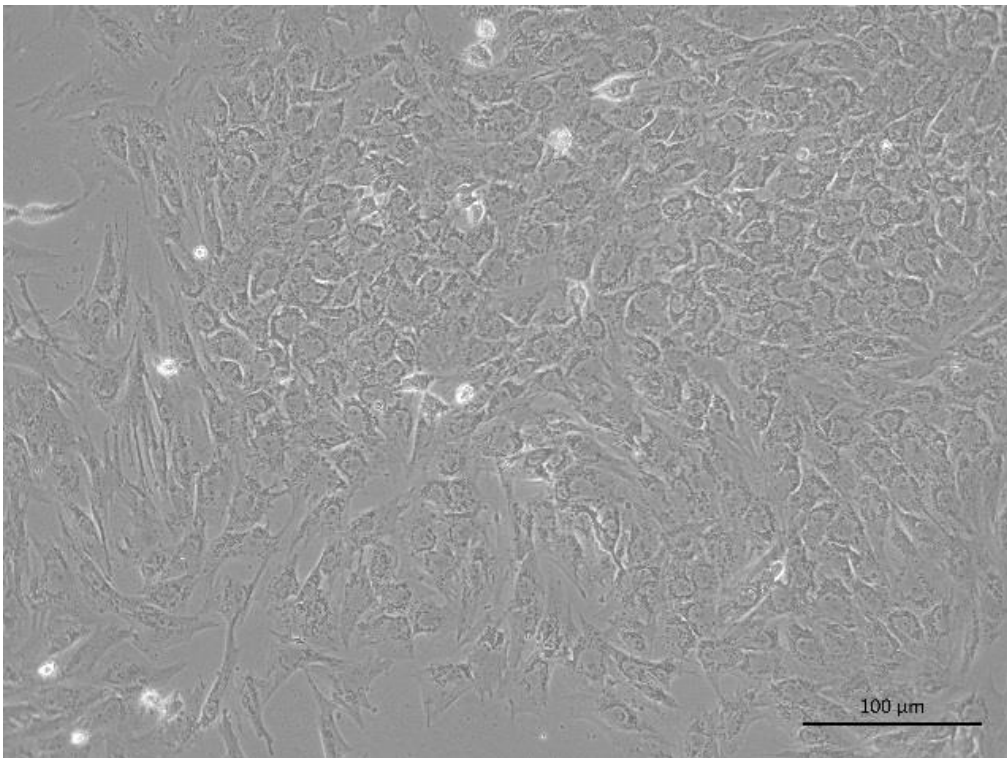


Abbildung 53: sMPCs der Reihe sMPC21 10 Tage nach Isolierung aus porcinem Skelettmuskelgewebe

6.2 Proliferationskurven

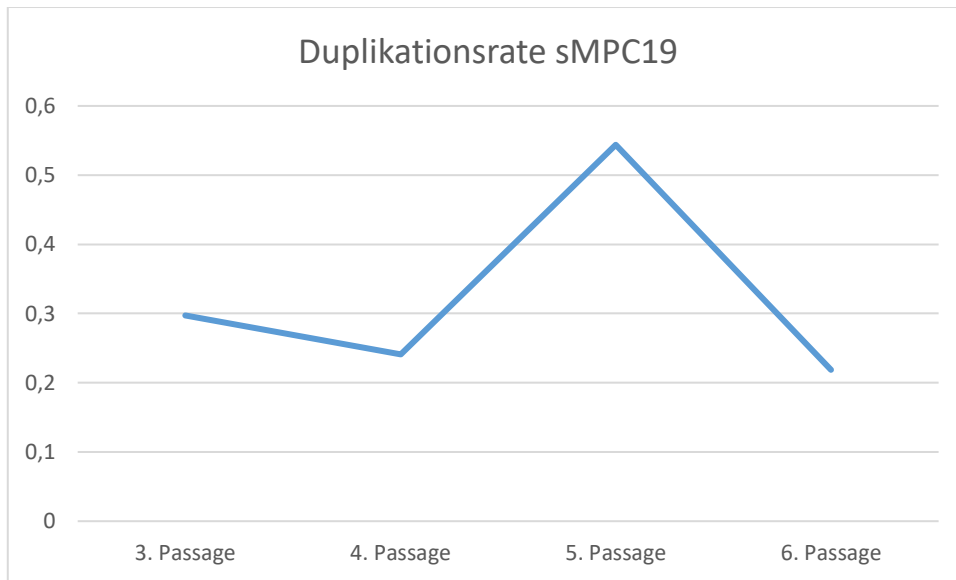


Abbildung 54: Duplikationsrate der sMPC19 in den Passagen 3-6

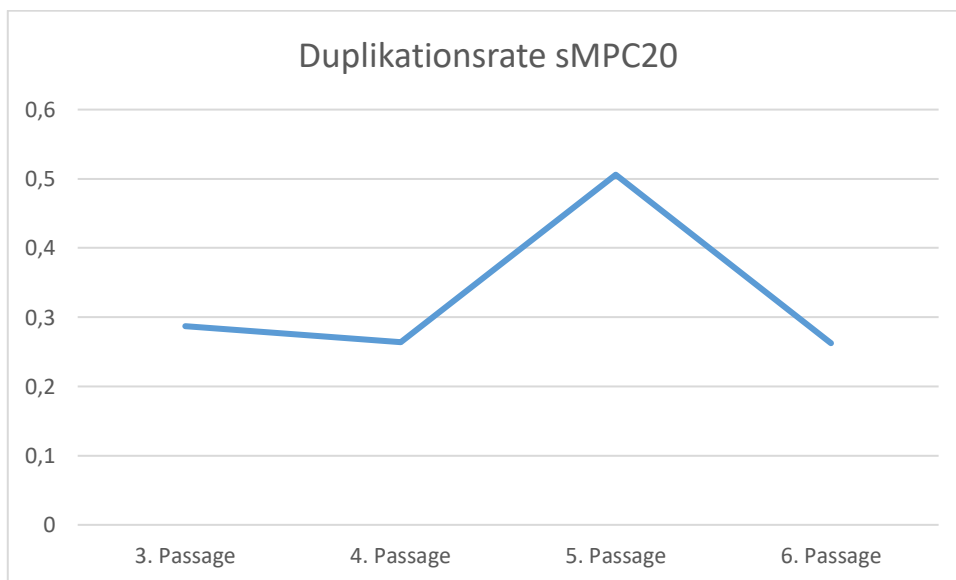


Abbildung 55: Duplikationsrate der sMPC20 in den Passagen 3-6

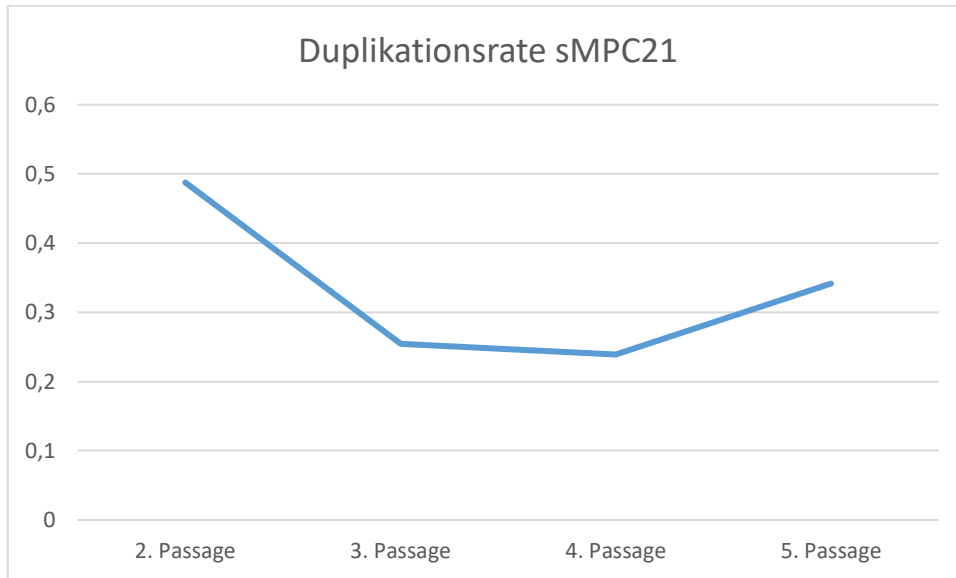


Abbildung 56: Duplikationsrate der sMPC21 in den Passagen 2-5

Aus den Proliferationskurven der drei Myoblastenreihen wird ersichtlich, dass diese Zellen zu Beginn stark proliferieren, das Wachstum sich in der dritten und vierten Passage jedoch deutlich verlangsamt und sich zur fünften Passage hin wieder steigert. Die Reihen sMPC 19 und 20 lassen vermuten, dass das Wachstum der Myoblasten in der fünften Passage sein Maximum erreicht.

6.3 Größenbestimmung der porcinen Muskelprogenitorzellen via CASY

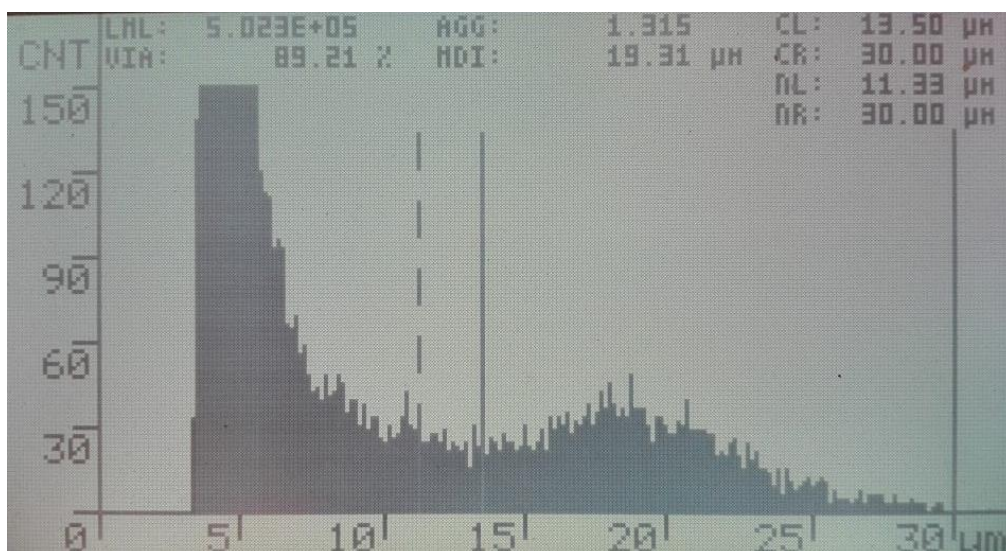


Abbildung 57: Größenbestimmung der sMPCs der Reihe sMPC19

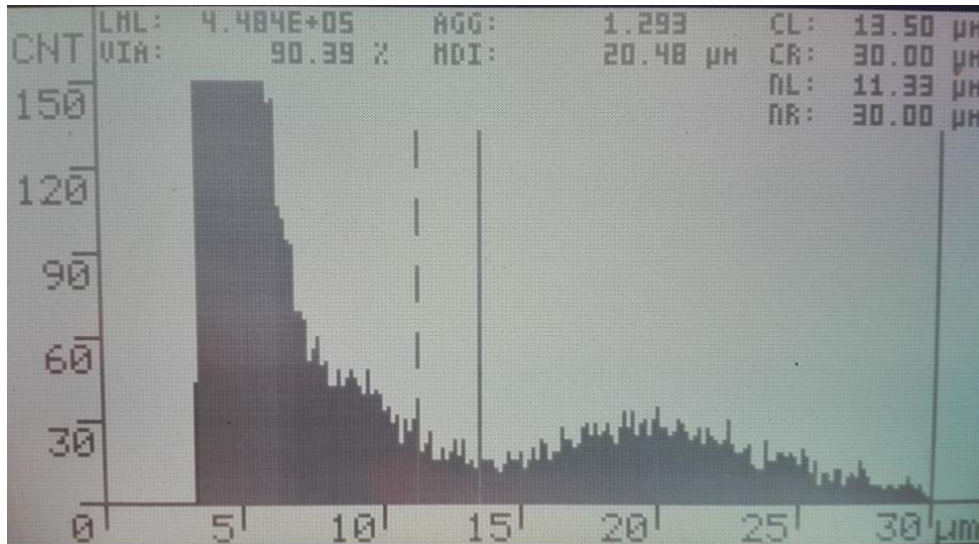


Abbildung 58: Größenbestimmung der sMPCs der Reihe sMPC20

Die Messung der sMPCs 19 und 20 ergab eine durchschnittliche Zellgröße von ca. 20µm. Die sMPC19 waren mit 19,31µm etwas kleiner als die sMPC20 mit 20,48µm. Die Größenbestimmung der Zellen war notwendig für die Abschätzung des Mindestdurchmessers der Wasserstrahlsonde für die Injektion von porcinen Muskelprogenitorzellen. Wie schon durch vorausgegangene Experimente bestätigt, können Mikropartikel mit einem Durchmesser von 20µm problemlos mit der Wasserstrahltechnik von Erbe versprüht werden (Abb. 2). Die Größe der porcinen Muskelprogenitorzellen ist daher mit dem Durchmesser der Düse des WaterJets von Erbe kompatibel.

6.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

6.4.1 Efficiency der Primer

Da bislang keine Protokolle zum Nachweis von Muskelmarkergenen im Labor etabliert waren, wurde die Efficiency des sMyoD1-Primers bei 60°C an drei aufeinander folgenden Tagen bestimmt. Sie beträgt 1,903.

6.4.2 Polymerasekettenreaktion der isolierten porcinen Muskelprogenitorzellen

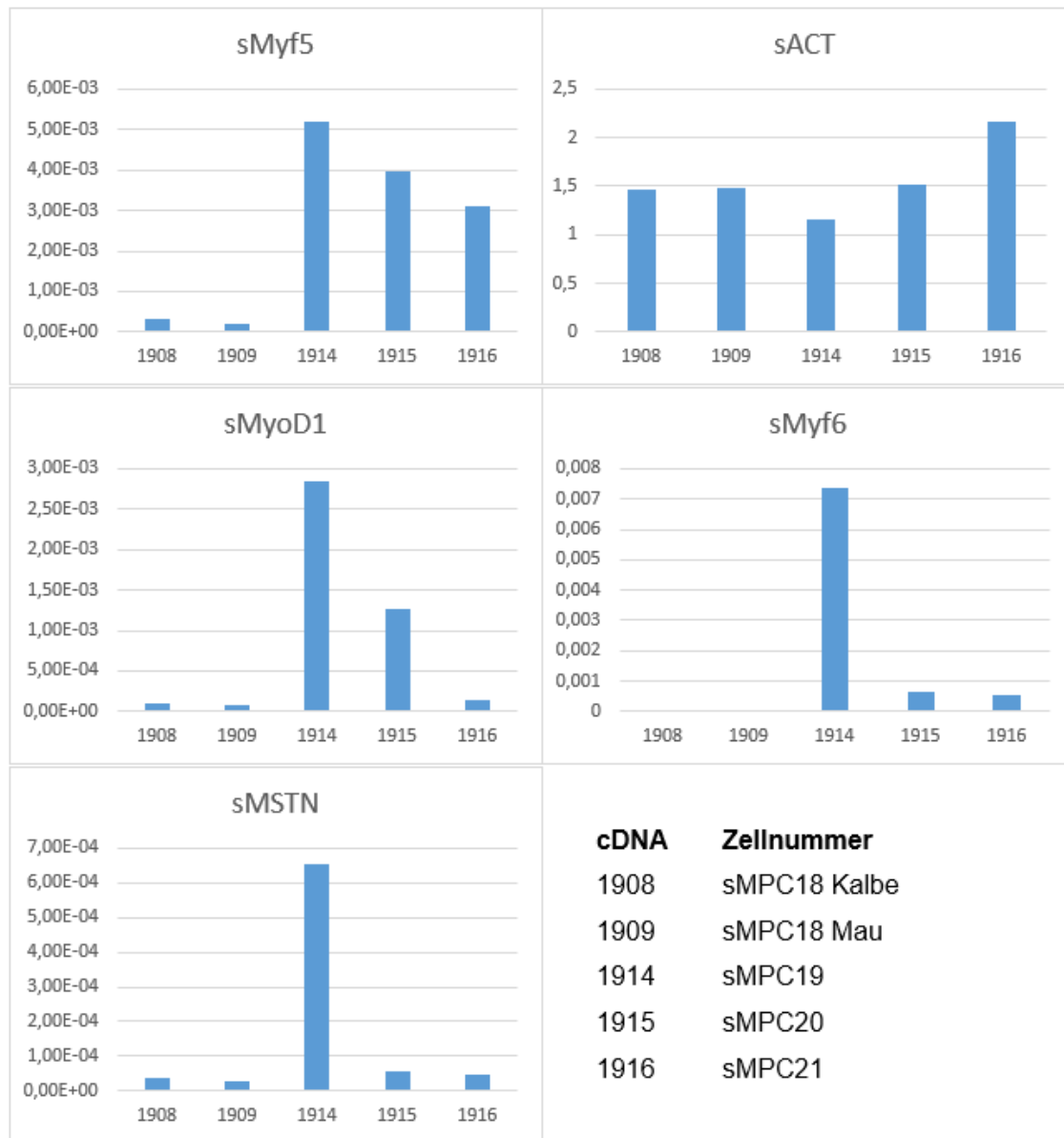


Abbildung 59: PCR-Ergebnisse der Muskelmarkergene in den, nach verschiedenen Methoden isolierten, sMPCs

Anhand der PCR kann man sehen, dass die Zellen, die nach Methode 1 isoliert wurden (1908/sMPC18 Kalbe und 1909/sMPC18 Mau), keine Myoblasten waren. Bei beiden Zelllinien konnte nur Actin, aber keines der für Myoblasten spezifischen Gene nachgewiesen werden. Das Strukturprotein Actin kommt zwar in Muskelzellen stark gehäuft vor, allerdings ist es auch in vielen anderen

eukaryotischen Zellen das am häufigsten vorkommende Protein (Dominguez and Holmes 2011).

Die anderen drei Zelllinien, die alle nach Methode 2 isoliert wurden, exprimieren muskelspezifische Gene. Allerdings gibt es dabei große quantitative Unterschiede. Da die einzelnen Gene je nach Differenzierungsstadium verschieden stark exprimiert werden, ist es möglich, dass sich die einzelnen Linien zum Zeitpunkt der RNA-Extraktion nicht im gleichen Stadium befanden. sMyf5, sMyf6 und sMyoD1, die zusammen die myogenic regulatory factor family bilden, sind besonders bei der Zelllinie sMPC19 stark exprimiert. Das lässt annehmen, dass sich diese Zellen zum Zeitpunkt der RNA-Extraktion im Differenzierungsstadium befanden. sMPC20 und sMPC21 weisen ebenfalls sMyf5 auf, allerdings ist deutlich weniger sMyf6 und sMyoD1 vorhanden. Die Zellen sind also in der Lage, sich zu Muskelzellen zu differenzieren, dieser Prozess wurde jedoch noch nicht begonnen. Auch Myostatin, kurz sMSTN, ist nur in der Reihe sMPC19 verstärkt nachzuweisen. Da sich diese Zellen in der Differenzierung befinden, ist Myostatin notwendig, um die Neubildung von Muskelmasse zu regulieren. Um die isolierten Zellen genauer zu charakterisieren wurde eine Immunfluoreszenzfärbung auf Desmin, Slow Myosin und Fast Myosin durchgeführt.

6.5 Immunfluoreszenzfärbung

Nach den Vorversuchen zur Immunfluoreszenz wurden die Zelllinien sMPC19, 20 und 21 auf die Proteine Desmin, Slow Myosin und Fast Myosin untersucht. Die Zellen wurden auf unbeschichteten Plastik Chamber Slides ausgesät. Fixiert wurden die Zellen am zweiten Tag mit Methanol, anschließend erfolgte die Antikörper-Färbung. Hierbei wurde der Zweitantikörper 1:1000 verdünnt.

6.5.1 sMPC19

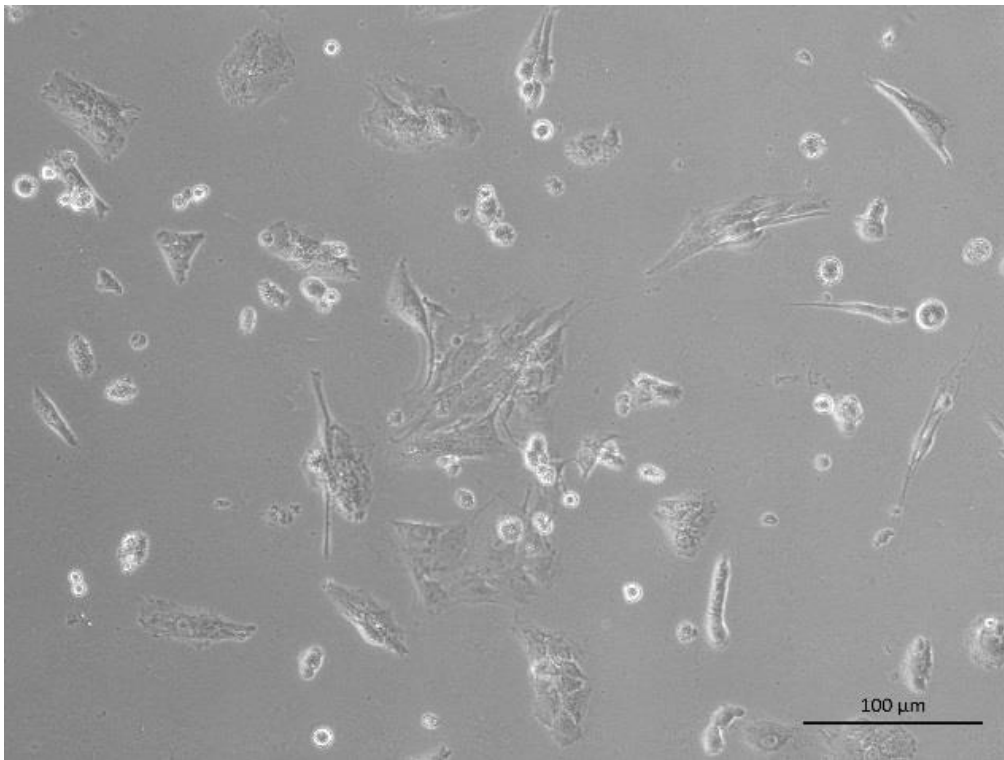


Abbildung 60: sMPC19 auf unbeschichtetem Chamber Slide aus Plastik nach 2Tagen

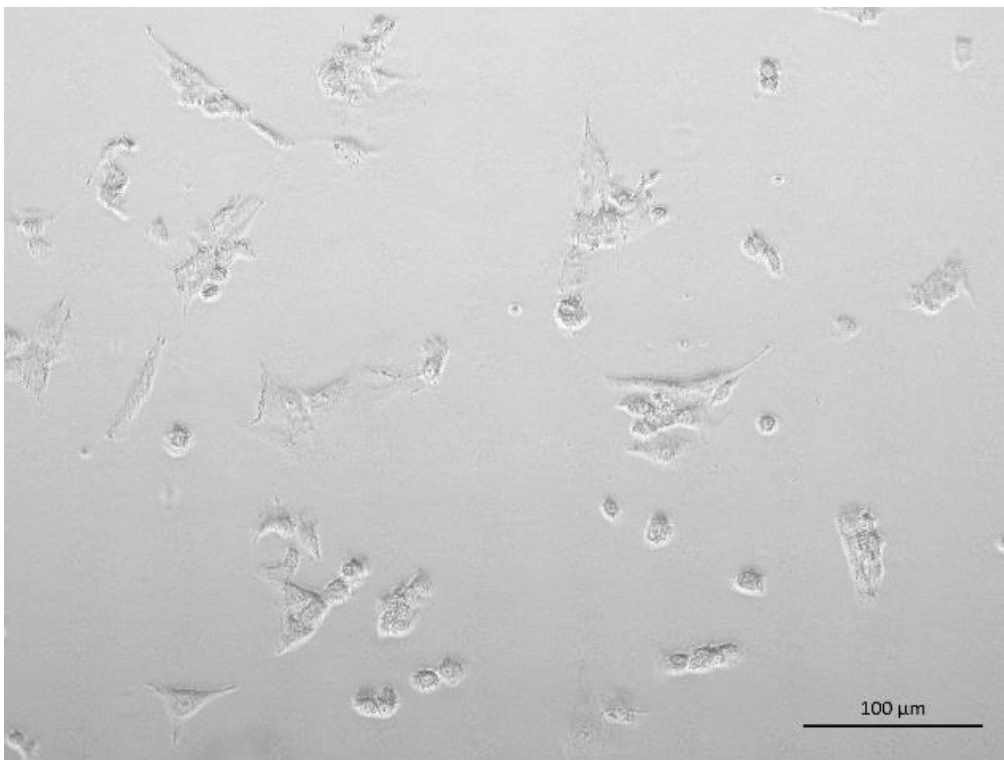


Abbildung 61: sMPC19 auf unbeschichtetem Chamber Slide aus Plastik nach Methanol-Fixierung

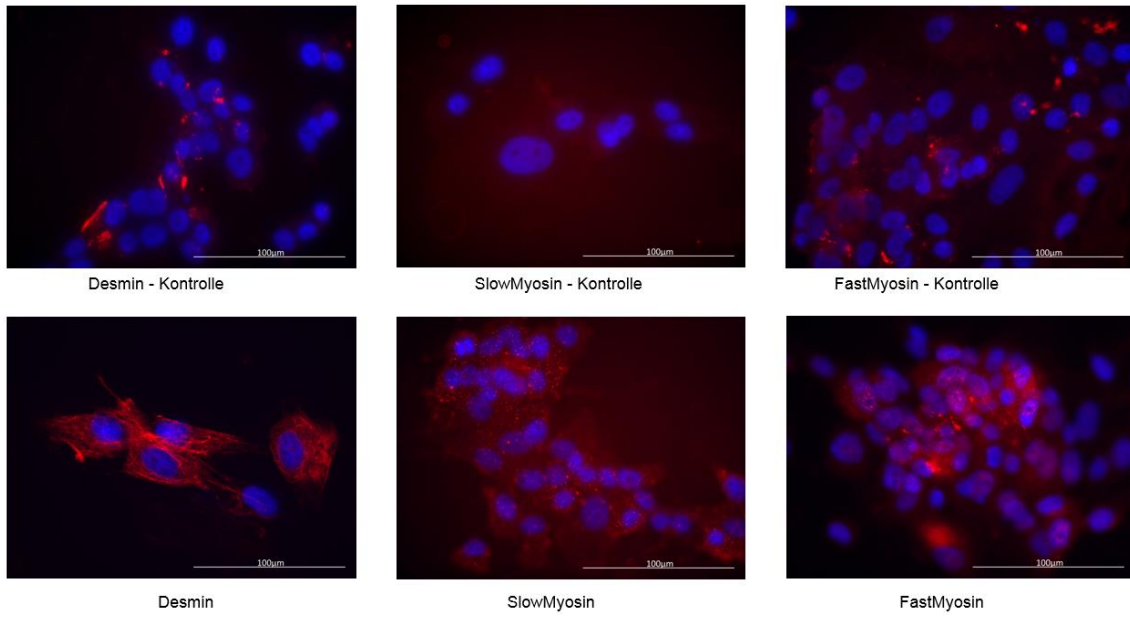


Abbildung 62: sMPC19 auf unbeschichtetem Chamber Slide aus Plastik mit Methanol-Fixierung nach Antikörper-Färbung gegen Desmin, Slow Myosin und Fast Myosin

6.5.2 sMPC20

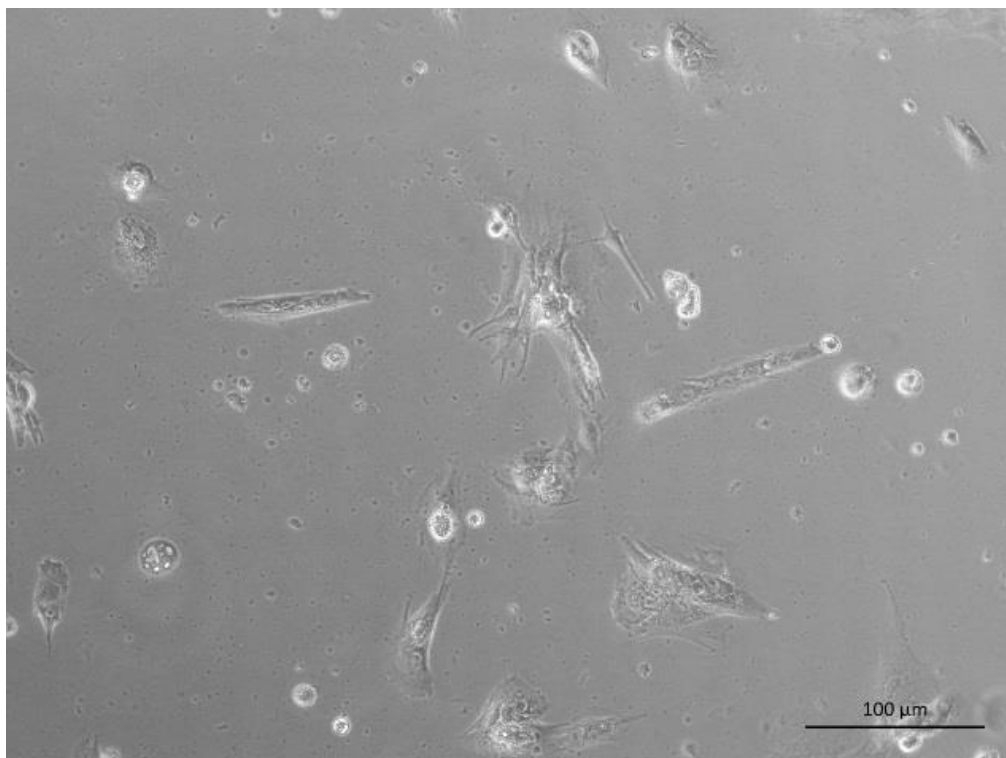


Abbildung 63: sMPC20 auf unbeschichtetem Chamber Slide aus Plastik nach 2Tagen

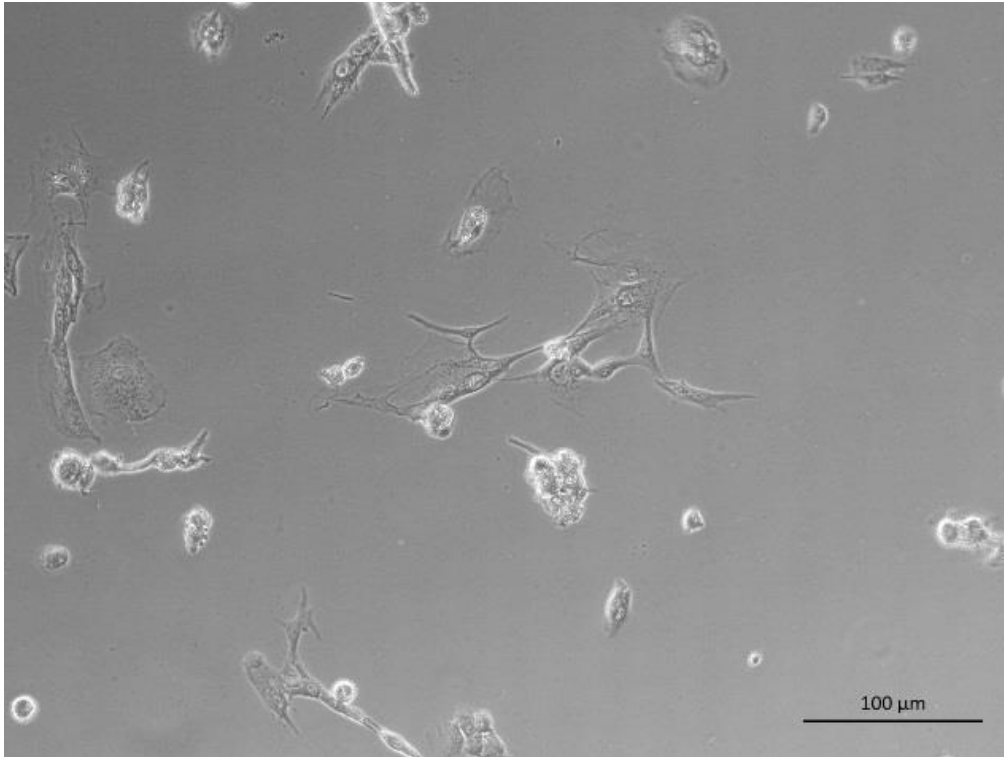


Abbildung 64: sMPC20 auf unbeschichtetem Chamber Slide aus Plastik nach Methanol-Fixierung

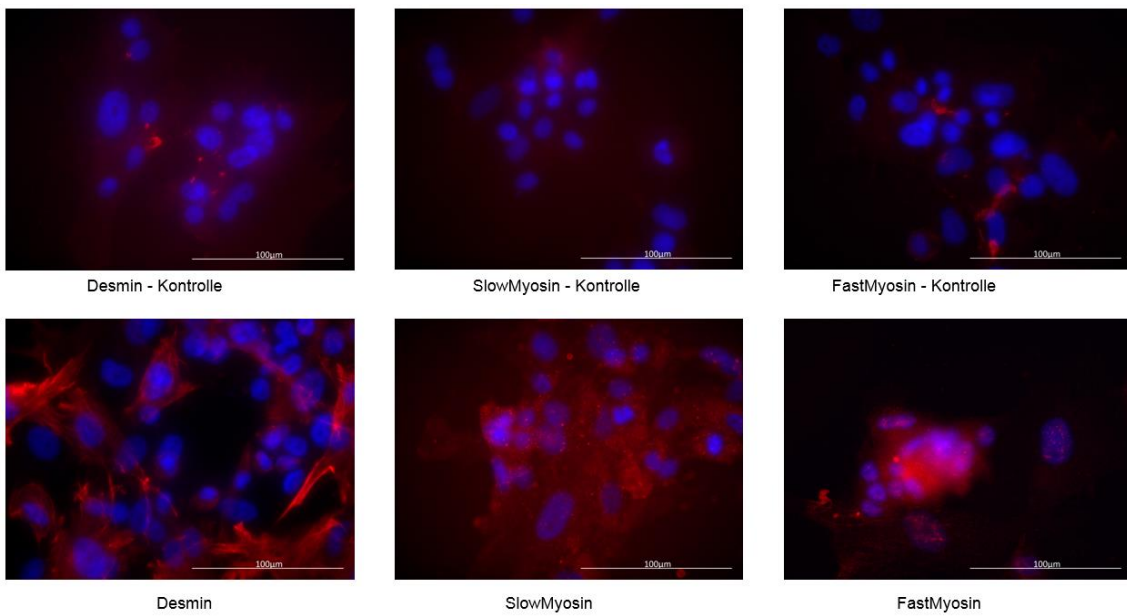


Abbildung 65: sMPC20 auf unbeschichtetem Chamber Slide aus Plastik mit Methanol-Fixierung nach Antikörper-Färbung gegen Desmin, Slow Myosin und Fast Myosin

6.5.3 sMPC21

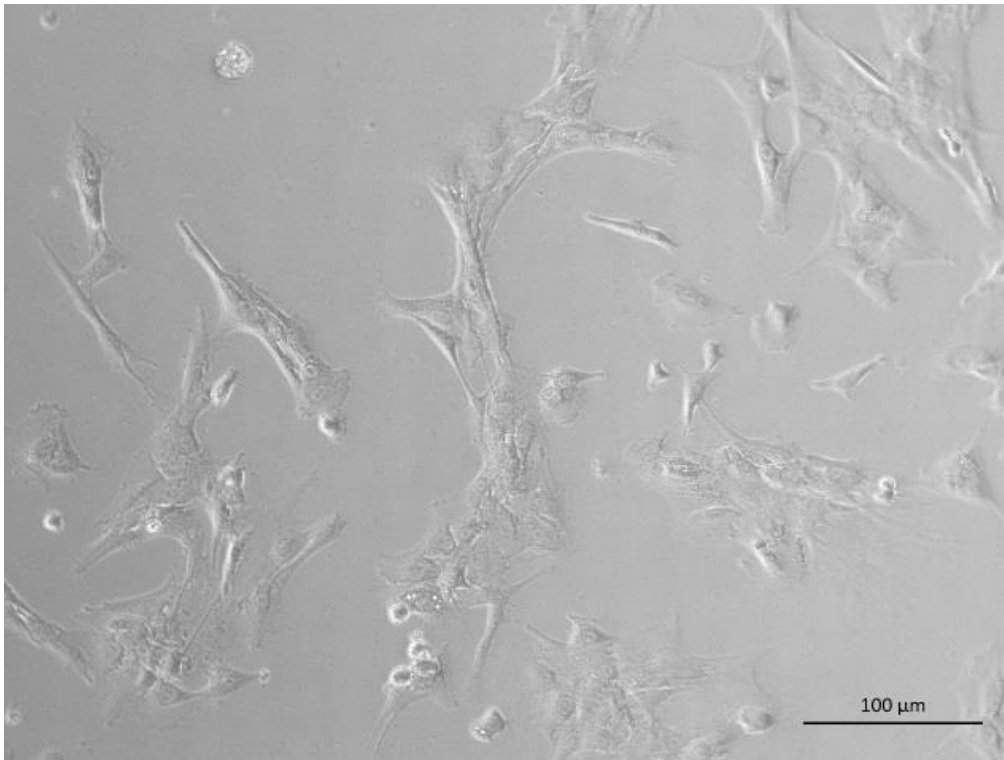


Abbildung 66: sMPC21 auf unbeschichtetem Chamber Slide aus Plastik nach 2Tagen

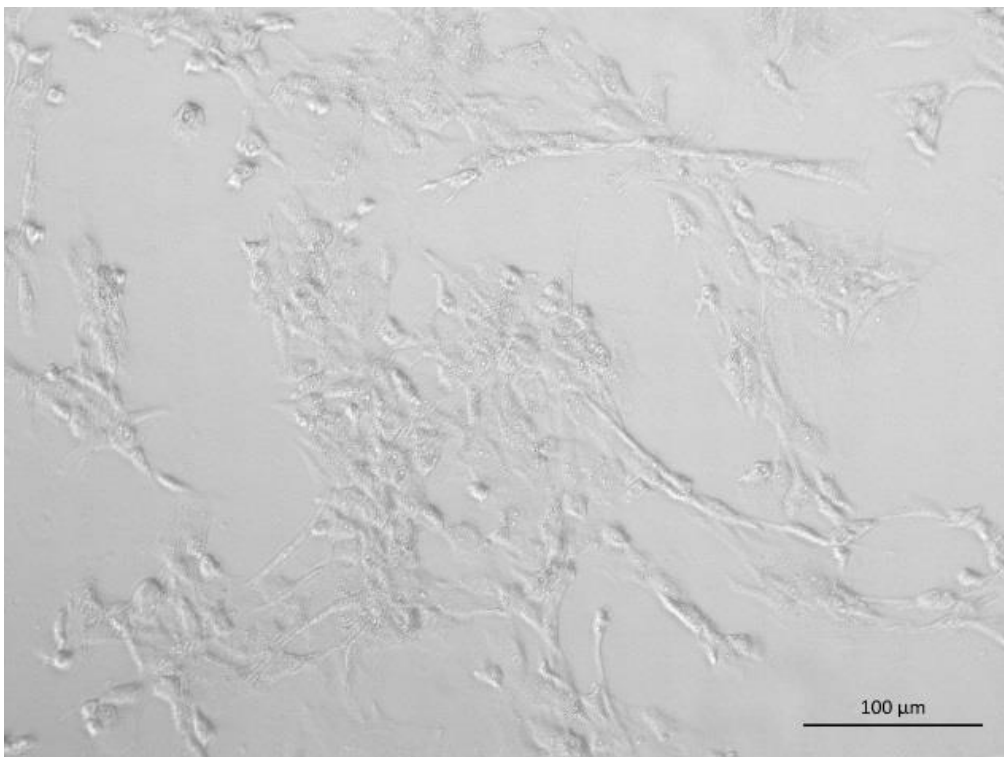


Abbildung 67: sMPC21 auf unbeschichtetem Chamber Slide aus Plastik nach Methanol-Fixierung

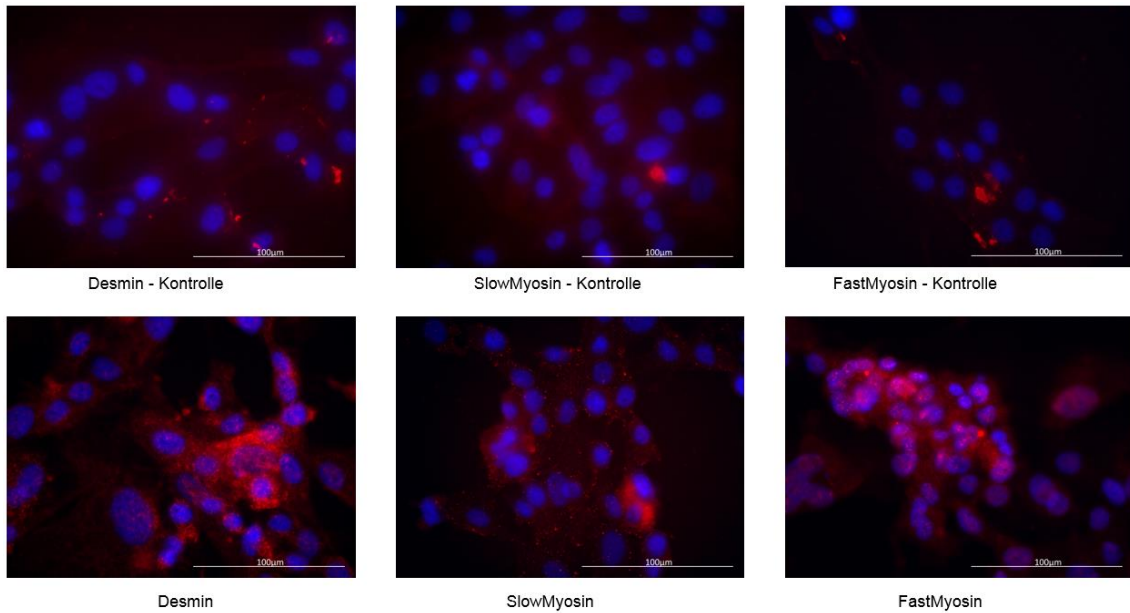


Abbildung 68: MPC21 auf unbeschichtetem Chamber Slide aus Plastik mit Methanol-Fixierung nach Antikörper-Färbung gegen Desmin, Slow Myosin und Fast Myosin

Die Immunfluoreszenzfärbung gegen Desmin, Slow Myosin und Fast Myosin der porcinen Myoblastenreihen sMPC19, 20 und 21 war eindeutig positiv in allen drei Zellreihen. Trotz der starken Verdünnung des Zweitantikörpers mit 1:1000 kann in der Kontrolle aller Färbungen ebenfalls eine Rotfärbung erkannt werden. Da diese deutlich schwächer ist, als in den zugehörigen Feldern, denen auch Erstantikörper zugegeben wurde, kann das Ergebnis trotzdem als positiv gewertet werden. Es handelt sich bei den getesteten Zellen definitiv um Zellen der muskulären Nische. Unklar ist allerdings, an welchem unspezifischen Antigen der Zweitantikörper gebunden hat.

6.6 Injektion von porcinen Muskelprogenitorzellen in Medium

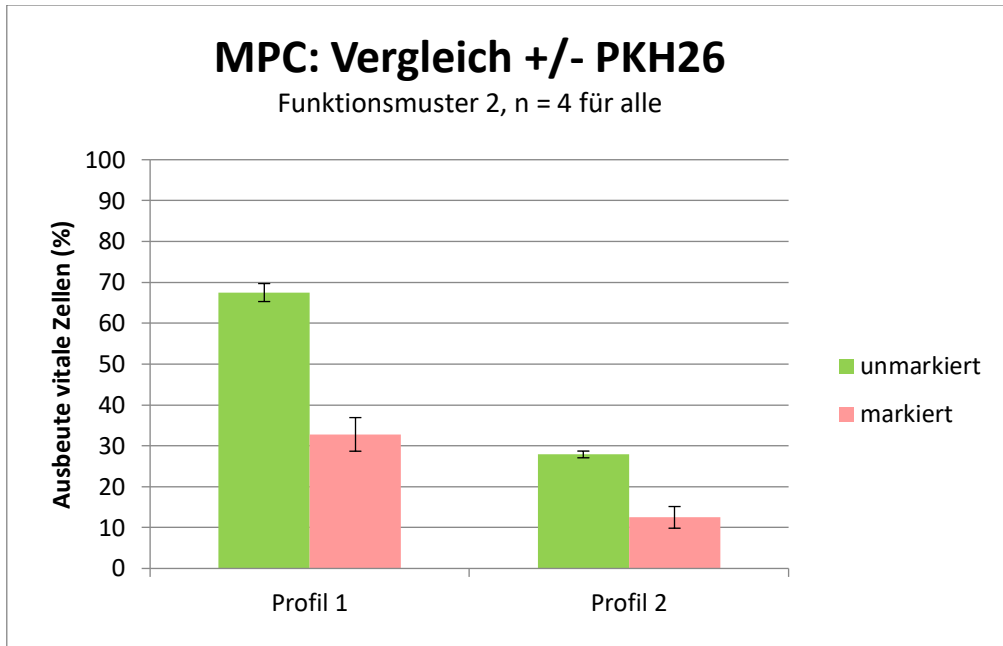


Abbildung 69: Vergleich der Vitalität von PKH26-markierten und unmarkierten sMPCs nach Sprühen mit Wasserstrahl mit verschiedenen Druckprofilen

Das obenstehende Diagramm zeigt eindeutig die Überlegenheit der unmarkierten porcinen Myoblasten gegenüber denen, die mit PKH26 markiert wurden. Bei beiden Druckprofilen ist die Vitalität der unmarkierten Zellen mehr als doppelt so hoch. In Profil 1 betrug die Vitalität der unmarkierten Myoblasten 67,5%, wohingegen die der PKH26-markierten Zellen nur 32,8% betrug. Werden höhere Drücke beim Versprühen der Zellen verwendet, sinkt die Vitalität der Myoblasten erheblich. In Profil 2 überlebten 27,9% der unmarkierten Myoblasten, wurden die Zellen zuvor mit PKH26 markiert, waren es nur noch 12,5%.

Um die Daten der versprühten porcinen Myoblasten besser bewerten zu können, wurden im Vergleich dazu die Ergebnisse der Sprühversuche mit unmarkierten und PKH26+BacMam-markierten mesenchymalen Stammzellen ausgewertet.

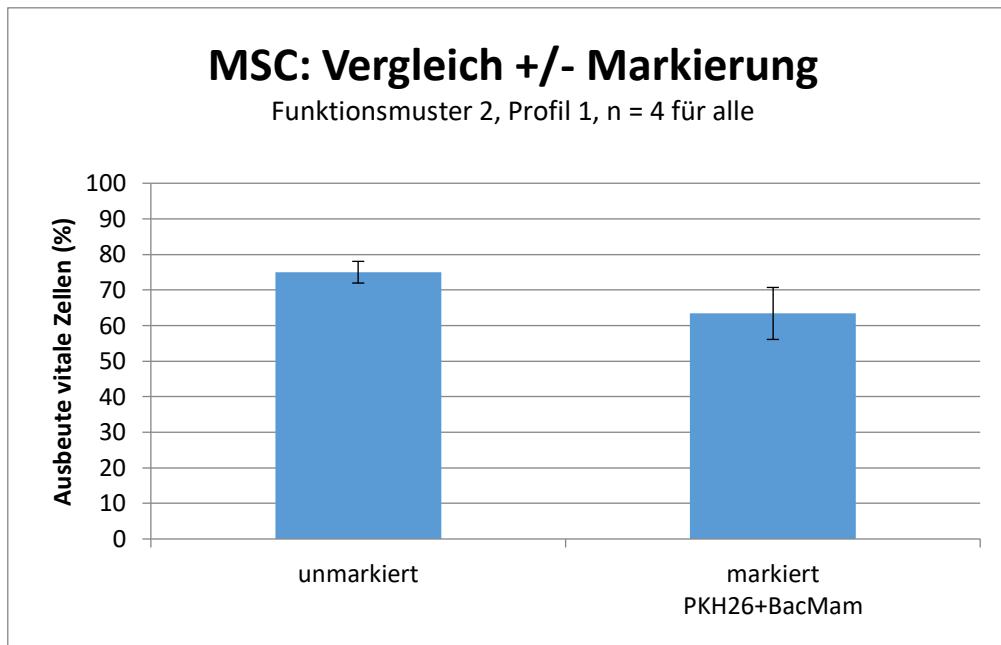


Abbildung 70: Vergleich der Vitalität von PKH26+BacMam-markierten und unmarkierten hMSCs nach Sprühen mit Wasserstrahl bei einheitlichem Druckprofil (Profil 1)

Im Vergleich zu den versprühten Myoblasten weisen die hMSCs eine deutlich höhere Vitalität auf, insbesondere die markierten Zellen. Für Profil 1 betrug die Vitalität der unmarkierten hMSCs 75,0%. Von den markierten hMSCs überlebten mit 63,4% 30,6% mehr als von den markierten Myoblasten bei gleichem Profil. Des Weiteren fällt auf, dass die Vitalität der hMSCs nach Versprühen mit Wasserstrahl mit 86,7% höher war, als nach Versprühen durch die Williams Nadel, bei der die Vitalität anschließend bei 74,8% lag. Die sMPCs verhielten sich bei Versprühen mit der Williams Nadel sehr ähnlich, 87,3% der Zellen überlebten den Transfervorgang durch die Williams Nadel. Vergleicht man die Ergebnisse des Transfers von unmarkierten sMPCs via Wasserstrahl am 14.05.2018 und am 19.09.2018, so sieht man eine Differenz der Vitalität von 19,8%. Hierbei muss allerdings beachtet werden, dass am ersten Versuchstag porcine Myoblasten verwendet wurden, die nach Methode 1 isoliert worden waren. Am zweiten Versuchstag fand der Sprühversuch in Medium mit Zellen statt, die man nach Methode 2 isoliert hatte.

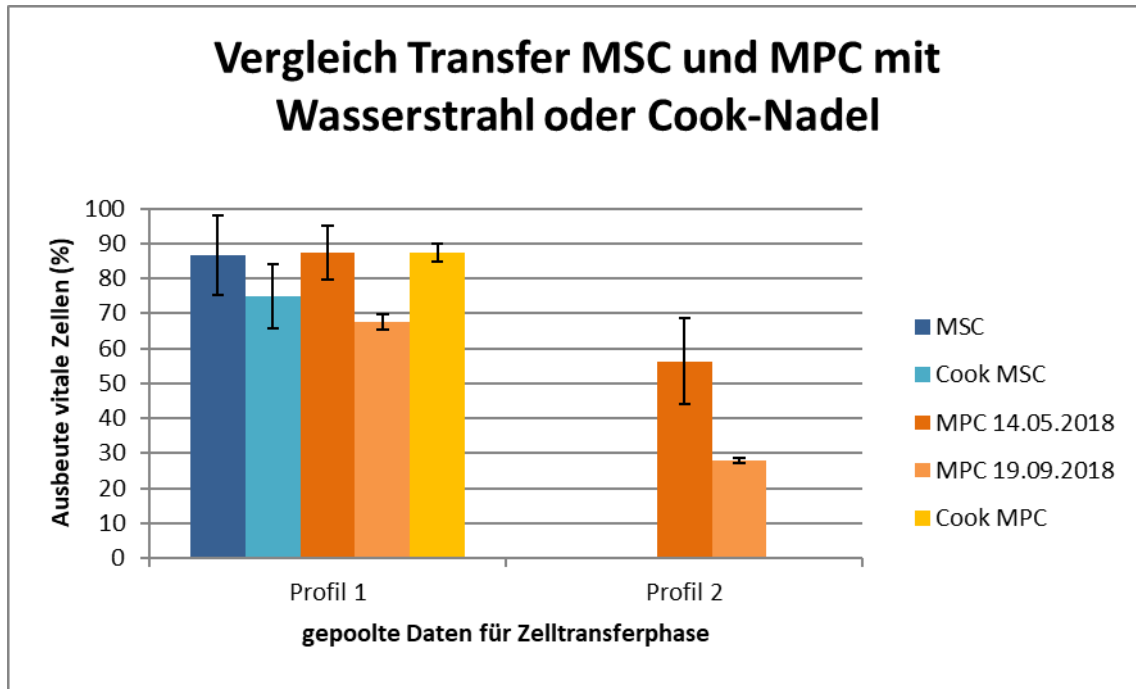


Abbildung 71: Vitalität der unmarkierten hMSCs und sMPCs nach Versprühen durch Williams Nadel und Wasserstrahl

6.7 Injektion von porcinen Muskelprogenitorzellen in Kadavergewebe

Die Injektion von porcinen Myoblasten in Kadavergewebe erfolgte sowohl mit der Williams-Nadel als auch mit der Wasserstrahltechnik von Erbe. Hierfür wurden 24 Stunden vor Versuchsbeginn sieben T75-Zellkulturflaschen mit PKH26 markiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst. Es wurde eine Injektion mit der Williams Nadel durchgeführt, wofür 6×10^5 Zellen in 250 μ l resuspendiert und anschließend ins Kadavergewebe injiziert wurden. Die Injektion mit Wasserstrahl wurde dreimal durchgeführt mit einer Zellkonzentration von jeweils 6×10^5 Zellen in 100 μ l. Für die Injektion mit dem ErbeJet war eine Mitarbeiterin der Firma Erbe anwesend. Nach Injektion wurde das Kadavergewebe auf Eis gelagert und in das Werner Siemens Imaging Center in Tübingen gebracht.

6.7.1 Detektion der porcinen Muskelprogenitorzellen im Kadavergewebe via In Vivo Imaging System (IVIS)

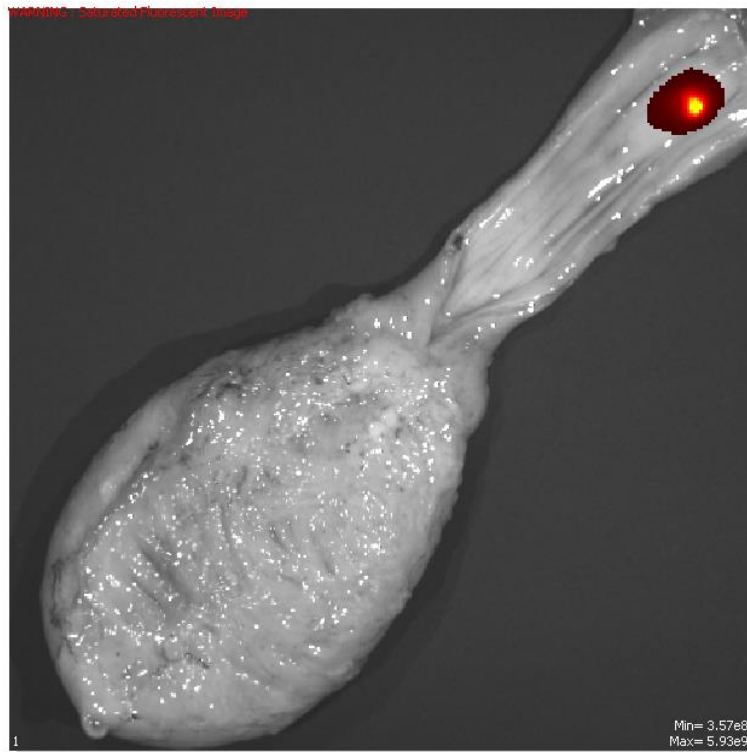


Abbildung 72: IVIS Imaging nach Injektion von PKH26-markierten sMPCs durch Wasserstrahl

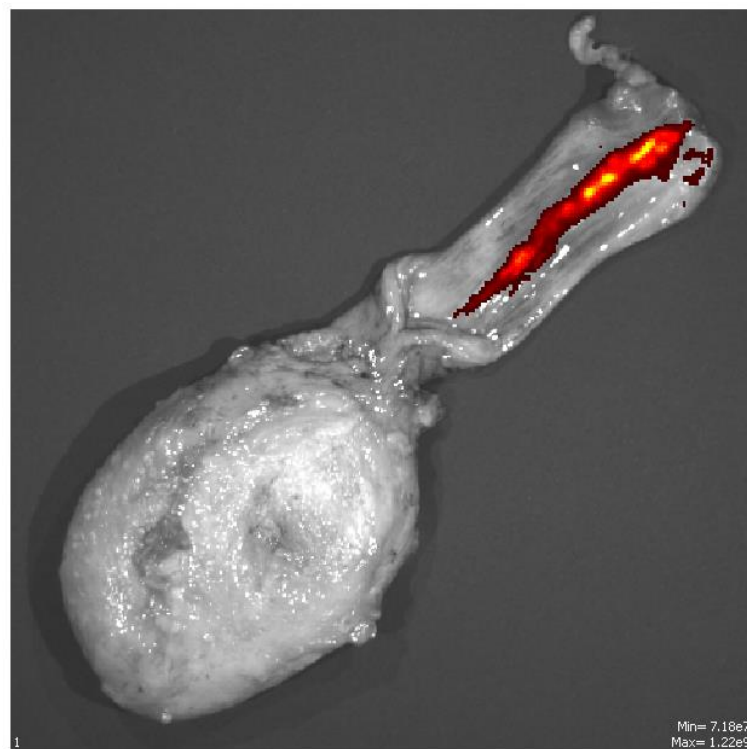


Abbildung 73: IVIS Imaging nach Injektion von PKH26-markierten sMPCs durch Williams-Nadel

Im Werner Siemens Imaging Center in Tübingen wurden die Fluoreszenzsignale der PKH26-Markierung im IVIS detektiert. Die Analyse des Kadavergewebes im IVIS ergab ein eindeutiges Signal der PKH26-markierten Zellen. Die Lokalisation des Fluoreszenzsignals stimmte genau mit makroskopisch sichtbaren Injektionsblase direkt nach dem Injektionsversuch überein. Da der restliche Teil des Gewebes kein Signal erzeugt, kann eine Autofluoreszenz des Kadavergewebes ausgeschlossen werden. Diese Vorgehensweise eignet sich also sehr gut zur Detektion von PKH26-markierten Myoblasten im Gewebe.

6.7.2 Histologie des Kadavergewebe

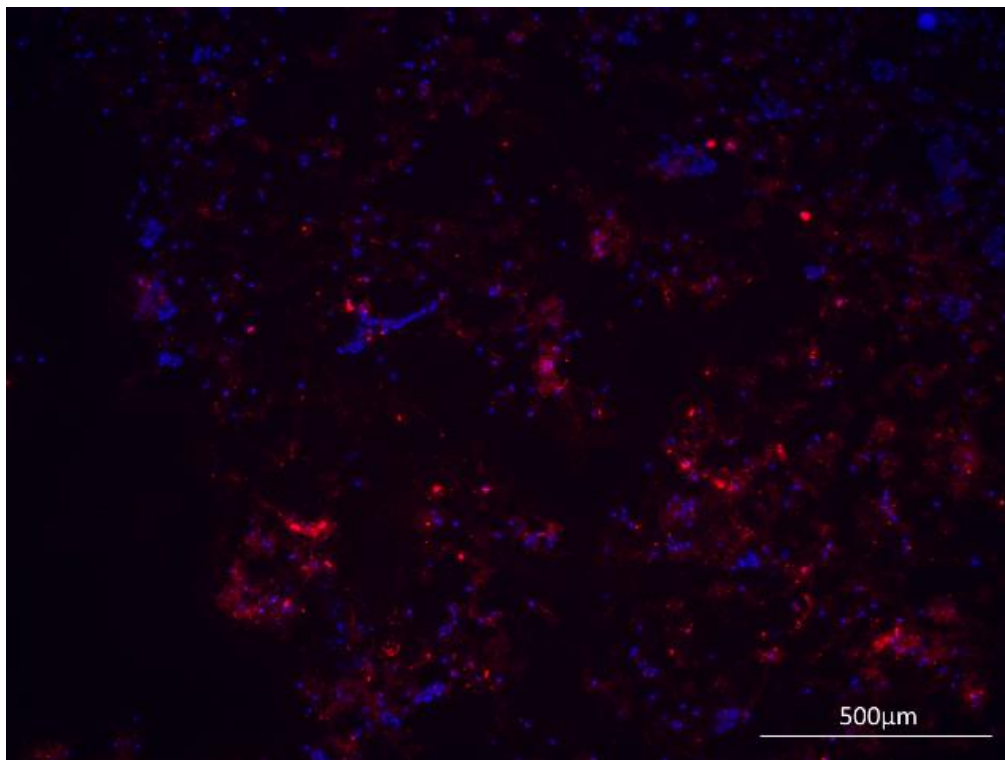


Abbildung 74: Gefrierschnitt des Kadavergewebes nach Injektion von PKH26-markierten sMPCs durch Wasserstrahl in 4facher Vergrößerung

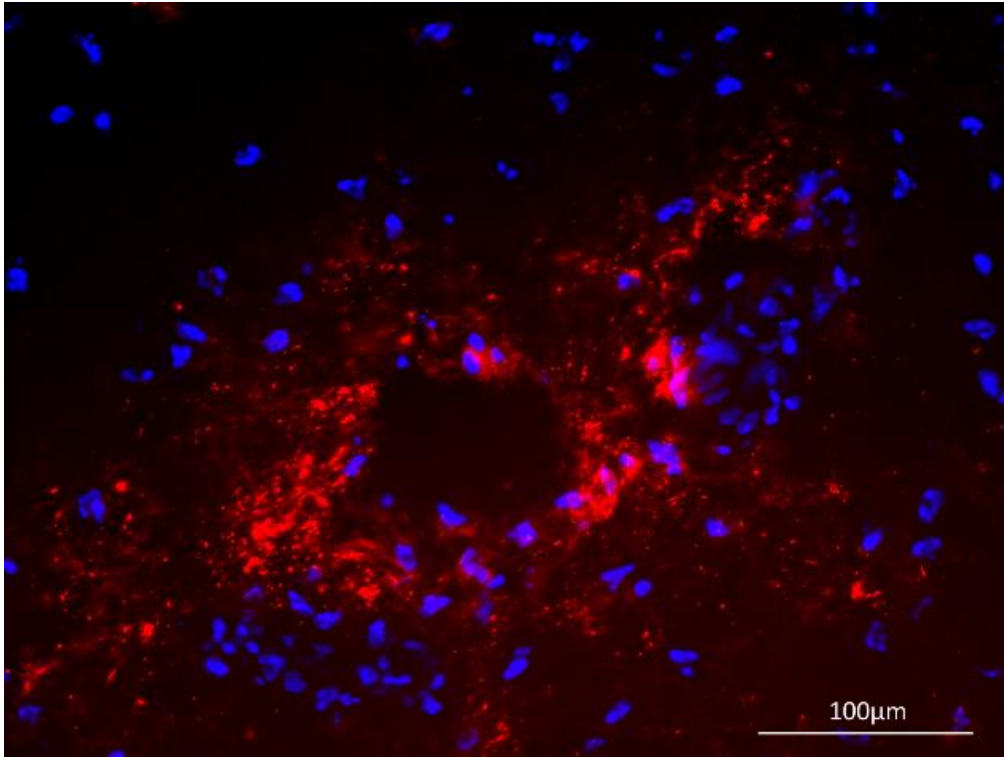


Abbildung 75: Gefrierschnitt des Kadavergewebes nach Injektion von PKH26-markierten sMPCs durch Wasserstrahl in 20facher Vergrößerung

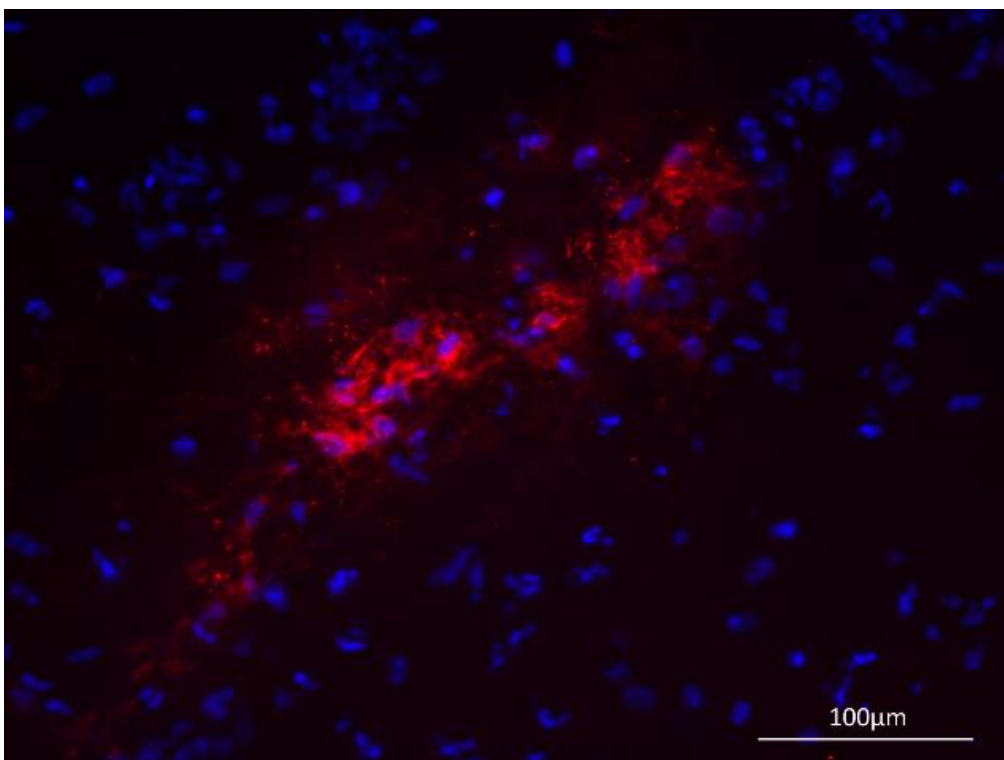


Abbildung 76: Gefrierschnitt des Kadavergewebes nach Injektion von PKH26-markierten sMPCs durch Wasserstrahl in 20facher Vergrößerung

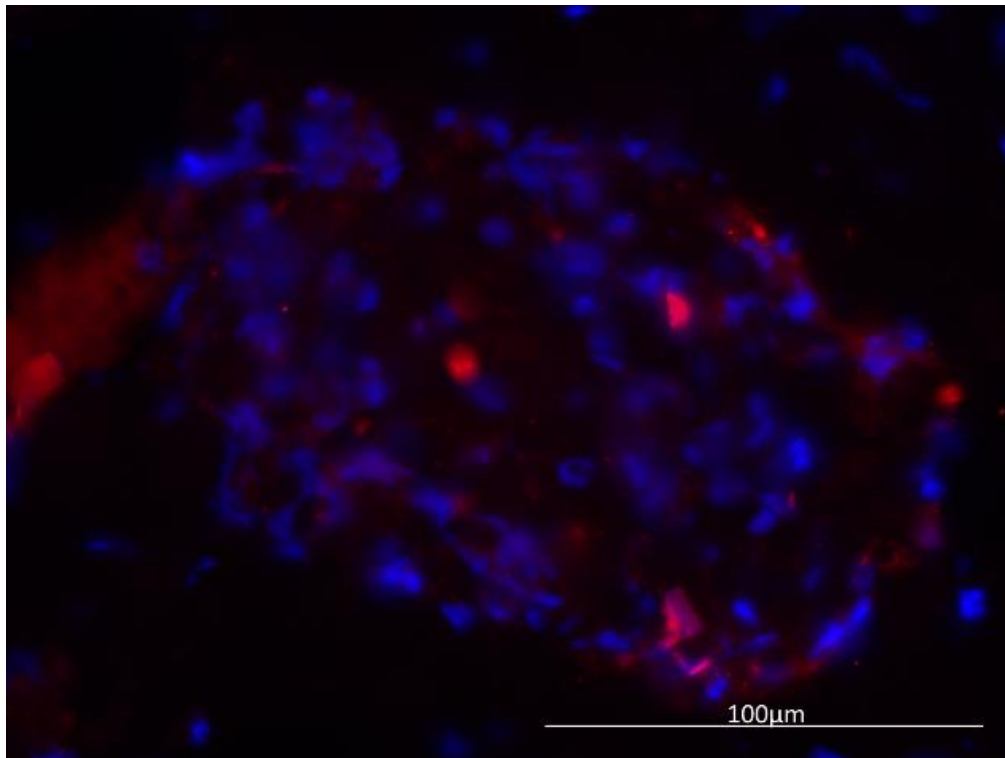


Abbildung 77: Gefrierschnitt des Kadavergewebes nach Injektion von PKH26-markierten sMPCs durch Wasserstrahl in 40facher Vergrößerung

Bei der Mikroskopie der Gefrierschnitte des Kadavergewebes nach Injektion von PKH26-markierten sMPCs mit Wasserstrahltechnik konnten keine morphologisch intakten Zellen detektiert werden. Das rote Fluoreszenzsignal des PKH26 war, wie bei Abbildung 66 in 4facher Vergrößerung zu sehen, überall verteilt, konnte aber keiner Zelle eindeutig zugeordnet werden. Auch die mit DAPI angefärbten Zellkerne wurden teilweise durch die Injektion auseinandergerissen, was man bei 40facher Vergrößerung gut erkennen konnte.

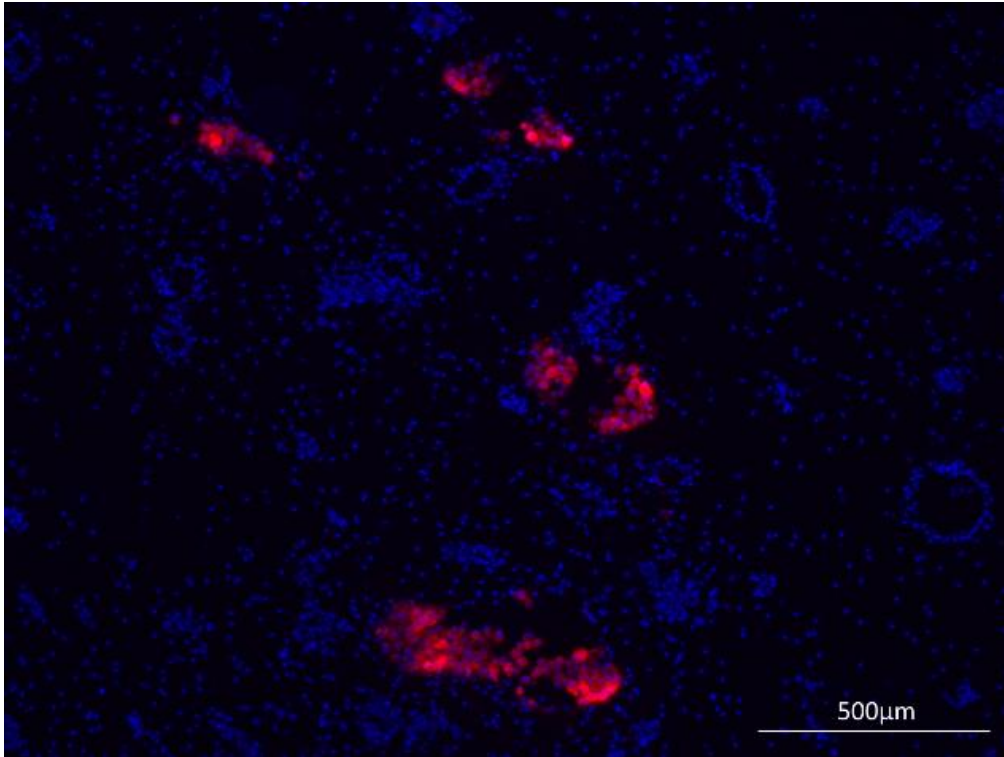


Abbildung 78: Gefrierschnitt des Kadavergewebes nach Injektion von PKH26-markierten sMPCs durch Williams Nadel in 4facher Vergrößerung

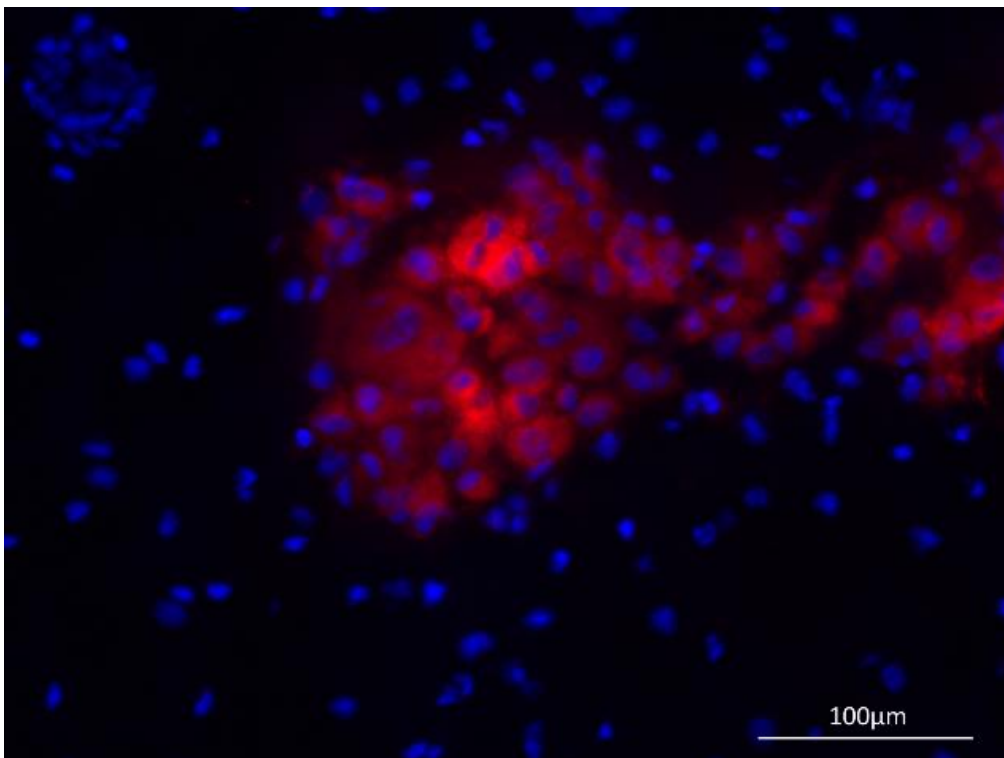


Abbildung 79: Gefrierschnitt des Kadavergewebes nach Injektion von PKH26-markierten sMPCs durch Williams Nadel in 20facher Vergrößerung

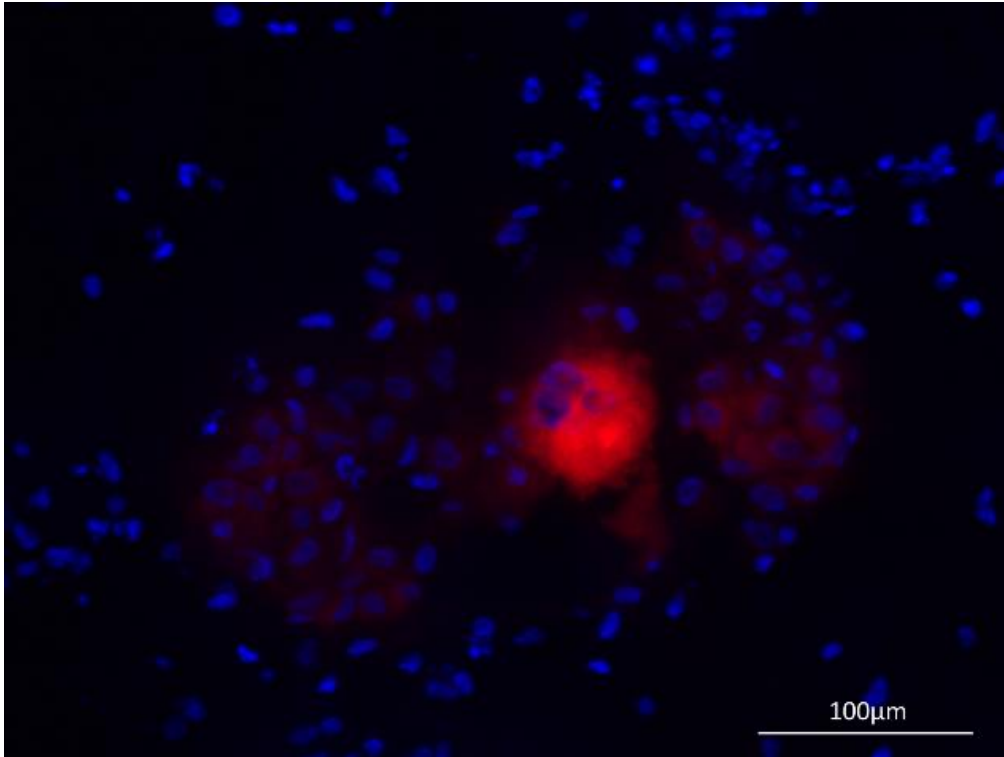


Abbildung 80: Gefrierschnitt des Kadavergewebes nach Injektion von PKH26-markierten sMPCs durch Williams Nadel in 20facher Vergrößerung

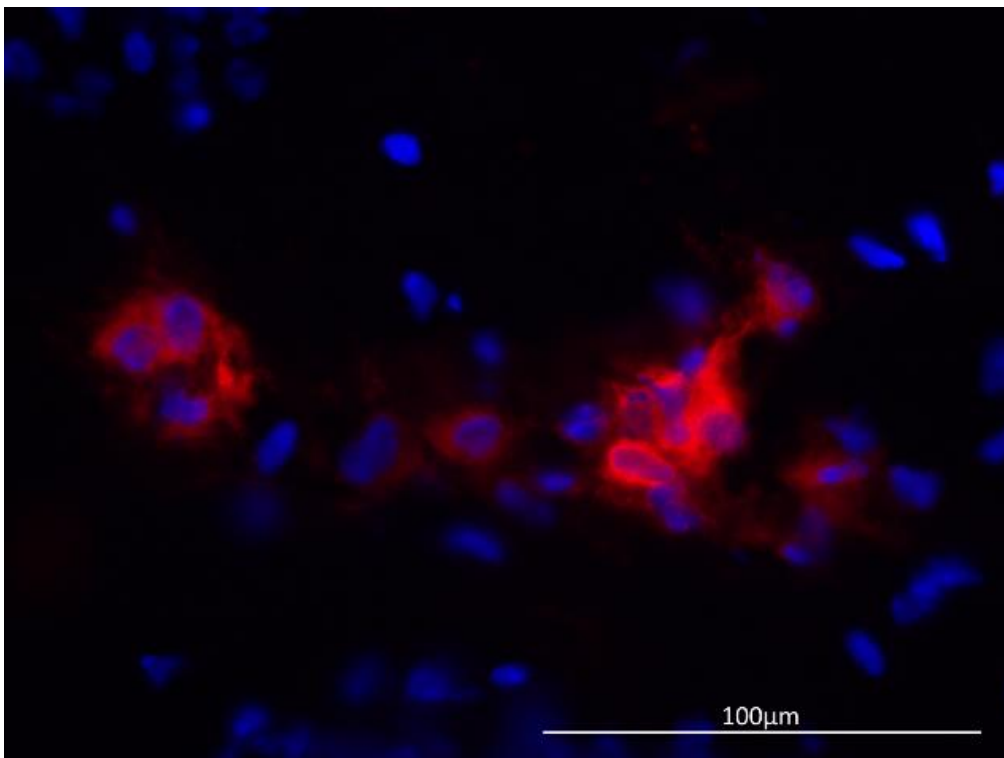


Abbildung 81: Gefrierschnitt des Kadavergewebes nach Injektion von PKH26-markierten sMPCs durch Williams Nadel in 40facher Vergrößerung

Die Gefrierschnitte, die nach Injektion von PKH26-markierten sMPCs mit der Williams Nadel erzeugt wurden, zeigen bei Fluoreszenzmikroskopie ein anderes Bild. Hier konnten die einzelnen Lokalisationen der injizierten Zellhaufen bei 4facher Vergrößerung gut detektiert werden. Bei 20 und 40facher Vergrößerung konnten die Zellen individuell erkannt werden. Die Zellkerne waren vollständig intakt, um sie herum war das PKH26-markierte Zytoplasma zu sehen, das sich auch nur innerhalb der Zellmembran befand. Die Zellen waren nach Injektion also noch morphologisch intakt.

7 Diskussion

7.1 Isolierung von porcinen Muskelprogenitorzellen aus porciner Skelettmuskulatur

Die Etablierung eines Protokolls zur Isolierung porciner Muskelprogenitorzellen gestaltete sich als schwierig, da nach Methode 1 nach wiederholten Versuchen keine Zellen auf den Platten anwuchsen. Einmal konnten durch diese Methode vitale Zellen isoliert und in zwei verschiedenen Medien expandiert werden. Eines der Medien wurden nach M. Mau (M. Mau, 2008) hergestellt, das zweite nach Korrespondenz mit Frau Dr. rer. nat. Kalbe. Nach Charakterisierung der beiden Zellreihen via PCR fiel allerdings auf, dass es sich bei diesen Zellen, sMPC18 Mau und sMPC18 Kalbe, nicht um muskuläre Zellen handelte.

Um selbst MPCs aus porciner Muskulatur isolieren zu können, wurde das Protokoll von Frau Dr. Kalbe übernommen. Hierbei wurde auch die Fehlerquelle entdeckt. Die Tiere wurden bei den vorherigen Versuchen in Tübingen mit intravenösen Medikamenten getötet. Diese schädigen allerdings nicht spezifisch Nervenzellen, sondern greifen unspezifisch alle Zellen an. Dadurch wurden vermutlich auch die MPCs schwer geschädigt und konnten nicht mehr vital aus dem Gewebe isoliert werden. Für die Isolierung dieser Zellart sollten die Tiere ausgeblutet werden, davor kann eine Betäubung durch einen Bolzenschuss oder Elektroschock erfolgen. Die Verabreichung von intravenöser Medikation sollte allerdings vermieden werden, um eine Schädigung der Zellen zu vermeiden. Diese Art der Tötung ist in Tübingen problematisch, da sie in den zur Verfügung stehenden Operationssälen nicht zugelassen ist. Aus diesem Grund ließen Frau Dr. Kalbe uns MPCs aus 2 verschiedenen Isolierungen zukommen, um die Versuche an diesen durchführen zu können. Gleichzeitig dienten die Ergebnisse dieser MPCs als Referenzwerte für eigene Isolierungen, die nach Tötung der Tiere mit gesättigter Kaliumchlorid-Lösung erfolgreich durchgeführt werden konnten.

7.2 Polymerasekettenreaktion

Für den ersten Teil der Charakterisierung der isolierten Zellen wurde eine PCR auf fünf muskuläre Gene durchgeführt – sMyf5, sMyf6, sMyoD1, Myostatin

(sMSTN) und sACT, wobei Actin nicht nur von Zellen der muskulären Nische exprimiert wird, sondern von vielen verschiedenen Zelltypen. Ein alleiniger Nachweis von sACT in den isolierten Zellen ist daher nicht ausreichend, um die Zellen der muskulären Linie zuordnen zu können. Die PCR, die an den Linien sMPC18 Kalbe und sMPC18 Mau, die nach Methode 1 isoliert wurden, konnte Actin in deren cDNA nachweisen, aber keines der anderen Gene zeigte ein positives Ergebnis. Aus diesem Grund wurden diese beiden Zelllinien als nicht muskulär eingestuft und verworfen. Ursächlich für die Isolierung des falschen Zelltyps ist vermutlich der fehlende Separationsschritt der Fibroblasten von MPCs. Bei Methode 2 wurde nach Aufarbeitung des Gewebes ein Percollgradient erzeugt, der die Muskelprogenitorzellen von Fibroblasten, Erythrozyten und anderen Zellen trennte. Anschließend wurden nur die angereicherten Zellen, in diesem Fall die sMPCs, in Kultur genommen. Dies bestätigte auch die PCR der Zellreihen sMPC19, sMPC20 und sMPC21. In der cDNA von sMPC19 konnten alle fünf muskulären Gene eindeutig nachgewiesen werden, bei sMPC20 fielen sACT, sMyo5 und sMyoD1 positiv aus. Die Vermutung liegt nahe, dass sie die beiden Zellreihen bei Isolierung der RNA in verschiedenen Differenzierungsstadien befanden und die Zellen der Reihe sMPC19 schon weiterentwickelt waren. In der Reihe der sMPC21, die im Tübinger Labor selbständig isoliert wurden, waren nur die Gene sACT und sMyf5 eindeutig positiv. Dies kann entweder daran liegen, dass sich die Zellen zum Zeitpunkt der RNA-Extraktion noch ganz am Anfang ihrer Differenzierung befanden und diese noch nicht richtig begonnen hatte. Eine andere mögliche Erklärung ist die Zentrifugation des Percollgradienten. Im Protokoll von Frau Dr. Kalbe war eine Zentrifugation bei 4°C und 15000g für 9min ohne Pause vorgeschrieben. In unserem Labor stand allerdings keine Zentrifuge mit Ausschwingrotor zur Verfügung, die eine solche Drehzahl aufbringen kann. Um die Isolierung der Zellen trotzdem durchführen zu können, wurde der Gradient bei 4°C und 10000g für 15min abzentrifugiert. Möglich ist also, dass die Separation der Zellen nicht vollständig erfolgen konnte und sich darum eine Mischkultur von Fibroblasten und Muskelvorläuferzellen bildete.

7.3 Immunfluoreszenzfärbung

Da die Charakterisierung der sMPCs durch die PCR nicht bei allen Zellreihen, die nach Methode 2 isoliert wurden, eine eindeutige Zuordnung zur muskulären Nische erlaubten, wurde zur Sicherheit eine Immunfluoreszenzfärbung auf Desmin, Slow Myosin und Fast Myosin durchgeführt. Hierbei bedeutet der Nachweis von Desmin, dass es sich bei den gefärbten Zellen um muskuläre Zellen handelt, eine Zuordnung zu glatter oder quergestreifter Muskulatur ist allerdings nur durch Nachweis von Slow- beziehungsweise Fast Myosin möglich, da Myosin nur in Skelettmuskulatur vorkommt.

Nachdem durch mehrere Vorversuche ein Protokoll zur Immunfluoreszenzfärbung von porcinen Muskelprogenitorzellen etabliert wurde, konnten die Zellen gut auf den Chamber Slides expandiert und angefärbt werden. Das Ergebnis fiel bei allen drei Zellreihen und allen drei Genen positiv aus. Dadurch wurde bestätigt, dass es sich bei den nach Methode 2 isolierten Zellen um kontraktile Zellen handelte, die auf Grund des Nachweises von Slow- und Fast Myosin der quergestreiften Muskulatur abstammten. Beim Vergleich der Immunfluoreszenzfärbungen der verschiedenen Zellreihen fällt allerdings auf, dass es Unterschiede in der Quantität des roten Fluoreszenzsignals der sekundären Antikörper gibt. Bei der Färbung der Linien sMPC19 und sMPC20 sind fast alle der DAPI gefärbten Zellkerne von rotem Signal, also positivem Proteinnachweis im Zytoplasma, umgeben. Anders ist das Bild der Färbung von sMPC21. Hier ist der Anteil der Zellen, deren Zellkern von eindeutig angefärbtem Zytoplasma umgeben sind, deutlich geringer. Dieses Ergebnis spricht ebenfalls für die Annahme, dass es sich nicht um eine reine sMPC-Kultur handelt, sondern in dieser auch Fibroblasten vorhanden sind.

7.4 Injektionsversuche in Medium mit unmarkierten Zellen

Um das Verhalten der MSCs und MPCs bei Injektionen zu analysieren, wurden sie zu Beginn ohne Markierung in Medium versprüht. Dies fand sowohl mit der Williams Nadel als auch durch Wasserstrahl statt. Bei Versprühen der sMPC18 Linien mit Hilfe der Wasserstrahltechnik überlebten 87,3% der Zellen den Transfer bei Druckprofil 1, bei Profil 2 überlebten nur noch 56,2%. Bei

Anwendung von Profil 1 bei Versprühen der MSCs erhielt man mit 86,7% eine vergleichbare Vitalität. Diese sank um 11,9% bei Applizieren der MSCs durch die Williams Nadel. Der Injektionsversuch der sMPCs wurde wiederholt, nachdem man sMPCs nach Methode 2 isoliert hatte. Auffällig war hierbei, dass die Vitalität der Zellen bei beiden Druckprofilen deutlich geringer war, als die der sMPC18. Wurden die Zellen allerdings mit der Williams Nadel versprüht, so lag die Vitalität mit 87,3% wieder im Normalbereich. Die große Differenz der Vitalität zwischen den versprühten Myoblasten liegt vermutlich an deren Isolierungsmethoden. Da es sich bei sMPC18 vermutlich um Mischkulturen handelte, wurden nicht nur Myoblasten, sondern auch die mitexpandierten Fibroblasten versprüht. Bei Fibroblasten handelt es sich um einen sehr robusten Zelltyp, was die hohe Vitalität bei Versprühen durch Wasserstrahl erklärt. Reine Myoblastenkulturen, wie sie beim zweiten Versuchstag verwendet wurden, reagieren sensibler auf verschiedene Drücke. Aus diesem Grund lag die Vitalität je nach Protokoll zwischen 67,5% und 27,9% und damit deutlich unter den Werten des ersten Versuchstags.

7.5 Injektionsversuche in Medium und Kadavergewebe mit PKH26-markierten Zellen

Sowohl die mesenchymalen Stammzellen als auch die Muskelprogenitorzellen ließen sich sehr gut mit dem Fluoreszenzfarbstoff PKH26 markieren. Die Zellen blieben nach Markierung vital und konnten wie gewohnt expandiert und passagiert werden. Durch PKH26 war eine anhaltende Markierung möglich, mit der eine Detektion der Zellen auch nach über einer Woche noch möglich war.

Problematisch ist bei dieser Färbung allerdings, dass sich die Zellmembran durch die PKH26-Partikel verändert. Die lipophilen Ketten des PKH26 werden in die Membran eingebaut und verändern dadurch ihre Morphologie. Die Zellen werden dadurch größer und instabiler.

Bei den Injektionsversuchen in Medium fiel auf, dass sich bei PKH26-markierten und unmarkierten sMPCs, die mit Wasserstrahl bei gleichem Druckprofil versprüht wurden, ein großer Unterschied in der Vitalität ergab. Von den PKH26-markierten sMPCs überlebten mit 32,8% weniger als halb so viele Zellen, als von

den unmarkierten sMPCs bei gleichen Bedingungen, bei denen die Vitalität bei 67,5% lag. Bei Druckprofil 2 verringerte sich die Vitalität der sMPCs erneut um über 50% verglichen mit dem entsprechenden Gegenversuch bei Druckprofil 1.

Vergleicht man die Ergebnisse der Injektionsversuche in Medium von PKH26-markierten und unmarkierten sMPCs mit PKH26/BacMam-markierten und unmarkierten hMSCs fällt auf, dass die Vitalität der hMSCs bei allen Versuchsbedingungen höher ist, als die der sMPCs. Auch ist der Unterschied in der Vitalität der PKH26/BacMam-markierten und unmarkierten hMSCs mit 63,4% und 75,0% deutlich geringer als bei den sMPCs. Die muskulären Zellen weisen also in Bezug auf Druckeinwirkung und Markierung mit PKH26 eine deutlich geringere Widerstandsfähigkeit auf, als die mesenchymalen Stammzellen.

Zu diesem Ergebnis gelangt man ebenfalls, wenn man die Histologie der Injektionsversuche von PKH26-markierten sMPCs in Kadavergewebe miteinbezieht. Die Zellen, die mit Wasserstrahl in das Gewebe injiziert wurden, konnten in den Kryoschnitten nicht mehr morphologisch intakt aufgefunden werden. Die Zellmembran und teilweise auch die Zellkerne wurden durch die Druckeinwirkung der Wasserstrahlinjektion zerstört. Das rote Fluoreszenzsignal konnte dem Zytoplasma der einzelnen Zellen nicht eindeutig zugeordnet werden. Häufig waren rote Signale ohne umliegenden Zellkern sichtbar. Im Gegensatz dazu war die Injektion mit Hilfe der Williams Nadel deutlich schonender für die sMPCs. Nach dieser Injektionsmethode konnten die Zellen strukturell intakt aufgefunden werden. Weder die Zellmembran noch die Zellkerne wurden geschädigt. Das rote Fluoreszenzsignal konnte eindeutig dem Zytoplasma einzelner Zellen zugeordnet werden. Die Injektion mit Williams Nadel wurde deutlich langsamer durchgeführt, als die Injektion mit Wasserstrahl, auch wenn diese mit niedrigem Druckprofil durchgeführt wurde. Es wirkten daher weniger Druck und deutlich geringere Scherkräfte auf die Zellen ein. Die sMPCs reagieren also sehr sensibel auf Druckeinwirkung.

8 Zusammenfassung

In den Vorversuchen zur Etablierung der Methodik wurden die Grundtechniken der Zellkultur und Methoden zur Qualitätssicherung, (i.e., Dominici-Kriterien) an humanen mesenchymalen Stromazellen (hMSCs) untersucht und bestätigt. Die hMSCs wiesen adhärentes Wachstum auf, waren negativ für die Marker CD14 und CD34, und positiv für CD90 und CD73, und konnten in vitro osteogen und adipogen differenziert werden. Diese Zellen wurden dann für die nachfolgenden Sprühversuche verwendet.

Zur Vorbereitung für Sprühversuche wurde die Markierung von Zellen mit PKH26 etabliert. Die Markierung hatte keinen negativen Effekt auf die Vitalität und Proliferation der Zellen. Allerdings sank die Vitalität PKH26-markierter hMSCs nach Wasserstrahl-Injektion in Medium im Vergleich zu unmarkierten hMSCs um 11,6%.

Für die Versuche mit porcinen Muskelprogenitorzellen (sMPCs) wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Claudia Kalbe (FBN Dummerstorf) Protokolle zur Zellproduktion etabliert. Die sMPCs haben eine durchschnittliche Größe von 20µm und proliferieren am stärksten von Passage 4 zu 5. Durch PCR konnten verschiedene Muskelmarkergene nachgewiesen werden, durch Immunfluoreszenz die Expression der kontraktilen Proteine Desmin, Slow Myosin und Fast Myosin.

Um das Verhalten der sMPCs bei Injektion zu testen, wurden die Zellen mit Wasserstrahl und Williams Nadel sowohl in Medium als auch in Kadavergewebe gesprüht. Beim Sprühen in Medium wurden unmarkierte und PKH26-markierte sMPCs getestet. Das Sprühen der unmarkierten sMPCs in Medium ergab eine Vitalität von 67,5% bei Druckprofil 1 und von 27,9% bei Druckprofil 2. Die Vitalität der PKH26-markierten sMPCs lag bei Verwendung von Profil 1 bei 32,8% und bei Profil 2 bei 12,5%. Nach Injektion PKH26-markierter sMPCs in Kadavergewebe wurden keine vitalen Zellen nachgewiesen. Fluoreszenzsignale war im Gewebe dank IVIS-Imaging und in Kryoschnitten mikroskopisch detektierbar. Nach Wasserstrahlinjektion wurden in Gewebeproben keine morphologisch intakten PKH26-markierten sMPCs gefunden, die mit Williams Nadel applizierten Zellen hingegen waren morphologisch intakt. Die Wasserstrahltechnik muss also noch weiter erforscht und verbessert werden, um markierte muskuläre Zellen effektiv versprühen zu können. Nach heutigem Wissensstand ist diese Methode ist nicht geeignet, um vitale Muskelvorläuferzellen in Gewebe zu injizieren.

9 Literaturverzeichnis

- A. Furuta, R. J. (2007). State of the Art of Where We Are at Using Stem Cells for Stress Urinary Incontinence. *Neurourology and Urodynamics* 26, S. 966–971.
- A. West Vilsboll, J. M. (2018). Cell-based therapy for the treatment of female stress urinary incontinence: an early cost-effectiveness analysis. *Regenerative Medicine* , S. 321-330.
- A.A. Ford, L. R. (1. Juli 2015). Mid-urethral sling operations for stress urinary incontinence in women. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*.
- B. Herrera-Imbroda, M. L.-D. (2015). Stress urinary incontinence animal models as a tool to study cell-based regenerative therapies targeting the urethral sphincter. *Advanced Drug Delivery Reviews*, S. 106-116.
- B. Vayleux, J. R. (Juni 2011). Female urinary incontinence and artificial urinary sphincter: study of efficacy and risk factors for failure and complications. *European urology*, S. 1048-1053.
- Boctor, G. G. (4. März 2014). Update on Urethral Bulking Agents for Female Stress Urinary Incontinence due to Intrinsic Sphincter Deficiency. *Journal of Urology and Research*.
- C. Dumoulin, E. H.-S.-S. (14. Mai 2014). Pelvic floor muscle training versus no treatment, or inactive control treatments, for urinary incontinence in women. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*.
- D. Kwon, Y. K. (August 2006). Periurethral cellular injection: comparison of muscle-derived progenitor cells and fibroblasts with regard to efficacy and tissue contractility in an animal model of stress urinary incontinence. *Urology* 68, S. 449-454.
- Damaser, C. T. (Februar 2015). The potential role of stem cells in the treatment of urinary incontinence. *Therapeutic Advances in Urology*, S. 22-40.

- Erbe Elektromedizin GmbH. (3. Juli 2018). <https://de.erbe-med.com/de-en/>. Von <https://de.erbe-med.com/de-en/products/hydrosurgery/product/erbejet-2/> abgerufen
- G. Lin, G. W. (2010). Treatment of stress urinary incontinence with adipose tissue-derived stem cells. *Cytotherapy*, S. 88-95.
- H. Gerullis, C. E.-B. (2012). Muscle-Derived Cells for Treatment of Iatrogenic Sphincter Damage and Urinary Incontinence in Men. *The Scientific World Journal*.
- H. Yin, F. P. (Januar 2013). Satellite Cells and the Muscle Stem Cell Niche. *American Physiological Society*, S. 23-67.
- Heesakkers, A. M. (Juli 2018). Contemporary diagnostics and treatment options for female stress urinary incontinence. *Asian Journal of Urology*, S. 141-148.
- Holmes, R. D. (Juni 2011). Actin Structure and Function. *Annual Review of Biophysics Vol. 40*, S. 169-186.
- I. Kristensen, M. E. (November 2010). Complications of the tension-free vaginal tape procedure for stress urinary incontinence. *International urogynecology journal*, S. 1353-1357.
- I. M. Aragón, B. H.-I. (2018). Cell Therapy Clinical Trials for Stress Urinary Incontinence: Current Status and Perspectives. *International Journal of Medical Sciences*, S. 195-204.
- J. CJ Chen, D. J. (13. November 2003). Skeletal muscle stem cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*.
- J. H. Kim, S.-R. L. (7. August 2013). Stem Cell Therapy in Bladder Dysfunction: Where Are We? And Where Do We Have to Go? *BioMed Research International* .
- K.M. Peters, R. D. (2014). Autologous Muscle Derived Cells for Treatment of Stress Urinary Incontinence in Women. *The Journal of Urology*.

- L.L. Subak, R. W. (29. Januar 2009). Weight loss to treat urinary incontinence in overweight and obese women. *The New England journal of medicine* , S. 481-490.
- M. Dominici, K. L.-C. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, S. 315-37.
- M. Gotoh, T. Y. (2014). Regenerative treatment of male stress urinary incontinence by periurethral injection of autologous adipose-derived regenerative cells: 1-year outcomes in 1 patients. *International Journal of Urology*, S. 294-300.
- M. Gyöngyösi, P. M. (7. July 2018). *Circulation Research*. Von <http://circres.ahajournals.org/content/123/2/301> abgerufen
- M. Imamura, K. W. (2. Dezember 2015). Lifestyle interventions for the treatment of urinary incontinence in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. Von Cochrane Database of Systematic Reviews. abgerufen
- M. Mau, N. O. (2008). Establishment and conditions for growth and differentiation of a myoblast cell line derived from the semimembranosus muscle of newborn piglets. *In Vitro Cell.Dev.Biol.- Aimal*.
- M. Vaegler, A. T.-D. (August 2012). Stem cell therapy for voiding and erectile dysfunction . *Nature Reviews, Urology* , S. 435-447.
- M. Vaegler, L. D.-D. (2014). Zellbasierte Therapie der Belastungsinkontinenz; Welche Zelle zu welchen Kosten? *Urologe*.
- M.C. Lapitan, J. C. (15. Februar 2016). Open retropubic colposuspension for urinary incontinence in women. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*.
- N. F. Davis, F. K. (Juni 2013). Injectable biomaterials for the treatment of stress urinary incontinence: their potential and pitfalls as urethral bulking agents. *international urogynecology journal*, S. 913-919.

- R. G. Walker, T. P. (1. April 2016). Biochemistry and Biology of GDF11 and Myostatin: similarities, differences and questions for future investigation. *Circulation Research* 118, S. 1125-1142.
- R. Yiou, J.-Y. H.-M.-J.-T.-P. (2013). Periurethral skeletal myofibre implantation in patients with urinary incontinence and intrinsic sphincter deficiency: a phase 1 clinical trial. *BJU International*, S. 1105-1115.
- Riss, P. (2009). Chirurgische Therapie der Stressharninkontinenz (SUI) - ein Überblick. *Journal für Urologie und Urogynäkologie*, S. 23-28.
- S. de Wilde, H.-J. G. (30. November 2016). Clinical development of gene- and cell-based therapies: overview of the European landscape. *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development*.
- V. Kirchin, T. P. (15. Februar 2012). Urethral injection therapy for urinary incontinence in women. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*.
- Y. Kinebuchi, N. A. (April 2010). Autologous bone-marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation into injured rat urethral sphincter. *International Journal of Urology*, S. 359-368.
- Zammit, P. S. (6. November 2017). Function of the myogenic regulatory factors Myf5, MyoD, Myogenin and MRF4 in skeletal muscle, satellite cells and regenerative myogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*.

10 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im Zentrum für Medizinische Forschung des Universitätsklinikums Tübingen in der Universitätsklinik für Urologie unter Betreuung von Prof. Dr. Wilhelm K. Aicher durchgeführt.

Die Planung der einzelnen Sprühversuche erfolgte in Abstimmung mit Prof. Enderle, Luise Jäger und weiteren Mitarbeitern der Firma Erbe.

Die Isolierung der sMPCs aus Skelettmuskulatur wurde in Kooperation mit Frau Dr. rer. Nat. Claudia Kalbe aus dem Leibniz Institute for Farm and Animal Biology (FBN), Institute for Muscle and Growth, etabliert.

Die Arbeit an und mit den verschiedenen Zellkulturen wurde nach Einarbeitung durch Tanja Abruzzese und Conny Bock von mir eigenständig durchgeführt. Ebenso fanden PCR, Immunfluoreszenzfärbung, PKH26-Färbung und die Histologie der Kadavergewebe in eigenständiger Arbeit statt. Die FACS-Analyse und die Größenbestimmung via CASY wurden in Zusammenarbeit mit Tanja Abruzzese durchgeführt. Sämtliche Injektionsversuche fanden in Zusammenarbeit mit Tanja Abruzzese und Luise Jäger (Firma Erbe) statt. Die Detektion des PKH26-Signals im Kadavergewebe via IVIS wurde in Kooperation mit dem Werner Siemens Imaging Center in Tübingen von Dr. Nicolas Beziere durchgeführt.

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

Tübingen, den 19.02.2019

11 Danksagung

Ein großes Dankeschön gebührt den Kolleginnen und Kollegen des Forschungslabors der Universitätsklinik für Urologie, in der ich eine erfolgreiche Forschungszeit erleben konnte. Ganz besonders möchte ich mich hierbei bei Tanja Abruzzese bedanken, die mich im Labor eingearbeitet und bei meiner gesamten Arbeit sehr unterstützt hat. Ich bin sehr dankbar für ihre Geduld, ihre Ratschläge und ihr offenes Ohr!

Des Weiteren bedanke ich mich beim Forschungsteam der Firma ERBE Elektromedizin GmbH, ohne deren Unterstützung die Injektionsversuche nicht möglich gewesen wären.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Frau Dr. rer. nat. Claudia Kalbe aus dem Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (FBN) in Dummerstorf, die mich für ein Praktikum aufgenommen hat und die ich in ihrem Institut begleiten durfte, um die ihre Methode zur Isolation von myogenen Zellen zu erlernen und an das Team in Tübingen weiterzugeben.

Mein besonderer Dank gilt dem Laborleiter, Herrn Prof. Wilhelm K. Aicher, für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung dieser Doktorarbeit.

Diese Dissertationsarbeit ist Bestandteil eines Teilprojekts der drittmittelgeförderten Projekte MultiMorb INKO (Bundesministerium für Bildung und Forschung) und MUS.I.C. (EU-Förderprogramm Horizon 2020). Bei den fördernden Institutionen bedanke ich mich für die Bereitstellung der Mittel.