

Aus dem Institut für Tierpathologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

„Zellbasierte Strategien für die Speicheldrüsenregeneration“

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von Jessica Oder
Tierärztin aus Hamburg

Berlin 2009

Journal-Nr. : 3299

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Prof. Dr. med. vet. Leo Brunnberg
Erster Gutachter: Prof. Dr. med. vet. Anja Sterner-Kock
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. med. Hartmut Merz
Dritter Gutachter: Prof. Dr. med. vet. Heike Tönhardt

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Mesenchymal stem cells (MeSH), Regeneration, Xerostomia (MeSH),
Salivary glands, Regeneration, Mice, Animal models

Tag der Promotion: 10.07.2009

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86664-725-1

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2009

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© **mensch und buch** verlag 2009

choriner str. 85 - 10119 berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|--------------|---|----|
| 1 | Einleitung..... | 4 |
| 1.1 | Mesenchymale Stammzellen aus der Speicheldrüse | 4 |
| 2 | Literaturübersicht..... | 6 |
| 2.1 | Tumoren im Kopf-Hals-Bereich..... | 6 |
| 2.1.1 | Epidemiologie und Risikofaktoren | 6 |
| 2.1.2 | Einteilung nach Lokalisation, Ausdehnung (TNM-System) und histologischem Differenzierungsgrad (Grading)..... | 6 |
| 2.1.3 | Diagnose, Therapie und Prognose | 8 |
| 2.2 | Speicheldrüsen..... | 10 |
| 2.2.1 | Aufbau, Funktion..... | 10 |
| 2.2.1.1 | Glandula parotidea..... | 11 |
| 2.2.1.2 | Glandula submandibularis | 12 |
| 2.2.1.3 | Glandula sublingualis | 12 |
| 2.3 | Xerostomie..... | 12 |
| 2.3.1 | Definition..... | 12 |
| 2.3.2 | Ursachen | 13 |
| 2.3.3 | Folgen | 14 |
| 2.3.4 | Therapie | 15 |
| 2.4 | Stammzellen | 19 |
| 2.4.1 | Stammzellen im Überblick | 19 |
| 2.4.2 | Embryonale Stammzellen..... | 20 |
| 2.4.3 | Adulte Stammzellen | 21 |
| 2.4.3.1 | Hämatopoetische Stammzellen..... | 22 |
| 2.4.3.2 | Mesenchymale Stammzellen | 25 |
| 2.4.3.2.1 | Potentielle mesenchymale Stammzellmarker und deren Funktion..... | 27 |
| 2.4.3.2.1.1 | CD13..... | 27 |
| 2.4.3.2.1.2 | CD29..... | 28 |
| 2.4.3.2.1.3 | CD44..... | 28 |
| 2.4.3.2.1.4 | CD54..... | 28 |
| 2.4.3.2.1.5 | CD73..... | 29 |
| 2.4.3.2.1.6 | CD90..... | 30 |
| 2.4.3.2.1.7 | CD105..... | 30 |
| 2.4.3.2.1.8 | CD106..... | 30 |
| 2.4.3.2.1.9 | CD140b..... | 31 |
| 2.4.3.2.1.10 | CD166..... | 31 |
| 2.4.3.2.1.11 | Stro-1 | 31 |
| 2.4.3.2.1.12 | Differenzierungsmechanismen mesenchymaler Stammzellen | 32 |
| 2.4.3.2.2 | Adipogenese | 33 |
| 2.4.3.2.2.1 | <i>In vitro</i> Adipogenese | 35 |
| 2.4.3.2.3 | Chondrogenese | 36 |
| 2.4.3.2.3.1 | <i>In vitro</i> Chondrogenese | 40 |
| 2.4.3.2.4 | Osteogenese | 41 |
| 2.4.3.2.4.1 | <i>In vitro</i> Osteogenese | 44 |

| | | |
|-----------|--|----|
| 3 | Material und Methoden | 45 |
| 3.1 | Material..... | 45 |
| 3.1.1 | Antikörper..... | 45 |
| 3.1.1.1 | Antikörper für die Immunhistochemie | 45 |
| 3.1.1.2 | Antikörper für die Durchflusszytometrie | 45 |
| 3.1.2 | Färbelösungen..... | 45 |
| 3.1.3 | Geräte..... | 46 |
| 3.1.4 | Gewebeproben | 46 |
| 3.1.5 | Kits..... | 47 |
| 3.1.6 | Molekularbiologische Chemikalien..... | 47 |
| 3.1.7 | Primer | 47 |
| 3.1.8 | Reagenzien..... | 47 |
| 3.1.9 | Verbrauchsmaterial..... | 49 |
| 3.1.10 | Zellkulturmedien | 50 |
| 3.1.10.1 | Stammzellmedium | 50 |
| 3.1.10.2 | Adipozyten-Induktionsmedium | 50 |
| 3.1.10.3 | Adipozyten-Erhaltungsmedium..... | 50 |
| 3.1.10.4 | Osteoblasten-Induktionsmedium | 51 |
| 3.1.10.5 | Chondrozyten-Induktionsmedium..... | 51 |
| 3.1.10.6 | Einfriermedium..... | 51 |
| 3.2 | Methoden | 52 |
| 3.2.1 | Zellbiologische Methoden | 52 |
| 3.2.1.1 | Isolierung mesenchymaler Stammzellen | 52 |
| 3.2.1.2 | Kultivierung mesenchymaler Stammzellen..... | 52 |
| 3.2.1.3 | Differenzierung mesenchymaler Stammzellen..... | 53 |
| 3.2.1.3.1 | Adipogene Differenzierung | 53 |
| 3.2.1.3.2 | Osteogene Differenzierung..... | 53 |
| 3.2.1.3.3 | Chondrogene Differenzierung | 54 |
| 3.2.1.4 | Bestimmung der Zellzahl..... | 54 |
| 3.2.1.5 | CFU-F-Assay | 55 |
| 3.2.2 | FACS-Analyse..... | 55 |
| 3.2.2.1 | Phänotypisierung von MSC mittels Durchflusszytometrie | 61 |
| 3.2.2.2 | Zellzahlbestimmung von mesenchymalen Stammzellen mit Hilfe von | 63 |
| 3.2.2.3 | Durchflusszytometrische Zellgrößenbestimmung..... | 65 |
| 3.2.2.4 | Durchflusszytometrische Bestimmung der Stro-1- und Alkalischen Phosphatase-Expression | 66 |
| 3.2.3 | Histologische und Immunhistologische Färbungen | 68 |
| 3.2.3.1 | Histologische Färbetechniken..... | 68 |
| 3.2.3.1.1 | Alkalische Phosphatase | 68 |
| 3.2.3.1.2 | Alcianblau..... | 68 |
| 3.2.3.1.3 | Sudan III | 69 |
| 3.2.3.2 | Immunhistochemische Färbungen | 69 |
| 3.2.3.2.1 | Osteopontin..... | 69 |
| 3.2.3.2.2 | Bone sialoprotein | 70 |
| 3.2.3.2.3 | Kollagen..... | 70 |
| 3.2.3.2.4 | SV-40-Färbung | 71 |
| 3.2.4 | Molekularbiologische Methoden..... | 72 |
| 3.2.4.1 | RT-PCR | 72 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 4 | Ergebnisse..... | 75 |
| 4.1 | Mesenchymale Stammzellen aus der Speicheldrüse | 75 |
| 4.1.1 | Isolierung humaner MSC..... | 75 |
| 4.1.2 | Kulturverlauf humaner MSC | 75 |
| 4.1.3 | Fibroblast colony-forming unit-assay..... | 77 |
| 4.1.4 | Präsentation von Oberflächenmarkern | 77 |
| 4.1.5 | Natives Speicheldrüsengewebe | 83 |
| 4.1.6 | Multipotentes Differenzierungspotential humaner MSC..... | 83 |
| 4.1.7 | Etablierung eines Xerostomie-Mausmodells | 89 |
| 5 | Diskussion | 93 |
| 5.1 | Mesenchymale Stammzellen aus der Speicheldrüse | 93 |
| 5.2 | Charakterisierung mesenchymaler Stammzellen..... | 96 |
| 5.3 | Speicheldrüsengewebe..... | 97 |
| 5.4 | Mesenchymale Stammzellen <i>in vivo</i> | 98 |
| 5.5 | Therapeutische Ansätze für die Nutzung mesenchymaler Stammzellen in der regenerativen Medizin..... | 103 |
| 5.5.1 | Lokale Implantation..... | 103 |
| 5.5.2 | Systemische Transplantation | 104 |
| 5.5.3 | Die Kombination von Stammzellen und Gentherapie | 105 |
| 5.5.4 | Tissue engineering | 107 |
| 6 | Zusammenfassung | 109 |
| 7 | Summary..... | 110 |
| 8 | Literaturverzeichnis | 111 |
| 9 | Abkürzungsverzeichnis | 138 |
| 10 | Abbildungsverzeichnis | 141 |
| 11 | Tabellenverzeichnis | 143 |
| 12 | Publikationsverzeichnis | 146 |
| 13 | Danksagung | 147 |
| 14 | Selbständigkeitserklärung..... | 148 |

1 Einleitung

1.1 Mesenchymale Stammzellen aus der Speicheldrüse

Adulte Stammzellen haben in den letzten Jahren signifikantes Interesse in der regenerativen Medizin hervorgerufen. Diese Zellen konnten aus den unterschiedlichsten Geweben isoliert werden, scheinen aber lediglich in geringer Menge in den Geweben vorhanden zu sein. Für die klinische Anwendung sind aber große Mengen dieser Zellen notwendig die ein verlässliches Differenzierungspotential aufweisen. Hierfür ist die Identifizierung neuer Stammzellquellen ebenso unerlässlich, wie die Etablierung optimaler Bedingungen in der Zellkultur. Zusätzlich sollte das Gewebe aus dem die Stammzellen isoliert werden, gut zugänglich sein und unter minimalem invasivem Einsatz, möglichst unter Lokalanästhesie, gewonnen werden können. Die typischen Stammzellcharakteristika sind ihre Plastikadhärenz, eine uneingeschränkte Potenz in ihrer Selbsterneuerung und die Fähigkeit zur Differenzierung in multiple Zelllinien [129,130].

Mesenchymale Stammzellen, die in der Therapie genutzt werden, stammen zu einem großen Teil aus Knochenmarksaspiraten. Hieraus konnten sie durch ein spezifisches Isolierungsprotokoll und ihre selektive Plastikadhärenz gewonnen werden. Eine Fragestellung dieser Arbeit war es, ob verschiedene Speicheldrüsen ebenfalls als Quelle mesenchymaler Stammzellen dienen können. Zielsetzung war es ein geeignetes Isolierungsprotokoll hierfür zu etablieren. MSC aus dem Knochenmark zeigen nach ein- bis zweiwöchiger Kultivierung ein relativ einheitliches Bild bezüglich ihrer Morphologie und Expression von Oberflächenmarkern. So sind diese Zellen nach *in vitro* Expansion positiv bezüglich der Marker CD73, CD105 (Endoglin) und CD90 (Thy-1), negativ hingegen bezüglich des Zelloberflächenmoleküls CD34, welches auf hämatopoetischen Progenitoren und Endothelzellen exprimiert wird, als auch bezüglich des hämatopoetischen Markers CD45 [127]. Eine weitere Fragestellung dieser Arbeit war es, ob die isolierten Zellen aus den Speicheldrüsen eine einheitliche Morphologie aufweisen oder ob Unterschiede in der Zellmorphologie nachzuweisen sind, je nachdem aus welcher Speicheldrüse sie isoliert wurden. Zusätzlich sollte geklärt werden, inwieweit sie die gleichen Marker wie mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark exprimieren. Zielsetzung hierbei war es, geeignete Marker für die zielsichere Identifizierung von MSC aus Speicheldrüsen zu finden.

Weiterhin sollte das Differenzierungspotential der isolierten Zellen ermittelt werden und wiederum, ob hierbei Herkunftsunterschiede nachzuweisen sind.

Anschließend galt es vergleichbare Zellen aus murinen Speicheldrüsen zu isolieren, diese zu Charakterisieren und ein adäquates Mausmodel für Xerostomie zu entwickeln.

2 Literaturübersicht

2.1 Tumoren im Kopf-Hals-Bereich

2.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

Im Kopf-Hals-Bereich vorkommende Krebserkrankungen liegen in Deutschland mit einer geschätzten Zahl der jährlichen Neuerkrankungen von 13.600 hinsichtlich der Erkrankungshäufigkeit an 7ter Stelle für Männer und an 15ter Stelle für Frauen. Der Anteil dieser Erkrankungen an den durch Krebs bedingten Sterbefällen liegt bei 3,4 %. Das mittlere Manifestationsalter beträgt 60 +/- 15 Jahre, wobei Männer ca. viermal so häufig betroffen sind wie Frauen [1,2]. Etwa 90% dieser Krebserkrankungen sind Plattenepithelkarzinome [3]. Plattenepithelkarzinome sind von Epithelien der Haut und Schleimhaut ausgehende maligne Tumoren und werden im Kopf-Hals-Bereich als HNSCC (head and neck squamous cell carcinoma) bezeichnet. Das Risiko einer Zweitneoplasie bei Plattenepithelösophaguskarzinomen liegt bei 9,3-11,4% [4]. Hauptrisikofaktoren sind Tabak- und Alkoholkonsum, wobei diese Faktoren additiv wirken. Raucher erkranken bis zu sechsmal häufiger an Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches als Nichtraucher und die überproportional vom Malignombefall betroffenen Abschnitte des oberen Aerodigestivtraktes wie Larynx, Mundhöhle, Zunge, Oro- und Hypopharynx unterstreichen das kanzerogene Potential von Alkohol- und Tabakkonsum [5,6,7,8].

Die Entstehung von Tumoren im Kopf-Hals-Bereich, insbesondere des Kehlkopfes, wird außerdem mit der Exposition bestimmter Stoffe, wie Asbest, Arsen, Nickel, Chrom oder polzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe in Zusammenhang gebracht. Für einige Unterarten dieser Krebserkrankungen stehen als Auslöser auch Viren, HPV-16 bei Mundhöhlen- und Larynx-Karzinomen [6,7], und Ernährungsfaktoren zur Diskussion [9]. Ebenso können schlechte Mundhygiene und chronische Traumen der Mundschleimhaut durch Prothesen oder Zähne das Risiko einer Erkrankung erhöhen. Bei positiver Familienanamnese wird ein erhöhtes Risiko von 3,5 angenommen, an HNSCC zu erkranken [6,10].

2.1.2 Einteilung nach Lokalisation, Ausdehnung (TNM-System) und histologischem Differenzierungsgrad (Grading)

Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches werden nach verschiedenen Kriterien eingeteilt. Nach der Lokalisation differenziert man zwischen Tumoren der Mundhöhle (Oropharynx), des Rachens (Naso- und Laryngopharynx), des Kehlkopfes (Larynx) und der Nasenhöhlen (Abbildung 1).

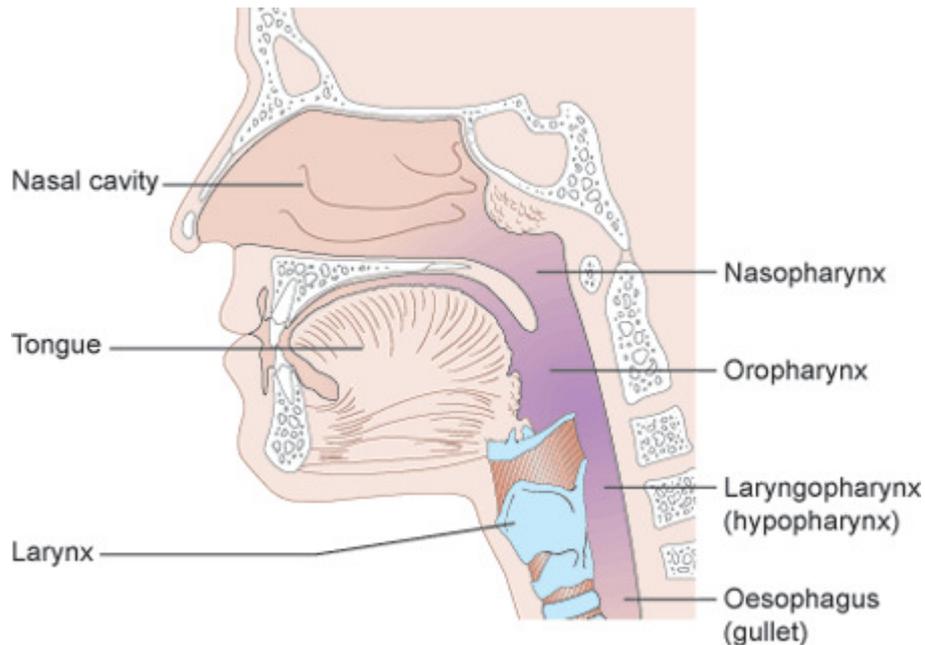


Abbildung 1: Darstellung möglicher Bereiche der Tumorlokalisation im Kopf-Hals-Bereich. Tongue = Zunge, Nasal cavity = Nasenhöhlen.
Quelle: http://www.cancerhelp.org.uk/help/default_printer_friend.asp?page=17354

Des Weiteren treten HNSCC in den Speicheldrüsen (Submandibularis, Parotis und Sublingualis) und als Hautmetastasen auf.

Eine von der UICC (“Union internationale contre le cancer”) vorgeschlagene Stadieneinteilung maligner Tumoren ist die TNM-Klassifikation. Dabei beschreibt T (Tumor) die Ausdehnung des Primärtumors, N (Nodus) das Fehlen bzw. Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen und M (Metastase) der Nachweis von Fernmetastasen. Durch das Zufügen von Zahlen (z. B. T1, T2..., N0, N1..., M0, M1) wird die anatomische Ausdehnung des malignen Prozesses angegeben.

Die prätherapeutische klinische TNM-Klassifikation wird unter Zugrundelegung der Ergebnisse der klinischen, radiologischen, endoskopischen und weiteren relevanten Untersuchungen vorgenommen (Tabelle 1).

| T | Primärtumor |
|----------------|--|
| T0 | keine Evidenz für einen Primärtumor |
| T1, T2, T3, T4 | Evidenz zunehmender Größe des Primärtumors |
| TX | Die Minimalerfordernisse zur Beurteilung des Sitzes oder Ausbreitungsgrades des Primärtumors liegen nicht vor. |

| N | regionäre Lymphknoten |
|------------|---|
| N0 | keine Evidenz für einen Befall regionärer Lymphknoten |
| N1, N2, N3 | Evidenz zunehmenden Befalls regionärer Lymphknoten |

| | |
|----|---|
| N4 | Evidenz des Befalls juxta-regionärer Lymphknoten |
| NX | Die Minimalerfordernisse zur Beurteilung der regionären Lymphknoten liegen nicht vor. |

| | |
|----|--|
| M | Fernmetastasen |
| M0 | keine Evidenz für Fernmetastasen |
| M1 | Evidenz für Fernmetastasen |
| MX | Die Minimalerfordernisse zur Beurteilung des Vorhandenseins von Fernmetastasen liegen nicht vor. |

Tabelle 1: Prätherapeutische klinische Tumor-Klassifikation (TNM)

Die postoperative histopathologische Klassifikation (pTNM-Klassifikation) erfolgt durch die bei einem chirurgischen Eingriff und der histopathologischen Untersuchung gewonnenen Erkenntnisse unter Ergänzung oder Abänderung der prätherapeutischen TNM-Klassifikation (Tabelle 2).

| | |
|----------|---|
| pT | Primärtumor (pT0-pT4, pTX) |
| G | histopathologisches Grading (G1-G3, GX) zur Bestimmung des Malignitätsgrades (G0: hochgradig differenziert, G1: mittelgradig differenziert, G2: geringgradig differenziert) |
| L | Einbruch in das Lymphsystem (L0-L2, Lx) |
| V | Einbruch in die Venen (V0-V2, VX) |
| pN | regionäre Lymphknoten (pN0-pN4, pNX) |
| pM | Fernmetastasen (pM0, pM1, pMX) |
| Präfix y | Dem definierten chirurgischen Eingriff ging eine andere Therapiemethode voraus. |
| Präfix r | Rezidive |

Tabelle 2: Postoperative histopathologische Tumor-Klassifikation (pTNM)

2.1.3 Diagnose, Therapie und Prognose

Besteht der Verdacht auf einen Tumor im Mund-, Kiefer- oder Gesichtsbereich, erfolgt zunächst eine klinische Untersuchung. Dabei wird die verdächtige Stelle palpatorisch untersucht und der Hals nach Lymphknotenmetastasen abgetastet. Bei einer Untersuchung des Kehlkopfes wird eine Kehlkopfspiegelung durchgeführt bzw. bei Verdacht eines Ösophaguskarzinoms eine Endoskopie [4]. Erhärtet sich der Verdacht auf einen Tumor, wird für eine sichere Diagnose eine Gewebeprobe (Biopsie) entnommen, die histologisch untersucht wird.

Die kurative Therapie besteht aus einer multimodalen Behandlung [11], wobei der Tumor vollständig mit 3D-Sicherheitsabstand von 1 cm chirurgisch, durch Neck-dissection (dt. Halspräparation), gemeint ist damit die Radikaloperation mit Ausräumung aller Lymphknoten des Halses bei einer Tumoroperation im Kopf-Hals-Bereich, entfernt wird. Das Ziel ist es Metastasen des Tumors zu entfernen und eine weitere Streuung von Tumorzellen im Körper

zu verhindern [12]. Es folgt eine Radiotherapie, entweder eine perkutane Bestrahlung oder eine interstitielle Kontaktbestrahlung, meist in Verbindung mit einer Chemotherapie. Für die Chemotherapie wird häufig Cisplatin/Carboplatin, MTX, Bleomycin oder 5-FU [13] genutzt, wodurch eine 15-41%ige objektive Remission des Tumors erzielbar ist.

Häufig ist nur eine palliative Therapie möglich, da es durch den chirurgischen Eingriff zu funktionellen Einschränkungen der anatomischen Strukturen kommen würde (z.B. Kehlkopf [11]) oder ein inoperables Tumorrezidiv tritt in einer vorbestrahlten Region auf. Hier wird eine simultane Radiochemotherapie [11,14-16] angewendet, wobei sich die interstitielle Kontaktbestrahlung (interstitielle Brachytherapie) als gut verträgliche und effiziente Bestrahlung erwiesen hat [14,15].

Die Brachytherapie (griech: brachys = nah) ist eine spezielle Form der Strahlentherapie, bei der eine Strahlenquelle innerhalb oder in unmittelbarer Nähe des zu bestrahlenden Volumens im Körper des Patienten platziert wird. Bei der interstitiellen Brachytherapie (interstitiell = dazwischenliegend) wird der Strahler mittels Nadeln, die zuvor in das zu behandelnde Volumen in Körpergewebe gestochen wurden, eingebracht. Der Patient wird hierfür in Voll- oder Teilnarkose und eine sterile Umgebung gebracht. Die verwendeten Strahlenquellen weisen einen Durchmesser von weniger als einem Millimeter auf, wodurch eine genaue Platzierung im Tumorgewebe möglich ist. Die verwendeten Nuklide sind meist Gammastrahler, wie Ir-192 und Co-60, seltener Cs-137 oder Yb-169. Hierbei ist eine HDR (high dose rate) Brachytherapie, mit einer hohen Aktivität der Quelle und einer Anwendungsdauer im Minutenbereich oder eine LDR (low dose rate) Brachytherapie, mit einer geringen Aktivität der Strahlenquelle und einer Anwendungsdauer im Stundenbereich, möglich.

Die Erfolgsrate der heute verfügbaren Behandlungen beträgt 50 %. Trotz signifikanter Fortschritte in der Behandlung tritt in ca. 20-30% der Fälle ein Rezidiv des Tumors an der Primärlokalisierung auf [11,17]. Eine Vielzahl von tumor- und patientenabhängigen Faktoren beeinflusst die Prognose bei HNSCC-Patienten. Unter anderem hängt sie von Lokalisation, Stadium und Differenzierungsgrad des Primärtumors, der Existenz von Metastasen, dem allgemeinen gesundheitlichen Zustand des Patienten und dem Vorhandensein von ausgeschwemmten Tumorzellen im peripheren Blut ab. Obwohl es signifikante Verbesserungen in der Tumorthherapie gegeben hat, haben sich die Überlebensraten in den letzten 20 Jahren kaum verändert [18,19]. Trotz dieser Fortschritte in der Behandlung betrug die 5-Jahres-Überlebensrate in den letzten 30 Jahren weniger als 50%.

2.2 Speicheldrüsen

2.2.1 Aufbau, Funktion

Die großen Mundspeicheldrüsen Glandula parotidea, Glandula submandibularis und Glandula sublingualis sind paarig angelegt. Sie sind ektodermalen Ursprungs und haben im Aufbau gemeinsam, dass sie von einer Bindegewebskapsel umgeben sind, von der Bindegewebssepten ins Organinnere ziehen und ihr Parenchym aus Drüsenendstücken und Ausführungsgängen besteht. Um die Drüsenendstücke und Ausführungsgänge besteht ein dichtes Netz aus Kapillaren und Nervenfasern. Die sekretorische Einheit besteht aus dem Acinus, Myoepithelzellen, den Schaltstücken, den Streifenstücken und dem Ausführungsgang. Die Acini können in drei verschiedene Typen aufgeteilt werden. Erstens die Serösen, Protein sezernierend, aus kugeligen Zellen bestehend und reich an Zymogengranula sind. Zweitens die Mucösen, Mucin sezernierend und eher aus tubulären Zellen bestehend. Drittens die gemischten Endstücke. Hier sitzen die serösen Zellen den mucösen Endstücken kappenförmig auf (von Ebnerscher Halbmond). Die sternförmigen Myoepithelzellen liegen zwischen Basallamina und dem basalen Pol der Drüsenzellen. Sie umfassen die Drüsenendstücke und dienen dem Weitertransport des Speichels von den proximalen in die distalen Teile des Ausführungsgangsystems.

Die Speichelproduktion erfolgt in zwei Phasen:

1. Primäre Sekretion: Sie erfolgt in den Acinuszellen und das Produkt ist in Osmolalität und Zusammensetzung dem Plasma identisch.
2. Ductale Sekretion: Hier ist das Produkt hypoton mit erniedrigtem Natrium- und erhöhtem Kaliumgehalt, im Vergleich zum Plasma.

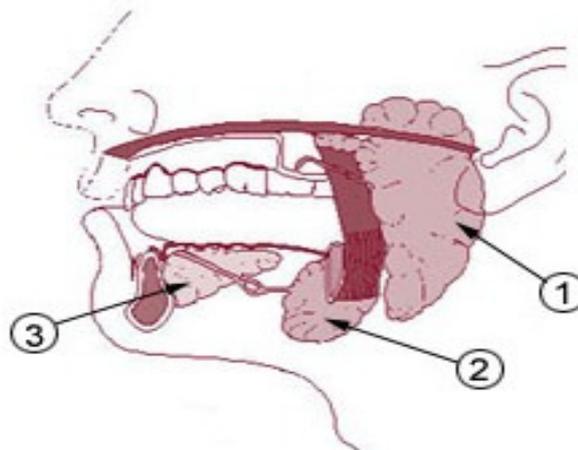


Abbildung 2: Lage der großen Mundspeicheldrüsen

[Quelle: <http://de.wikipedia.org/wiki/Speicheldrüsen>]

- 1) Glandula parotidea
- 2) Glandula submandibularis
- 3) Glandula sublingualis

Innerhalb von 24h werden ca. 1-1,5 Liter Speichel erzeugt. 7-8% werden von den kleinen Speicheldrüsen produziert, wobei der Anteil unabhängig von der Stimulierung ist. Bei Stimulation entfallen 69% der Speichelproduktion auf die Parotis, 26% auf die Submandibularis und 5% auf die Glandula sublingualis. In unstimuliertem Zustand erzeugt die Parotis 26% des Speichels, die Submandibularis 69% und Sublingualis 5% [21, 49].

Im Allgemeinen lässt sich feststellen, dass Speichel zu 99,5% aus Wasser besteht, durch Glykoproteine und Elektrolyte angereichert. Im Vergleich zum Plasma besitzt er eine 7-fach höhere Konzentration an Kalium, 3-fach höher an Bicarbonaten und 1/10-fach niedriger an Natrium. Zusätzlich sind Kalzium, Phosphat, Chlorid, Thiocyanat und Harnstoff nachweisbar. Die Regulierung der Speichelsekretion unterliegt nervalen und hormonellen Einflüssen. Reizung des Parasympathicus führt zur Absonderung eines wässrigen, dünnflüssigen Speichels, mit wenig organischen Anteilen. Bei Sympathicusreizung wird wenig, zähflüssiger Speichel produziert, mit hohem Anteil an organischen und anorganischen Anteilen.

Die Funktion des Speichels lässt sich in acht Gebiete unterteilen:

1. Befeuchtung und Schutz der Mundschleimhaut. Die Muzinschicht auf der Mundschleimhaut gilt als wichtigster nicht immunologischer Schutz der Mundhöhle
2. Befeuchtung von trockenem Essen und Abkühlung heißer Nahrung
3. Medium für gelöste Nahrungsbestandteile, zur Anregung der Geschmacksknospen
4. Pufferung des Mundhöhleninhaltes durch Bikarbonate
5. Verdauung von Kohlenhydraten und Lipase: Spaltung der 1-4 glykosidischen Bindungen der Kohlenhydrate erfolgt durch die Alpha-Amylase, Fette werden durch die linguale Lipase angedaut
6. Kontrolle der bakteriellen Mundflora: Lysozym greift die Bakterienwand an, IgA ist zur immunologischen Abwehr vorhanden
7. Mineralisation von neuen Zähnen und Reparatur prekariöser Enamellumläsionen:, Dies erfolgt durch den hohen Kalzium- und Phosphatanteil im Speichel
8. Formen einer protektiven „Hülle“ um die Zähne: Speichelproteine mit antibakterieller Wirkung legen sich um die Zähne

2.2.1.1 Glandula parotidea

Die Glandula parotidea, auch Parotis genannt, ist die größte der Mundspeicheldrüsen mit einem Gewicht von 14g und einer Ausdehnung von 5,8 cm nach craniocaudal und 3,4 cm nach ventrodorsal. Sie ist eine verzweigte, acinöse Drüse, mit ausschließlich serösen Zellen. Sie zeigt einen hohen Anteil von Fettzellen in den interstitiellen Bindegeweben. Hier befin-

den sich auch Plasmazellen, die das Immunglobulin IgA bilden, welches in den Speichel abgegeben wird und der immunologischen Abwehr von Pathogenen in der Mundhöhle dient.

Als rein seröse Drüse ist die Parotis strahlenempfindlicher als die anderen großen Mundspeicheldrüsen [20], nach Radiatio konnte beobachtet werden, dass zuerst die serösen, dann erst die mucösen Acini zugrunde gehen [50].

2.2.1.2 Glandula submandibularis

Die Glandula submandibularis ist nur halb so groß wie die Parotis, wird im englischen Sprachgebrauch häufig als Glandula submaxillaris bezeichnet und entspricht der Glandula mandibularis anderer Säuger. Es handelt sich hier um eine verzweigte tubulo acinöse Drüse, die seromucös ist, mit ca. 80% serösen Zellen des Drüsenvolumens. Die Anzahl von Schalt- und Streifenstücken ist geringer als in der Parotis. Das Sekret besitzt eine schwache Amylaseaktivität und enthält das Enzym Lysozym, welches in der Lage ist, die Bakterienwand zu hydrolysieren.

Obwohl die Drüse anfälliger auf metabolische und physiologische Veränderungen reagiert, zeigt sie eine geringere Anfälligkeit gegenüber Strahlenschäden [20].

80-90% der Speicheldrüsensteinerkrankungen (Sialolithiasis) kommen in der Submandibularis vor. Bei Obstruktion des Ausführungsganges kommt es zur Atrophie der Drüse, bei partiellem Verschluss bildet sich eine Mucocele oder Ranula (Mucuscyste).

2.2.1.3 Glandula sublingualis

Die Glandula sublingualis hat im Gegensatz zur Parotis und Submandibularis keine wirkliche fasciale Kapsel. Zusätzlich ist nicht nur ein dominanter Ausführungsgang vorhanden, sondern ca. 10 kleinere Gänge. Sie ist eine verzweigte, tubulo-acinöse Drüse. Es überwiegen Endstücke mit ausschließlich mucösen Zellen, ca. 60% des Drüsenvolumens. Die serösen Zellen (30% des Drüsenvolumens) treten fast ausschließlich in von Ebnerschen Halbmonden auf. Schalt- und Streifenstücke fehlen fast vollständig.

2.3 Xerostomie

2.3.1 Definition

Xerostomie ist Mundtrockenheit, verbunden mit einem chronischen Durstgefühl. Der physiologische Speichelfluss beträgt im Ruhezustand 0,3-0,4 Milliliter/Minute und bei Stimulation

ca. 2,0 Milliliter/Minute. Bei Xerostomie liegen Werte unter 0,2 bzw. 0,5 Milliliter/Minute vor. Hierbei ist aber nicht nur das Speichelvolumen beeinträchtigt, sondern auch die Speichelzusammensetzung entspricht nicht mehr den physiologischen Werten.

2.3.2 Ursachen

Die Ursachen von Xerostomie sind zahlreich. Allergien können als Auslöser dienen, Medikamente beeinträchtigen die Speichelproduktion, hierbei sind insbesondere die Psychopharmaka zu erwähnen, wie z.B. Antidepressiva. Speicheldrüsenentzündungen (Sialadenitis) kommen ebenfalls als Ursache in Frage.

| DRUGS ASSOCIATED WITH XEROSTOMIA.* | | |
|---|--|--|
| CATEGORY | GENERIC NAME | TRADE NAME† |
| Anticholinergic Agents | atropine belladonna benztropine oxybutynin scopolamine trihexyphenidyl | Atrohist, Lomotil Donnatal, Respa-A.R.M. Cogentin Ditropan Transderm Scop Artane |
| Antidepressant and Antipsychotic Agents Selective serotonin-reuptake inhibitors Tricyclic antidepressant Heterocyclic antidepressants Monoamine oxidase inhibitors Atypical antidepressants | citalopram fluoxetine paroxetine sertraline venlafaxine amitriptyline desipramine imipramine haloperidol mirtazapine pimozide phenelzine bupropion nefazodone olanzapine | Celexa Prozac Paxil Zoloft Effexor (generic) Norpramin Tofranil Haldol Remeron Orap Nardil Wellbutrin, Zyban Serzone Zyprexa |
| Diuretic Agents | chlorothiazide furosemide hydrochlorothiazide triamterene | Diuril Lasix HydroDiuril, Dyazide Dyrenium |
| Antihypertensive Agents | captopril clonidine clonidine/chlorthalidone enalapril guanfacine lisinopril methyldopa | Capoten Catapres Combipres Vasotec Tenex Zestril Aldomet |
| Sedative and Anxiolytic Agents | alprazolam diazepam flurazepam temazepam triazolam | Xanax Valium Dalmane Restoril Halcion |

| | | |
|---|---|--|
| Muscle Relaxant Agents | cyclobenzaprine orphenadrine tizanidine | Flexeril Norflex Zanaflex |
| Analgesic Agents Central nervous system/opioids | codeine meperidine methadone pentazocine propoxyphene tramadol | (generic) Demerol Dolophine Talwin Darvon Ultram |
| Nonsteroidal anti-inflammatory agents | diflunisal ibuprofen naproxen piroxicam | Dolobid Advil, Motrin Aleve, Naprosyn Feldene |
| Antihistamines | astemizole brompheniramine chlorpheniramine diphenhydramine loratadine meclizine | Hismanal Dimetane-DX Chlor-Trimeton Benadryl, Dramamine Claritin Antivert |

Tabelle 3: Entnommen Guggenheimer et al. 2003, die Tabelle zeigt gängige Medikamente, die vor allem bei älteren Menschen eine Xerostomie auslösen können.

Einen besonderen Stellenwert nimmt die radiogene Xerostomie nach Strahlentherapie maligner Kopf-Hals-Tumoren ein. Aufgrund der hohen Zahl betroffener Patienten und der primär schlechten Prognose wird die Lebensqualität dieser Patienten nicht nur durch die Xerostomie beeinträchtigt [21,22], sondern auch durch chirurgische Resektionen mit Deformitäten und Behinderungen des Schluck-, Sprechaktes und der Atmung. Zusätzlich treten im Rahmen der Bestrahlung des oberen Aerodigestivtraktes weitere Nebenwirkungen wie Knorpel- und Knochennekrosen, Mukositis und Gewebefibrosierung [21] auf. Eine weitere Ursache für Xerostomie stellt die Gruppe der Autoimmunerkrankungen dar. Beispielsweise sind etwa 4 Mio. Patienten in den USA an einem M. Sjögren erkrankt [23]. Bei dieser Erkrankung wendet sich das Immunsystem gegen die exokrinen Drüsen, wobei zwei Formen der Erkrankung unterschieden werden können. Die primäre Form stellt ein eigenes Krankheitsbild dar, indem es zur Mundtrockenheit (Xerostomie), Austrocknung des Auges (Xerophthalmie) und zu Durchblutungsstörungen in Fingern und Zehen (Raynaud-Syndrom) kommt. Die sekundäre Form tritt in Verbindung mit anderen entzündlichen Prozessen auf, wie z.B. einer rheumatoiden Arthritis oder dem systemischen Lupus erythematodes [24, 25]. Kennzeichnend für Autoimmunerkrankungen oder Xerostomie durch Radiatio, ist der Parenchymuntergang. Sowohl das Volumen der Speicheldrüsen, als auch die funktionsfähigen Acini sind reduziert [50], was eine signifikante Reduktion der Speichelproduktion zur Folge hat.

2.3.3 Folgen

Unabhängig welche Ursache die Xerostomie hat, sie beeinträchtigt nachhaltig die Lebensqualität des Patienten [21,22]. Neben einem permanenten Durstgefühl, kommt es zu Dyspha-

gie, Beeinträchtigung der Sprachfähigkeit, einem reduziertem Geschmackempfinden und einer Aversion gegen scharfe und trockene Nahrung [51, 52, 53]. Die Probleme in der Nahrungsaufnahme haben meist den Nebeneffekt des Gewichtsverlustes. Zusätzlich kommt es zur Mukositis und Ulcerationen der Mundschleimhaut. Da Xerostomie häufig bei Patienten über 65 Jahren verbreitet ist (ca. 30% der über 65 Jährigen in den USA [52]), ergibt sich durch den oralen Diskomfort ein Problem im Tragen von Zahnersatz. Durch die fehlende Immunabwehr kommt es zu Veränderungen der oralen mikrobiellen Flora und somit zu bakteriellen Infekten und Pilzbesiedlungen [30], häufig durch den opportunistischen Keim *Candida albicans*. Neben einer Akkumulation von Plaque, ist Karies, durch Demineralisation, bei Xerostomiepatienten weit verbreitet.

2.3.4 Therapie

Um die Schleimhautreizung möglichst gering zu halten, wird Xerostomiepatienten vom Genuss von Alkohol und Tabak abgeraten. Ebenso wird eine zuckerarme Ernährung angestrebt und eine Flouridsubstitution angeraten, um Karies einzudämmen [52]

Zur Therapie der strahleninduzierten Xerostomie stehen verschiedene pharmakologische Substanzen und prophylaktische Maßnahmen zur Verfügung. Die Therapie des M. Sjögren, neben der systemischen Therapie der Autoimmunerkrankung mit Immunsuppressiva und der im Alter häufigen Hyposalivation, ist symptomatisch. Allerdings haben alle derzeit bekannten Therapieformen entweder erhebliche Nebenwirkungen oder sind nur wenig effektiv. Während Amifostin zur Prävention der strahleninduzierten Xerostomie [26, 27, 28, 29] vielversprechende Effekte auf die akuten und chronischen Bestrahlungsnebenwirkungen zeigt, hat es gleichzeitig ein erhebliches Nebenwirkungsspektrum. Zusätzlich konnte noch nicht ausgeschlossen werden, dass die protektive Wirkung auf Gewebe, nicht auch für die onkogenen Zellen gilt [31]. Das Wirkprinzip von Amifostin ist geklärt. Nachdem es in den Blutstrom gelangt ist, wird es durch die Alkalische Phosphatase des Endotheliums hydrolysiert. Somit erhält es seine aktive Form und kann als potenter Radikalfänger in die Zellen und Zellkerne eindringen, um die DNA vor Strahlenschäden zu schützen,. Allerdings wird immer noch diskutiert, ob das Fehlen der Alkalischen Phosphatase im Tumorepithel und dessen saures Mikromilieu ausreichend sind, um den Tumor nicht zu schützen [21]. Auch die symptomatische Therapie mit Pilocarpin oder künstlichem Speichel bietet keine zufriedenstellende Therapieoption für die betroffenen Patienten, da die Wirkung nur eingeschränkt nachgewiesen wurde und über Ansprechraten von etwa 50% berichtet wird [32]. Hinzu kommt eine limitierte Anwendung von Pilocarpin durch systemische anticholinerge Nebenwirkungen und

Kontraindikation bei einigen Erkrankungen (Glaukom, Herz-Kreislaufkrankungen, Asthma, obstruktive Lungenerkrankungen u.a.). Die intensitätsmodulierte Strahlentherapie ist eine vielversprechende Option, die postradiogene Xerostomie zu reduzieren [33]. Jedoch ist sie für eine Vielzahl der Patienten nicht anwendbar oder steht an den entsprechenden Zentren noch nicht zur Verfügung. Die ebenfalls in der Literatur beschriebene, prophylaktische Verlagerung einer Glandula submandibularis aus dem Strahlenfeld (Seikaly-Jha-Operation; [31, 34, 35, 36]) in die Submentalregion hat sich in Europa bisher nicht zu einer etablierten Therapieform entwickeln können. Ihre Anwendung wird zusätzlich durch die Lokalisation des Primärtumors und bestehende Halslymphknotenmetastasen limitiert.

Allerdings gibt es vielversprechende experimentelle Therapieansätze. In diesem Zusammenhang wäre die regenerative Medizin zu erwähnen. Ziel der regenerativen Medizin ist die Wiederherstellung von defekten Organfunktionen auf der Basis von Tissue-Engineering-Verfahren oder der therapeutischen Verwendung von Stammzellen. Das Tissue-Engineering ist ein interdisziplinäres Arbeitsgebiet, das biologische mit ingenieurwissenschaftlichen und medizinischen Techniken verbindet, um Gewebe und Organe *in vitro* herzustellen. Die Erhaltung und Vermehrung funktionsfähigen, d. h. speichelproduzierenden Gewebes *in vitro*, ist die Grundvoraussetzung für dessen therapeutischen Einsatz. Die ersten Versuche mit statischen Gewebekulturen der menschlichen Glandula submandibularis zeigten ein Ansteigen autolytischer Prozesse nach 48 h *in vitro* [37, 38]. Die Ausdehnung der Kulturdauer auf 2–3 Wochen unter Erhalt eines differenzierten Submandibularisgewebes konnte durch die Verwendung von Fibronectin, Laminin und Kollagen Typ I und IV als Matrixkomponenten, und dem Zusatz verschiedener Wachstumsfaktoren wie z. B. EGF und FGF erreicht werden [39, 40]. In Gewebekulturen humanen Submandibularis- und Parotisgewebes stellten Dardick et al. (1993) fest, dass prinzipiell alle Zelltypen der Speicheldrüsen (Azinuszellen, Gangepithelien und Myoepithelien) über einen Zeitraum von 28 Tagen gezüchtet und durch Zusatz des β -Sympathomimetikums Isoprotenerol (IPR) vermehrt werden können [41]. Als zusätzliche Effekte der IPR-Stimulation ließ sich ein gehäuftes Auftreten von Plattenepithelmetaplasien der kultivierten Speicheldrüsenzellen [41] und eine Stimulation der Amylasesekretion *in vitro* [42] nachweisen. Die Vermehrung humanen Speicheldrüsenorgans in *in vitro* ist dennoch als sehr schwierig einzustufen [43]. Womit fraglich ist, ob in der Zell- oder Gewebekultur überhaupt ausreichende Mengen funktionsfähiger Speicheldrüsenzellen zur Besiedlung von Trägermaterialien erzielt werden können. Erstmalig wurden 1998 Tissue-Engineering-Konzepte für Speicheldrüsen unabhängig voneinander durch zwei verschiedene Arbeitsgruppen vorgestellt. Unter der Vorstellung, autologe Speicheldrüsenorganoide für eine minima-

linvasive Applikation herzustellen, z. B. für die Injektion in die Mundschleimhaut bestrahlter Patienten, wurden Microcarrier mit enzymatisch vereinzelt humanen Parotiszellen besiedelt [44]. Auf den verwendeten Microcarrier-Typen behielten die Parotiszellen ihre gewebe-spezifischen Differenzierungsmerkmale bis zu 3 Wochen *in vitro* bei. In allen adhären-ten Zellen ließ sich Zytokeratin als Zeichen für die epitheliale Differenzierung nachweisen. Hohe Konzentrationen des Tissue-Polypeptide-Antigens im Mediumüberstand, bei Speicheldrüsen ein spezifischer Marker für Gangepithelien, ließ auf die erhaltene Differenzierung dieser Zellpopulation schließen. Abfallende Amylase-Werte im Medium deuteten jedoch auf die fortschreitende Abnahme der sekretorischen Funktionen der Azinuszellen *in vitro* hin. Dar-aus folgt, dass dieses Konzept der Herstellung von Speicheldrüsenorganoiden nur dann für therapeutische Zwecke nutzbar sein wird, wenn es gelingt, ihre Funktion *in vitro* langfristig zu erhalten [45]. Die Implantation eines mit Speicheldrüsenzellen besiedelten Kollagen-schwammes im Tiermodell führte zu vergleichbaren Ergebnissen: Der Nachweis der Amyla-seproduktion gelang bis zu 3 Wochen nach der Implantation [46]. Diese Ergebnisse zeigen, dass zurzeit sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nur für eine relativ kurze Zeit vitales und funkti-onsfähiges Speicheldrüsen-gewebe erhalten werden kann. Eine klinische Anwendung er-scheint daher solange unmöglich, bis diese Probleme überwunden werden können. Als Alter-native zu patienteneigenen Speicheldrüsenzellen wurde die Verwendung einer allogenen immortalisierten Submandibularis-Zelllinie (HSG) vorgeschlagen [30]. Verschiedene Poly-mere (PLA, PGA) konnten *in vitro* mit HSG-Zellen besiedelt werden [47]. Als mögliche Trägerstruktur für eine klinische Anwendung ist eine blind endende Röhre aus einem porö-sen, langsam degradierenden Biomaterial vorgesehen. Problematisch ist jedoch das nahezu unbegrenzte Wachstumspotenzial der HSG-Zellen, die aus einer Tumorzelllinie entwickelt wurden [48]. Durch das nicht abschätzbare onkogene Potential dieser Zellen ist deren klini-sche Verwendung kontraindiziert.

Insgesamt sind noch viele Probleme zu bewältigen, bis das Tissue-Engineering eine befriedi-gende Therapieform für die Xerostomie bietet, zumal noch kein Trägermaterial (scaffold) für die Speicheldrüsenregeneration zur Verfügung steht, das keine massiven entzündlichen Re-aktionen hervorruft (Rotter et al. unveröffentlichte Daten).

Der zweite therapeutische Ansatz der regenerativen Medizin ist die Nutzung von Stammzel-len, die direkt lokal in das geschädigte Gewebe oder systemisch injiziert werden können. In beiden Fällen sind undifferenzierte oder vordifferenzierte Zellen nutzbar. Ebenso ist eine vorherige virale Transfektion der Zellen möglich, wozu bereits mehrere Methoden untersucht wurden effizient exogene DNA in MSCs zu integrieren. Insbesondere mit adenoviralen Vek-

toren gelang es stabile Zellklone mit geringer Zellmortalität zu generieren und erste Therapieerfolge, mit einer dominant negativen Mutante des Kollagen I bei der Osteogenesis imperfecta [54], damit zu erzielen.

Grundlegende Arbeiten zu gentherapeutischen Regenerationsstrategien von bestrahltem Speicheldrüsengewebe wurden von der Arbeitsgruppe Baum et al. durchgeführt [94,95,96,97]: So konstruierten sie einen adenoviralen Vektor, um bestrahlte GII. submandibulares von Ratten mit Aquaporin (AQP1) nach intraduktaler Applikation zu transduzieren. Das AQP1-Gen, das einen erhöhten Wasserfluss induziert [98,99], führte zu einer kompletten Normalisierung der Speichelproduktion auf dem Niveau gesunder, d. h. nichtbestrahlter Ratten im Gegensatz zu der um 65% reduzierten Speicheldrüsenproduktion in der Gruppe der mit einem Kontrollvektor therapierten Tiere. Die Funktion der durch die Bestrahlung untergegangenen Azinuszellen wurde hier durch die strahlenresistenteren, transfizierten duktaalen Zellen übernommen. Die Transduktionseffizienz unter Verwendung dieses Vektors lag bei 15–30% der epithelialen Speicheldrüsenzellen.

Die Nutzung nicht transfizierter Zellen zur Speicheldrüsenregeneration konnte noch nicht gezeigt werden, aber die Grundlagen dafür sind vorhanden. So konnten Denny et al. 1999 und Man et al. 2001 die Existenz von Stammzellen in der Glandula submandibularis von Maus und Ratte nachweisen [92,93]. Lombaert et al. 2008 zeigten als erste, dass die Isolierung und Kultivierung von Stammzellen aus der Glandula submandubularis der Maus möglich ist und die Re-Transplantation der kultivierten Sialospheren eine Milderung der Strahlenschäden bewirkt [91]. Bereits 2006 konnten Lombaert et al. zeigen, dass die Mobilisation von Stammzellen aus dem Knochenmark mit Hilfe von G-CSF eine Möglichkeit darstellt, die Morphologie und Funktion bestrahlter Speicheldrüsen zumindest teilweise zu regenerieren [90]. Allerdings scheint der Haupteffekt weder auf einem direkten Effekt des G-CSF zu beruhen noch auf einer Transdifferenzierung der Knochenmarkstammzellen in Azinuszellen, da transdifferenzierte Zellen nur vereinzelt nachgewiesen werden konnten. Vielmehr scheint die verbesserte Gewebemorphologie auf zytokinmedierten Interaktionen mit den gewebespezifischen Stammzellen zu beruhen. Der genaue Mechanismus konnte bislang jedoch noch nicht aufgeklärt werden.

2.4 Stammzellen

2.4.1 Stammzellen im Überblick

Der menschliche Körper enthält mehr als 200 unterscheidbare Zelltypen. Der Stammbaum aller Zellen beginnt mit der Zygote, der befruchteten Eizelle, aus der während der Blastogenese die Keimblase (Blasozyste) entsteht. Aus ihrer inneren Zellmasse (ICM), die auch Embryoblast genannt wird, werden die embryonalen Stammzellen gewonnen. Während der anschließenden Gastrulation entstehen die drei Keimblätter, das äußere Keimblatt (Ektoblast, Ektoderm, Epiblast), das innere Keimblatt (Endoblast, Entoderm, Hypoblast) und das mittlere Keimblatt (Mesoderm, Mesoblast). Aus den undifferenzierten Vorläuferzellen der Keimblätter gehen während der Embryonalentwicklung zunehmend spezialisierte Zelltypen hervor. Aus dem Ektoblasten entstehen u.a. die Epidermis mit Hautanhangsorganen, der Zahnschmelz, das Nervensystem, das Nebennierenmark und ein Teil der Sinnesorgane. Der Entoblast bildet große Teile des Epithels, die Lunge, Pankreas und Leber, während der Mesoblast die aus dem Mesenchym hervorgehenden Binde- und Stützgewebe, den Kreislaufapparat, die Muskulatur, den Harn- und Geschlechtsapparat und die Nebennierenrinde bildet. Am Ende des Stammbaums stehen dann die terminal differenzierten und spezialisierten Zellen des adulten Individuums. Als Stammzellen werden im Allgemeinen die Zellen eines Organismus bezeichnet, die die Fähigkeit besitzen, durch Zellteilung zwei verschiedene Typen von Nachkommen zu erzeugen. Der eine Typus eines Nachkommens ist eine Tochterzelle, welcher das identische Abbild der Mutterzelle darstellt, die Tochterzelle besitzt exakt die gleichen Eigenschaften. Diese Tochterzellen entstehen durch symmetrische Zellteilung und der Vorgang wird als Selbsterneuerung (selfrenewal) bezeichnet. Der zweite Typus eines Nachkommens, der bei der asymmetrischen Teilung einer Stammzelle entsteht, ist eine Tochterzelle, deren Eigenschaften mit denjenigen der Mutterzelle nicht mehr identisch sind. In der Regel ist diese Tochterzelle eine reifere, ausdifferenzierte Zelle, mit geringerer Selbsterneuerungspotenz, deren Eigenschaften sie zu spezifischen Aufgaben im Organismus befähigt, zu welchen die Mutterzelle nicht befähigt war. Dieser Vorgang wird als Differenzierung bezeichnet. Welche Art von Nachkommen entsteht, ist von den Signalen der Mikroumgebung der Stammzelle abhängig [61,62] und dem noch ungeklärten Mechanismus der asymmetrischen Zellteilung. Die Fähigkeit der Selbsterneuerung und der Differenzierung sind somit die beiden Kriterien, welche alle Stammzellen verbindet. Eine weitere Unterteilung der Stammzellen kann durch die Klassifizierung des Differenzierungspotentials erfolgen [63]. So werden Stammzellen, welche die Fähigkeit besitzen eine Nachkommenschaft zu erzeugen, welche alle embryonalen und extraembryonalen Zelltypen einschließt, als totipotent (lat.: zu

allem fähig) bezeichnet. Hierzu sind lediglich die Zellen befähigt, die bei den ersten Zellteilungen der befruchteten Eizelle entstehen (Morula). Sie bilden die Blastozyste, die aus dem Trophoblast (einschichtige Wand der Keimblase, extraembryonale Struktur), und dem Embryoblast (späterer Embryo, innere Zellmasse), besteht. Die Zellen des Embryoblast gelten als pluripotent (lat.: zu vielem fähig), da sie in alle Zellen der drei Keimblätter differenzieren können, aber nicht mehr befähigt sind extraembryonale Strukturen zu bilden. Pluripotente murine Zellen wurden erstmals durch *in vitro* Kultivierung von Zellen der inneren Zellmasse der Blastozyste gewonnen, jedoch ist es bisher noch unklar, ob alle Zellen der inneren Zellmasse pluripotent sind oder nur einzelne Zellen innerhalb der inneren Zellmasse [64,65]. Bisher konnten pluripotente Zellen zweifelsfrei nur aus embryonalem Gewebe isoliert werden. Stammzellen aus adultem Gewebe sind in der Regel multipotent (lat.: zu mehreren fähig). Sie sind in der Lage sich in nah verwandte Zellen zu differenzieren. Unipotente Stammzellen oder Progenitorzellen sind nur dazu befähigt, einen ausgereiften Zelltyp hervorzubringen. Sie unterscheiden sich lediglich durch ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung von Nicht-Stammzellen.

2.4.2 Embryonale Stammzellen

Embryonale Stammzellen werden als pluripotent bezeichnet und bilden im Embryo die Vorläufer sämtlicher Körperzellen, nicht jedoch die embryonalen Anteile der Plazenta. Sie können auf dreierlei Weise gewonnen werden:

1. die Gewinnung von Zellen des Embryoblasten, welche im Rahmen einer *in vitro* Fertilisation anfällt [66]
2. die Gewinnung primordialer Keimzellen (Vorläufer von Ei- und Samenzellen) aus frühzeitig abgegangenen oder abgetriebenen Föten [67]
3. der Zellkern einer Eizelle wird durch Kerntransfer gegen den Kern einer somatischen Zelle ausgetauscht, und man bringt die Eizelle mittels eines elektrischen Impulses dazu, sich zu teilen; aus der entstehenden Blastozyste können die Zellen des Embryoblasten gewonnen werden [68,69]

Frühe undifferenzierte Zellen stehen somit nur in sehr geringer Zahl zur Verfügung, weshalb schon früh versucht wurde, undifferenzierte Zellen in Form von Teratokarzinomzellen zu kultivieren [70]. Die älteste Methode zur Isolierung embryonaler Stammzellen bestand in der Etablierung von embryonalen Karzinomzellen (ECC, EC Zellen). Um die Embryoblastzellen zu vermehren, wurden sie in Mäuse extrauterin transplantiert. Die entstandenen Teratokarzinomzellen konnten dann in genügender Zahl isoliert werden. Der Nachteil dieser Methode

ist, dass durch den Transfer der Embryoblastzellen die Pluripotenz der ECC geringer ist. Sie sind meist nicht mehr in der Lage, in alle Zelltypen zu differenzieren. Diese Methode wurde vor allem in den 70er Jahren angewendet. Anfang der 80er Jahre wurden dann permanente Linien undifferenzierter embryonaler Stammzellen (ESC) etabliert. Diese Zellen stammen aus der ICM von Blastozysten, von einzelnen Blastomeren der Morula oder von einzelnen Blastomeren des 8-Zell Stadiums. Aufgrund der hohen Telomeraseaktivität embryonaler Stammzellen besteht das Problem, dass in vivo und in vitro eine unkontrollierte Differenzierung einsetzt. Durch bestimmte Kultivierungsbedingungen kann die Differenzierung blockiert und die Pluripotenz der Zellen aufrecht erhalten werden. Dazu gehören: Kultivierung auf feederlayer embryonaler Maus-Fibroblasten [64,69], Kultivierung in konditionierten Medien [71,72] und Kultivierung mit dem Hemmfaktor DIA/LIF [73,74]. Bei Implantation von ES-Zellen besteht das Problem, dass durch die spontane Differenzierung Teratome oder maligne Teratokarzinome, welche aus Zelltypen aller drei Keimblätter bestehen können, entstehen [75,76].

2.4.3 Adulte Stammzellen

Im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen ist die Gewinnung und Erforschung adulter Stammzellen nach gängiger Meinung ethisch unbedenklich, da sie aus dem adulten Individuum gewonnen werden können. Im Falle einer Reimplantation bieten sie die Vorteile einer fehlenden Immunogenität, da es sich um autologe Zellen handelt, und die geringe Neigung zur malignen Entartung. Nachteilig ist die im Gegensatz zu den embryonalen Stammzellen verminderte Telomeraseaktivität, die dazu führt, dass die adulten Stammzellen nur begrenzt expandierbar sind. Für viele Gewebetypen (Darmkrypten des Verdauungstraktes, in der Epidermis der Haut, in der Leber, im Herzmuskel oder im Nervensystem [80-83]) sind spezifische Vorläuferzellen bekannt, die sich in ihrer jeweiligen Nische befinden [77,78], bis ihre Mikroumgebung signalisiert, dass ein Bedarf an spezifisch differenzierten Zellen erforderlich ist, woraufhin die Zellteilung einsetzt [79].

In den letzten Jahren ist die Anzahl an Studien, in denen die Plastizität von adulten Stammzellen postuliert und belegt wurde, stark angestiegen [84,85]. Diese Beobachtungen haben die Hoffnung geweckt, dass adulte Stammzellen hinsichtlich therapeutischer Anwendungen ein deutlich größeres Potential besitzen als bisher angenommen. Die Ursache der ausgeprägten Plastizität sowie die Mechanismen der Transdifferenzierung, also der Differenzierung in Zellen eines embryologischen Keimblatts, aus dem sie sich selbst nicht ableiten, sind weitgehend unbekannt. Einige Publikationen zur Plastizität adulter Stammzellen lösten kontroverse

Diskussionen aus und werden heute in Frage gestellt. Die Transplantation inhomogener Zellpopulationen führte z.B. dazu, dass kontaminierende hämatopoetische Stammzellen im Muskelgewebe für eine vermeintliche Transdifferenzierung von Muskelzellen zu Blutzellen verantwortlich waren [86]. Aktuelle Studien belegen weiterhin, dass Stammzellen mit somatischen Zellen fusionieren [87,88]. Die fusionierten Zellen besitzen sowohl Donormarker der transplantierten Stammzellen als auch Differenzierungsmarker der besiedelten Gewebe, was fälschlicherweise als Transdifferenzierung aufgefasst wurde. So konnte gezeigt werden, dass Hitzeschock behandelte humane Epithelzellen der Lunge und mesenchymale Stammzellen im Co-Kultur-System mit einer hohen Frequenz fusionieren [89].

Als Beispiel für adulte Stammzellen werden im Folgenden die hämatopoetischen und die mesenchymalen Stammzellen beschrieben.

2.4.3.1 Hämatopoetische Stammzellen

Hämatopoetische (Blut bildende) Stammzellen sind die am längsten untersuchten Stammzellen. Blutzellen haben nur eine kurze Lebensdauer und müssen während des gesamten Lebens nachgebildet werden. Die Hämatopoese im adulten Menschen findet in Milz, Thymus und Knochenmark statt, wobei in den ersten beiden Organen die Ausreifung der Lymphozyten stattfindet, während die hämatopoetischen Stammzellen unter normalen Bedingungen beim Erwachsenen im Knochenmark anzutreffen sind. Alle im adulten Säugetierorganismus zirkulierenden Blutzellen haben ihren Ursprung in einer Population von multipotenten Stammzellen. Das klassische Modell der Hämatopoese geht von einem hierarchischen System aus, an dessen Spitze multipotente hämatopoetische Stammzellen stehen [100-103]. Die sich stetig erneuernden hämatopoetischen Stammzellen bringen myeloide und lymphoide Stammzellen hervor, welche über mehrere Zwischenstufen alle ausgereiften Zellen des hämatopoetischen Systems erzeugen (Abb.3).

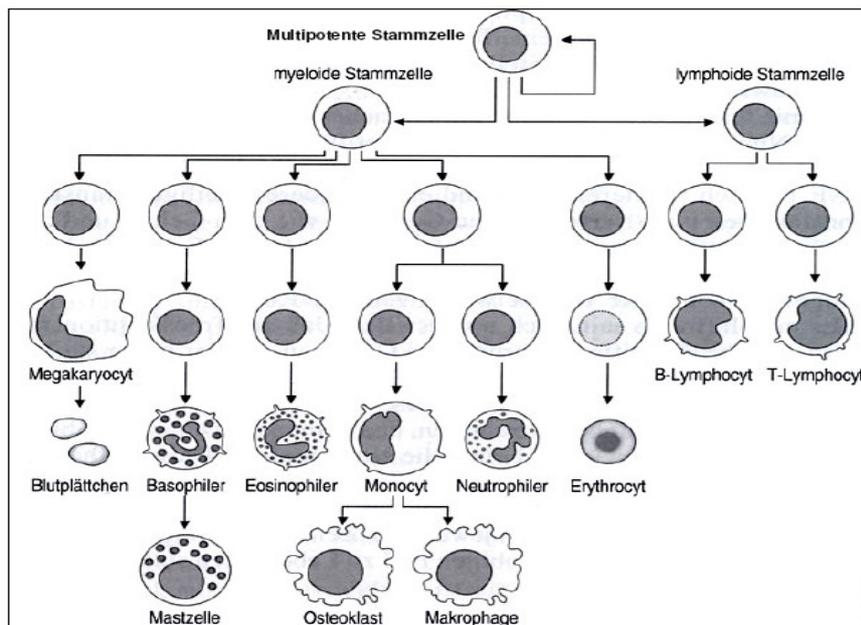


Abbildung 3: Hierarchisches System der Hämatopoese.

Aus multipotenten hämatopoetischen Stammzellen, welche sich ständig selbst erneuern, gehen myeloide und lymphoide Stammzellen hervor, aus welchen sich über Differenzierungszwischenstufen die acht verschiedenen Blutzelltypen bilden. [Quelle: Entwicklungsbiologie. Wolpert, Lewis. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag; 1999]

Man versteht die Mechanismen der Hämatopoese heute sehr gut, wodurch eine therapeutische Nutzung von hämatopoetischen Stammzellen möglich ist. Die Blutzellbildung wird durch Zytokine und Wachstumsfaktoren reguliert, diese Erkenntnis macht man sich in der Knochenmarksspende zunutze. Die klassische Knochenmarksspende (Knochenmarksbiopsie aus dem Beckenkamm) wurde weitgehend von der peripheren Blutstammzellspende abgelöst. Dabei wird dem Spender eine Woche lang das Hormon G-CSF (Granulozyten-Koloniestimulierender Faktor) gespritzt, welches bewirkt, dass hämatopoetische Stammzellen aus dem Knochenmark in das periphere Blut übergehen. Dort können sie dann mittels Stammzellapherese herausgefiltert werden. Die Stammzellen werden dann dem Patienten injiziert, wo sie durch den Homing-Mechanismus wieder in das Knochenmark einwandern [104]. Die Existenz hämatopoetischer Stammzellen wurde bereits in den 1950er Jahren durch Studien an letal bestrahlten Mäusen experimentell nachgewiesen [105,106]. Das erste Modellsystem hämatopoetischer Stammzellen war die CFU-S, colony-forming-unit-spleen, welche eine hohe Proliferationsrate und die Fähigkeit aufwies, in Erythrozyten, Granulozyten und Megakaryozyten zu differenzieren [107,108].

Die Phänotypisierung hämatopoetischer Stammzellen erfolgt durch ihre Morphologie, sie zeigen einen lymphozytären Charakter durch ihre kleine runde Form, mit rundem Zellkern, der von wenig Zytoplasma umgeben ist, das Fehlen eines spezifischen Linienmarkers (lin-)

und anhand einiger typischer Oberflächenmarker [109,110]. Im Gegensatz zu ausgereiften hämatopoetischen Zellen, exprimieren hämatopoetische Stammzellen keine Linienmarker, wie CD13 und CD33 für myeloide Zellen, CD71 für erythropoetische Zellen oder CD61 für megakariozytäre Zellen. Auf ihnen findet man die Epitope CD34, Sca-1, CD117 (c-kit) und CD133. Die Entdeckung von CD34 war das Ergebnis der Entwicklung eines Antikörpers, welcher eine Subfraktion von Knochenmarkzellen erkennen sollte, die ausgereifte Blutzellen ausschloss [111,112]. Das Oberflächenmolekül wird auf hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen sowie kapillaren Endothelzellen exprimiert. Durch alternatives "Splicing" können zwei Formen des CD34-Proteins entstehen, wobei die komplette extrazelluläre Region dabei in beiden CD34-Formen vorhanden ist. CD34 spielt eine Rolle in der Zell-Zell-Adhäsion und in der Leukozyten-Migration. Außerdem wird eine Beteiligung von CD34 an der Inhibition der hämatopoetischen Differenzierung diskutiert. Möglicherweise vermittelt es außerdem die Bindung von Stammzellen an die extrazelluläre Matrix des Knochenmarks oder direkt an Stromazellen; die spezifische Funktion des CD34-Moleküls ist zurzeit noch nicht vollständig aufgeklärt [113-119], aber CD34 wurde sehr schnell der entscheidende Marker als Basis für die Bestimmung der Anzahl, der Isolation und Manipulation von Stammzellen in hämatopoetischem Material. CD117 oder c-Kit (von „Kitten“, da zuerst im Katzensarkom-Virus nachgewiesen) oder SCFR (stem cell factor receptor) ist eine Rezeptor-Tyrosinkinase des Typs III und hat als Liganden SCF (stem cell factor). Sie bilden ein Dimer und aktivieren die Signalkaskade über second messenger. Diese Signalkaskade spielt eine Rolle beim Überleben der Zelle, Differenzierung und Proliferation. CD117 ist auf zahlreichen Zellen nachweisbar, einschließlich hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen, Mastzellen, Melanozyten, Keimzellen, Endothelzellen, Epithelzellen und den intestinalen Cajal-Zellen, allerdings ist CD117 als Protooncogen auch in vielen Tumoren anzutreffen. Der Anteil der CD117-positiven hämatopoetischen Zellen im Blut hängt vom Alter des Spenders ab [120,121]. Das CD133-Antigen, auch als Prominin 1 oder AC133 bezeichnet, wird auf unreifen Zellpopulationen, wie CD34-positiven hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen, neuralen sowie endothelialen Stammzellen und sich entwickelnden Epithel im Embryo exprimiert. Bisher konnten keine natürlichen Liganden für CD133 nachgewiesen werden und auch seine Funktion ist bislang unbekannt. Allerdings ist CD133 in Kombination mit CD34 ein idealer Marker für die Isolierung früher HSC und er scheint ein universeller Marker für organspezifische Stammzellen und tumorinitiierender Zellen zu sein [122,123].

Zusätzlich konnte eine Differenzierung von MSC *in vivo* in Neurone und Gliazellen nachgewiesen werden [134-136]. Obwohl hämatopoetische und mesenchymale Stammzellen die zwei Hauptzelltypen des Knochenmarks sind, scheinen MSC nicht auf das Knochenmark beschränkt zu sein. Immer mehr *in vivo* und *in vitro* Studien weisen auf die Existenz von MSC in verschiedenen Geweben hin. So konnten MSC-ähnliche Zellen aus dem Pankreas, der Plazenta, dem Fruchtwasser, dem Nabelschnurblut, dem Synovialgewebe, dem Fettgewebe, dem trabekulären Knochen, dem Periost und anderen fötalem Gewebe isoliert werden [137-148]. Obwohl eine Isolierung von MSC aus verschiedenen Geweben und Spezies möglich ist, ist eine eindeutige Charakterisierung immer noch schwierig. Ihre Morphologie wird in den meisten Studien als fibroblastoid beschrieben, aber es gibt auch die Beschreibung von polygonalen oder kuboidalen Zellen [149-150]. Ebenso ist das phänotypische Expressionsmuster der Oberflächenmarker sehr inhomogen. Allgemein akzeptiert ist die Tatsache, dass MSC hämatopoetische oder endotheliale Marker, wie CD11b (auf myeloiden und NK-Zellen), CD31 und CD45 (Marker aller hämatopoetischen Zellen), fehlen. Obgleich MSC aus Mensch und Ratte CD34 negativ sind, ist für murine MSC eine variable Expression von CD34 beschrieben worden [151-153]. Häufig exprimieren MSC Adhäsionsmoleküle, wie CD44, CD49e und CD62, oder adhäsionsverwandte Moleküle CD54, CD106 und CD166 und sind MHC I positiv [130,152,154-156,183]. Durch die Heterogenität der MSC-Populationen, bedingt durch unterschiedliche Spezies, Isolierungsmethoden, Ursprungsgewebe und Kulturbedingungen, ist die Expression von CD90 (Thy1.1), SH2 (CD105 oder Endoglin), SH3 oder SH4 (CD73) und Stro-1 unterschiedlich [130,155,157-159]. Untersuchungen von Kolf et al. 2007 ergaben, dass sich Stro-1, CD106 und CD73 am Besten als positive MSC Marker eignen, da sie sowohl in murinen, als auch humanen MSC die höchste Spezifität aufweisen [160]. Die International Society for Cellular Therapy legte als minimale Kriterien zur Definierung humaner mesenchymaler Stammzellen fest, dass sie für CD105, CD73 und CD90 positiv sein müssen und negativ für CD45, CD34, CD14 oder CD11b, CD79 oder CD19 und HLA-DR. Für die routinemäßige Charakterisierung der in dieser Arbeit isolierten MSC aus Speicheldrüsen, wurde ein eigenes Protokoll angefertigt. Im Folgenden Kapitel 1.4.2.3.1 werden die gewählten Marker beschrieben. Sie stellen eine Kombination aus vielversprechenden putativen mesenchymalen und allgemeinen Stammzellmarkern dar.

Eine weitere Eigenschaft der MSC, die sie für therapeutische Zwecke äußerst attraktiv erscheinen lassen, ist ihr Homing-, Migrations- und Engraftmentpotential. Es konnte im nicht-humanen Primaten Modell (Pavian) gezeigt werden, dass GFP (green fluorescent protein) oder ALP markierte MSC nach systemischer Infusion in das Knochenmark hominieren und dort

nachweisbar sind [161]. In zwei von fünf Primaten konnten die markierten Zellen noch nach einem Jahr nachgewiesen werden. In einer Folgestudie injizierten die gleichen Autoren drei Primaten systemisch MSC, die ein retrovirales GFP Konstrukt enthielten [162]. Nach 9-21 Monaten war mittels real-time RT-PCR in gastrointestinalen Geweben, aber auch in der Niere, der Leber, der Lunge, dem Thymus und der Haut das GFP-Transgen nachweisbar. MSC der Ratte, die nach einem Schlaganfall systemisch injiziert wurden, migrierten in das Nervengewebe und reduzierten dort funktionelle Defizite [163]. Die meisten Untersuchungen zum Migrationsverhalten verschiedener Stammzellen, gibt es im Herzinfarktgewebe [164]. So konnte nach systemischer Injektion von MSC der Ratte gezeigt werden, dass diese zum Infarktgewebe migrieren und dort verbleiben (engraften) [165]. In einer weiteren Studie wurden MSC einer männlichen Ratte intravenös (Gruppe 1) drei Stunden nach erzeugtem Herzinfarkt, (Gruppe 2) drei Stunden nach vorgetäuschem Herzinfarkt und (Gruppe 3) in gesunde weibliche Ratten injiziert [166]. Nach einer bzw. acht Wochen wurde mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung die Expression des SRY (sex determining region Y) Gens nachgewiesen. In den Gruppen eins und zwei waren SRY positive Zellen detektierbar, wobei die Zahl der in Gruppe eins gemessenen Zellen signifikant höher als die in der Gruppe zwei war. In der Kontrollgruppe drei waren keine Zellen messbar. Diese Resultate stehen im Einklang mit ähnlichen Berichten, in denen gezeigt wurde, dass MSCs nur nach erfolgtem Infarkt, gerichtet in das Randgebiet des geschädigten Gewebes, migrieren.

2.4.3.2.1 Potentielle mesenchymale Stammzellmarker und deren Funktion

2.4.3.2.1.1 CD13

CD13 ist eine Aminopeptidase N, die hauptsächlich auf monozytären Zellen und epithelialen Zellen der Leber, der Niere, des Darms und dem aktivierten Gefäßendothel exprimiert wird. Neben der enzymatischen Regulierung von neuroregulatorischen und vasoaktiven Peptiden, dient CD13 verschiedenen Coronaviren als Rezeptor. Trotz seiner Struktur, enzymatisch aktive extrazelluläre Domäne und kleine zytoplasmatischen Domäne, die keinerlei Signalmotive erkennen lässt, konnte kürzlich gezeigt werden, dass ein CD13-crosslinking mit einem Antikörper eine Aktivierung monozytärer Zellen, durch signaltransduktionsabhängige Mechanismen, zur Folge hat [167]. Die induzierte Zell-Zell-Adhäsion war abhängig vom Carboxyhydrat-Bindendem-Protein galectin-3, aber unabhängig von der CD13 Enzymaktivität. Durch inflammatorische Zytokine konnte die Transmigration monozytärer Zellen durch das aktivierte Endothel signifikant erhöht werden, hierfür war eine Komplexbildung von monozytärem und endotheliale CD13 notwendig.

2.4.3.2.1.2 CD29

CD29, auch als Integrin beta1 (ITGB1) bezeichnet, ist ein heterodimeres Protein aus der Membranrezeptorfamilie der Integrine. Die Rezeptoren sind in Zell-Adhäsion, Embryogenese, Hämostasis, Gewebereparatur, Immunantwort und Tumormetastasierung involviert. CD29 aktiviert den MAPK-Signalweg und wurde bereits als wichtiger Marker für neuronale Stammzellen identifiziert [168].

2.4.3.2.1.3 CD44

CD44 ist ein Zelloberflächen-Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 80-95 kDa. Es gehört zur Familie der Hyaladherine, Hyaluronsäure-bindenden Proteinen mit strukturellen Ähnlichkeiten zu den Selektinen. CD44 wird auch als Hermes Antigen, Pgp-1 (P-Glykoprotein-1) oder H-CAM (homing cell adhesion molecule) bezeichnet. CD44 ist ein mesenchymaler Stammzellmarker, wird aber auch auf hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zellen exprimiert mit Ausnahme von Thrombozyten, Hepatozyten und Testis. Dieses Molekül ist ein Rezeptor für Hyaluronsäure und spielt somit beispielsweise eine Rolle in der Zell-Migration, es kann jedoch auch an andere Liganden, wie Osteopontin, Laminin, Fibronectin, Kollagen und Matrix-Metalloproteasen binden. Außerdem vermittelt es die Adhäsion von Leukozyten und ist am Lymphozyten-Homing und der Lymphozyten-Aktivierung beteiligt.

Das CD44-Gen enthält 10 Exons, und die Transkripte unterliegen einem komplexen “Splicing”-Mechanismus sowie posttranslationalen Modifikationen, weshalb viele unterschiedliche Isoformen entstehen können. Alternatives Splicen ist die Basis für die strukturelle und funktionelle Vielfalt des CD44-Proteins und wird mit der Tumormetastasierung in Zusammenhang gebracht. Außerdem wurde von der CD44-Splice-Variante CD44v6 vor kurzem gezeigt, dass sie die Proliferation stimuliert [169].

In der Frühzeit der Schwangerschaft könnten CD44-Splice-Varianten die Invasion in das maternale Gewebe vermitteln [170]. Die Gen-Transkription von CD44 wird teilweise durch den wingless/int (wnt) Signalweg aktiviert, welcher die Selbsterneuerung in Stammzellen reguliert.

2.4.3.2.1.4 CD54

CD54 oder ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) wird permanent in geringen Konzentrationen in der Membran von Leukozyten und Endothelzellen exprimiert. Die Konzentra-

tion kann durch Zytokine hochreguliert werden. Induziert wird ICAM-1 durch Interleukin-1 und TNF-alpha auf Gefäßendothel, Makrophagen und Lymphozyten. Es ist Ligand von LFA-1 (Integrin), ein Rezeptor auf Leukozyten, wodurch aktivierte Leukozyten an das Endothel binden können und eine Transmigration in das Gewebe ermöglicht wird [171].

2.4.3.2.1.5 CD73

CD73 oder lymphocyte-vascular adhesion protein 2, ist eine Ecto-5'-Nukleotidase (Ecto-5'-NT), die die Dephosphorylierung von Ribo- und Desoxyribonukleosidmonophosphaten von Purinen und Pyrimidinen katalysiert. Die dabei entstehenden Nucleoside können durch Diffusion in die Zelle gelangen und am Purin-Erhaltungs-Zyklus teilnehmen.

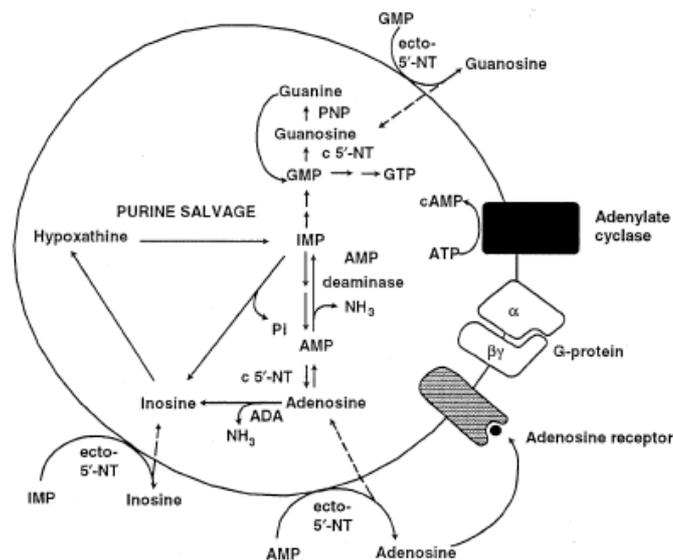


Abbildung 5: Purinmetabolismus in humanen Lymphozyten [Resta et al. 1997]

CD73 katalysiert als Nucleotidase die Dephosphorylierung von Ribo- und Desoxyribonukleosidmonophosphaten von Purinen und Pyrimidinen.

Neben der Funktion von CD73 im Purinmetabolismus wurde postuliert, dass es eine Rolle in der Zelladhäsion zwischen Lymphozyten und dem Endothel spielt. Die dritte Aufgabe von CD73 besteht darin, als kostimulierendes Molekül, den T-Zellrezeptor (TCR) zu aktivieren, was eine Aktivierung und Proliferation von T-Zellen im peripheren Blut zur Folge hat [172]. Obwohl CD73 auf vielen Zellen exprimiert wird und häufig als Marker für die Lymphozytendifferenzierung genutzt wird, ermöglichte die Entwicklung von zwei monoklonalen Antikörpern, SH-3 und SH-4, die an zwei verschiedene Epitope von CD73 binden, die ausschließliche Detektion von Zellen aus dem mesenchymalem Gewebe [157]. Die Antikörper reagieren nicht mit HSC, Osteoblasten oder Osteozyten, den potentiellen Kontaminanten in plastikadhärenten MSC-Kulturen. Zusätzlich bleibt die Expression von CD73 auf MSC, während der Kultivierung, konstant, wodurch er sich als idealer MSC-Marker eignet. Barry et al.

postuliert zusätzlich eine mögliche Rolle von CD73 in der Differenzierungsregulierung von MSC [228].

2.4.3.2.1.6 CD90

CD90 oder Thy-1 (Thymocyte differentiation antigen 1) ist ein Glycophosphatidylinositol (GPI) verankertes Zelloberflächenprotein mit einer v-ähnlichen Immunglobulindomäne. Es wurde als Thymozytenantigen entdeckt, wird aber heute als Stammzellmarker und bei axonalen Prozessen von reifen Neuronen genutzt. Die Expression findet auf Thymozyten, Neuronen, MSC, HSC, NK-Zellen, Endothel, glomerulären Mesangialzellen, metastasierenden Melanomzellen, Fibroblasten und Myofibroblasten statt. Es spielt eine Rolle in der T-Zellaktivierung, Adhäsion, Migration, Neuritenwuchs, Nervenregeneration, Metastasierung, Entzündungsprozessen, Fibrosierung und Zelltod. In der Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktion, kommt CD90 eine regulatorische Funktion zu [173].

2.4.3.2.1.7 CD105

Endoglin ist ein Typ I Membranglykoprotein der Zelloberfläche. Als Teil des TGF beta Rezeptorkomplexes wird es auf endothelialen Zellen, Synzytiotrophoblasten, Makrophagen und Bindegewebsstromazellen exprimiert, und spielt eine Rolle in der zytoskeletalen Organisation, indem es Zellmorphologie und Migration beeinflusst, in der kardiovaskulären Entwicklung und im Gefäßremodeling. Durch die Nutzung des SH-2 Antikörpers, der an CD105 bindet, konnte gezeigt werden, dass Endoglin potentiell wichtig in der TGF-beta-Signalkaskade zur Kontrolle der chondrogenen Differenzierung in MSC ist, es für die Interaktion von MSC und hämatopoetischen Zellen im Knochenmark eine wichtige Funktion hat und ein Indikator für proliferierendes Endothel ist [175].

2.4.3.2.1.8 CD106

CD106 oder auch VCAM1 (vascular cell adhesion molecule 1), ist ein Gen aus der Familie der Ig Superfamilie und kodiert ein Sialoglykoprotein der Zelloberfläche, das von Zytokinaktiviertem Endothel exprimiert wird. CD106 ist in die Zelladhäsion, Chemotaxis und Signaltransduktion involviert und spielt eine wichtige Rolle in der Leukozytenmigration. Es wird durch Zytokine wie Interleukin 1 und TNF-alpha hochreguliert und bindet an Immuneffektorzellen, wie Neutrophile, Eosinophile und Lymphozyten, über den Interleukinrezeptor [176]. Nur 1,4% der Stro-1 positiven Zellen sind auch CD106 positiv. Sie sind die einzigen

Zellen, die *in vitro* Kolonien formen und Stammzellcharakter, wie Multipotenz, Telomeraseexpression und hohe Proliferationsraten zeigen [127].

2.4.3.2.1.9 CD140b

CD140b, auch als Platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide (PDGFRB) bekannt, ist eine Rezeptor-Tyrosinkinase für die Mitglieder der platelet-derived growth factor Familie. Diese Wachstumsfaktoren wirken als Mitogene für alle Zellen mesenchymalen Ursprungs. Die Aktivierung des Rezeptors bewirkt zytoskeletalen Umbau, Mitogenese und Chemotaxis [177]. In den Untersuchungen von Koide et al. wird CD140b als exzellenter pan-spezifischer Marker für mesenchymale Zelllinien postuliert [229].

2.4.3.2.1.10 CD166

CD166/ALCAM (activated leukocyte cell adhesion molecule) ist ein Typ I Transmembranprotein der Ig Superfamilie und in viele physiologische Prozesse involviert, wie Hämatopoese, Thymusentwicklung, Immunantwort, die Ausdehnung von Neuriten, neurale Zellmigration und Osteogenese. ALCAM wurde zuerst als Ligand für CD6 entdeckt. Diese heterophile Interaktion ist gut erforscht, während über die molekulare Basis der homophilen Interaktion von ALCAM-ALCAM lediglich bekannt ist, dass eine Clusterbildung von ALCAM-Molekülen auf der Zelloberfläche notwendig ist, um eine stabile Zell-Zell-Adhäsion zu gewährleisten [178]. Durch den monoklonalen Antikörper SB-10, der spezifisch an CD166 als Antigen bindet, konnte gezeigt werden, dass undifferenzierte MSC CD166 exprimieren, aber die Expression während der mesenchymalen Differenzierung verloren geht. Ebenso war ein Nachweis von ALCAM als Zell-Adhäsions-Molekül in der Osteogenese möglich [182], allerdings konnte nachgewiesen werden, dass die CD166-Expression auf MSC während der Osteogenese verloren geht, sobald ALP auf der Zelloberfläche exprimiert wird [228].

2.4.3.2.1.11 Stro-1

Stro-1 ist der bis jetzt am besten bekannte MSC-Marker. Er wurde als Antikörper für nicht-hämatopoetische Progenitorzellen aus dem Stroma des Knochenmarks identifiziert. Stro-1 negative Zellpopulationen sind *in vitro* nicht in der Lage Kolonien zu bilden und zeigen *in vivo* kein Gewebe-engraftment [160,181], während Stro-1-positive Zellen zu HSC-unterstützenden Fibroblasten, glatten Muskelzellen, Adipozyten, Osteoblasten und Chondro-

zyten werden können, was den Aufgaben von MSC entspricht. Gegen Stro-1 als generellen MSC-Marker sprechen drei Gründe. Erstens gibt es keinen homologen Marker auf murinen MSC, zweitens kommt Stro-1 nicht ausschließlich auf MSC vor und drittens geht die Stro-1-Expression während der Kultivierung verloren [160].

2.4.3.2.1.12 Differenzierungsmechanismen mesenchymaler Stammzellen

Die Kulturen mesenchymaler Stammzellen sind nicht zu 100% homogen. Klonale MSC-Kulturen, die sich von einer einzigen MSC ableiten und in der Durchflusszytometrie homogen erscheinen, sind bezüglich ihres Differenzierungspotentials inhomogen. So berichtete Pittenger, dass nur 1/3 der humanen MSC Klone ein tripotentes (chondro-, osteo-, adipogenes) Entwicklungspotential aufweisen [130]. Dieses Resultat wurde in ähnlichen Studien bestätigt [150,179]. Häufig war nur ein bipotentes oder sogar unipotentes Entwicklungspotential vorhanden, immer war aber eine Differenzierung in die osteogene Linie möglich. Auch *in vivo* applizierte MSCs weisen kein einheitliches Entwicklungsmuster auf [127]. Ein Modell zur Erklärung dieser Beobachtungen ist, dass der MSC-Pool im Knochenmark sich nicht nur aus wenigen multipotenten MSC zusammensetzt, sondern auch aus Subpopulationen mit unterschiedlichem Differenzierungsgrad. Diese haben ein begrenztes Selbsterneuerungspotential und entwickeln sich zu den terminal differenzierten Zellen der einzelnen Gewebe. Diese Unterschiede im Selbsterneuerungs- und Differenzierungspotential spiegeln sich *in vitro* wieder. Die molekularen Mechanismen der Differenzierung von humanen MSCs sind trotz zahlreicher Studien noch nicht vollständig bekannt. Basierend auf verschiedenen Untersuchungen hat die Gruppe um Tuan ein Modell zur Regulation der Differenzierung von MSC auf zwei Ebenen vorgeschlagen (Abb. 6) [180].

In der ersten Ebene, dem Stammzell Compartment, durchlaufen die MSC transkriptionale Modifikationen und generieren Precursorzellen mit vergleichbarem Phänotyp und Selbsterneuerungspotential. Nach einer Stimulierung teilen sich die multipotenten, undifferenzierten MSC asymmetrisch, was in einer identischen Stammzelle und einer zweiten, in ihrem Entwicklungsprogramm eingeschränkten Precursorzelle resultiert. Letztere teilen sich dann symmetrisch und bringen tri- bzw. bipotente Zellen hervor. Diese sind den multipotenten MSC morphologisch ähnlich, weisen aber ein abweichendes Genexpressionprofil auf. Die Entwicklung geht in der zweiten Ebene, dem Committed Cell Compartment weiter, wenn sich die Precursorzellen des Stammzell Compartments weiter symmetrisch teilen und zu unipotenten Progenitorzellen werden, die terminal differenziert sind und sich auch morphologisch von den multipotenten MSC unterscheiden. Aktuell sind die Mechanismen, die MSC

entlang dieser zwei Ebenen zu gewebespezifischen Zellen führen, nur unzureichend bekannt. Einblicke gewähren hier u.a. Microarray-Studien zur Genexpression, die linienspezifische aber auch linienübergreifende Expressionsmuster aufzeigen. So konnte die Arbeitsgruppe um Tuan einzelne Gene nachweisen, die während der adipo-, osteo- und chondrogenen Differenzierung in allen drei Linien hochreguliert werden. Es handelt sich dabei um putative Kontrollgene der Differenzierung. Eine funktionelle Analyse steht noch aus. Adipozyten und Osteoblasten teilen deutlich mehr gemeinsam hochregulierte Gene (235) als Chondrozyten und Adipozyten (10) oder Chondrozyten und Osteoblasten (3), was andeutet, dass die Osteoblasten und Adipozyten einen gemeinsamen Vorläufer haben, während sich Chondrozyten von einer anderen Progenitorzelle abzuleiten scheinen.

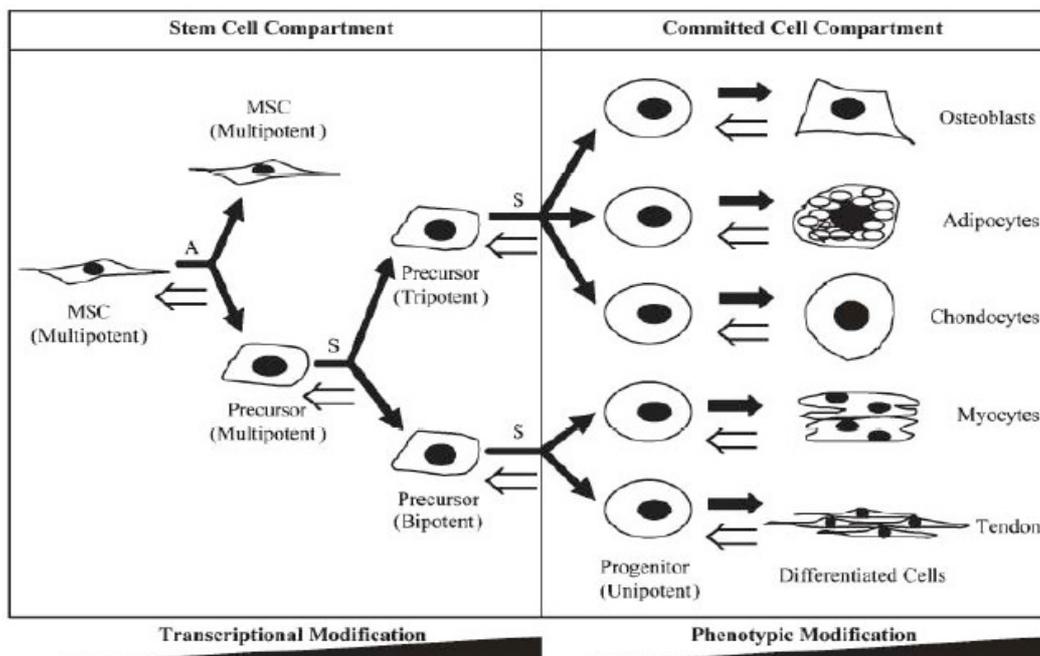


Abbildung 6: *In vitro* Modell zur Regulation der MSC-Differenzierung
 (A) Asymmetrische Zellteilung, in eine multipotente MSC und eine weniger potente Precursorzelle
 (S) symmetrische Zellteilung, in differenziertere und weniger potente Zellen
 Aktuell zeichnet sich ab, dass terminal differenzierte Zellen zu multipotenten Zellen dedifferenzieren können (offener Pfeil) [Baksh et al. 2004]

2.4.3.2.2 Adipogenese

Fettgewebe sind an verschiedenen Orten des Körpers angesiedelt und hier überwiegend in Bereichen des lockeren Bindegewebes. Es wird zwischen weißem und braunem Fettgewebe unterschieden, wobei braunes Fettgewebe vor allem als Wärmedepot bei Neugeborenen vorkommt und im adulten Organismus nur eine untergeordnete Rolle spielt. *In vivo* Studien zeigten, dass die Entwicklung von weißem Fettgewebe während der embryonalen Entwick-

lung beginnt, aber erst nach der Geburt die Größe und die Zahl der Fettzellen stark ansteigt. Man geht im Gegensatz zu früheren Erkenntnissen heute davon aus, dass im Rahmen der Gewebekomöostase und der Einlagerung von Fettgewebe während des gesamten Lebens eine adipogene Entwicklung von Progenitorzellen zu Fettzellen stattfindet [184]. Weißes Fettgewebe dient u.a. als Fettdepot und repräsentiert so eine der wichtigsten Komponenten im Energiehaushalt des Körpers. Die zellulären und molekularen Abläufe während der Adipogenese sind vor allem an der murinen 3T3-L1 präadipozyten Zelllinie untersucht worden [185]. In einem die Adipogenese induzierenden Medium bilden diese Zellen im Zytoplasma Lipid-Vakuolen und molekularbiologische Untersuchungen zeigten die Expression von Markergenen des normalen Fettgewebes [186]. Ein Nachteil dieser und anderer verwendeter Zelllinien ist, dass diese bereits auf die adipogene Entwicklungslinie festgelegt sind. Undifferenzierte Linien, wie NIH-3T3 oder C3H10T1/2, stellen hier eine Alternative dar. Die adipogene Entwicklung von undifferenzierten mesenchymalen Zellen zu Fettzellen kann vereinfacht als zweistufiger Prozess betrachtet werden. Im ersten Schritt erfolgt eine Determinierung von MSC auf die adipogene Entwicklungslinie und die Bildung von Präadipozyten. Im zweiten Schritt erfolgt eine Entwicklung zum reifen Adipozyten, der durch Fetttropfen im Zytoplasma charakterisiert ist. Die Faktoren, die an der Festlegung beteiligt sind, sind weitestgehend unbekannt. Zell-Zell, Zell-Matrix und hormonelle Faktoren spielen dabei eine Rolle [187]. Die folgende Kurzbeschreibung der Adipogenese basiert auf einem Übersichtsartikel von Rosen [188]. Nach einer adipogenen Induktion von 3T3-L1 Präadipozyten wird rasch und transient die Expression der Transkriptionsfaktoren C/EBP beta (CCAAT/Enhancer Binding Protein beta) und C/EBP delta hochreguliert, die eine Expression der Transkriptionsfaktoren C/EBP alpha und PPAR gamma (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) induzieren. Letztere bleiben über die gesamte Lebenszeit von reifen Adipozyten aktiv und fast jedes Gen, das stromabwärts dieser beiden Transkriptionsfaktoren an der Adipogenese beteiligt ist, wird von einem der beiden Faktoren reguliert. Die Rolle von C/EBP alpha wurde zunächst *in vitro* analysiert und scheint vor allem in der Induktion der Expression von PPAR gamma zu liegen. Eine Adipogenese in C/EBP alpha^{-/-} Knock-out-Mäusen findet nur dann statt, wenn PPAR gamma (genauer: die Spleicevariante PPAR gamma 2) zugegeben wird. Wird PPAR gamma ektopisch in embryonalen Maus-Fibroblasten exprimiert, so wird für die Adipogenese kein C/EBP alpha benötigt. Allerdings sind die Fettzellen dann nicht insulin-sensitiv; ein Defekt der durch C/EBP alpha-Zugabe rückgängig gemacht werden kann. C/EBP alpha ist an der Expression verschiedener für die Insulinsensitivität wichtiger Moleküle, wie dem Insulinrezeptor, beteiligt. In der Maus führte ein C/EBP alpha^{-/-} Knock-out zu

einer stark verringerten Adipogenese und reduzierten Expression verschiedener adipozytärer Gene. Diese Effekte waren vor allem auf das weiße Fettgewebe beschränkt. Ebenfalls im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass PPAR gamma (Protein: PPAR gamma 2) für die Bildung von Fettgewebe notwendig ist. *In vitro* bilden PPAR gamma-/- Knock-out Zellen keine Fetttropfen, exprimieren keine Marker differenzierter Fettzellen und zeigen keine Insulinsensitivität. Diese Effekte werden nicht durch eine Zugabe oder ektopische Expression von C/EBP alpha rückgängig gemacht. Eine bis heute unbeantwortete Frage ist, welche zusätzlichen Faktoren auf molekularer Ebene die Regulation zur Erreichung und dem Erhalt des terminalen Endzustands der Adipogenese bewirken. Es sind verschiedene Transkriptionsfaktoren beschrieben worden, die stromaufwärts, stromabwärts oder parallel zu C/EBP alpha und PPAR gamma wirken. Deren genaue Funktion, bezüglich der Entwicklung und dem Erhalt der Adipozyten, ist aber weitestgehend unbekannt. Als Beispiel sei hier der Helix Loop Helix Faktor SREBP1c genannt, der in Adipozyten hoch exprimiert ist und nach Überexpression die Adipogenese fördert. Es wird davon ausgegangen, dass SREBP1c direkt an den PPAR gamma Promotor bindet, aber auch die Expression von PPAR gamma-Liganden fördert. *In vivo* konnten nach Abwesenheit von SREBP1c keine negativen Effekte beobachtet werden. Eine Überexpression von APM1 (adipose most abundant factor 1) in 3T3-L1 Zellen resultiert in einer schnelleren Entwicklung zu Adipozyten, in einer Expression von Transkriptionsfaktoren der Adipogenese und in einer erhöhten Insulinsensitivität [189]. Reife Adipozyten sekretieren APM1.

2.4.3.2.2.1 *In vitro* Adipogenese

Die *in vitro* Adipogenese erfolgt oft in einem Standard Assay nach Pittenger in einem high-Glucose Medium mit Insulin, Dexamethason (ein synthetisches Glukokortikoid), Indomethacin (ein NSAID) und 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) als induzierende Faktoren. Ein hoher Glucosegehalt bewirkt, dass die Zellen ein Überangebot an Substrat für verschiedene Biosynthesewege, wie die Fettsynthese, zur Verfügung haben. Insulin wirkt hierbei an mehreren Prozessen der adipogenen Induktion mit. Es regt die Aufnahme von Glucose in die Zellen durch eine Translokation des Glucosetransporters GLUT4 an. In der Zelle wird die Glucose zu Glucose-6-Phosphat umgesetzt. Auch die Oxidation von Glucose-6-Phosphat zu Pyruvat (Glycolyse) sowie die Oxidation von Pyruvat zu Acetyl-CoA, dem Baustein der Fettsäuren, wird durch Insulin aktiviert [190]. Insulin bewirkt zusätzlich eine Speicherung von Fett. Dexamethason hemmt die Bildung von Eicosanoiden aus Arachidonsäure, indem es die Freisetzung von Arachidonsäure durch die Phospholipase A hemmt. Somit bleibt die Arachi-

donsäure in einer gebundenen Form erhalten und wird nicht verstoffwechselt [190]. Dexamethason ist auch an der Induktion der Expression von PPAR gamma beteiligt und somit an der Einleitung der Adipogenese [191]. Darüber hinaus ist es an der terminalen Differenzierung von Adipozyten beteiligt [192]. Auch Indomethacin inhibiert die Verstoffwechslung von Arachidonsäure [193]. Es verhindert bei der Bildung von Prostaglandinen und Thromboxanen, durch Inhibierung der Cyclooxygenase, den Ringschluss zwischen dem 8. und dem 12. Kohlenstoffatom der Arachidonsäure, wodurch diese nicht verstoffwechselt werden kann. Zusätzlich aktiviert es die Adipogenese durch Bindung an PPAR gamma [194]. 3-Isobutyl-1-methylxanthin inhibiert in der Zelle die cAMP und cGMP Phosphodiesterase, was zur Erhöhung des cAMP Gehalts führt. Dies resultiert letztlich in einer verringerten Proliferation und einer verstärkten Differenzierung der Zellen.

2.4.3.2.3 Chondrogenese

Das Knorpelgewebe ist ein avaskuläres Gewebe und frei von Nerven. Die Entwicklung von Knorpel, die Chondrogenese, resultiert aus der Bildung der Wachstumsplatten, die das Körperwachstum vorantreiben und eine existentielle Rolle während der enchondralen Ossifikation einnehmen. Darüber hinaus führt die Chondrogenese zur Bildung von permanentem Knorpelgewebe, das u.a. in den Gelenken, im Atmungstrakt und in der Ohrmuschel strukturelle Aufgaben übernimmt. Es können drei Knorpelarten im humanen adulten Organismus unterschieden werden. Im reißfesten Bindegewebe des Faserknorpels befinden sich vor allem Typ I Kollagenfasern, während der elastische Knorpel von einem Netz elastin-haltiger Fasern durchzogen wird, die ihm seine elastische Konsistenz geben. Die primäre Funktion der Chondrozyten im hyalinen Knorpel ist die Bildung, der Erhalt und das Remodelling der umgebenden Knorpelmatrix. Diese besteht aus einem Netzwerk von Kollagenfibrillen und einem darin eingebetteten, hydratisierten Gel aus Proteoglykanen und Glykoproteinen. Kollagen Typ II ist hierbei der dominierende Typ. Es ist allgemein als Knorpelmarker akzeptiert. Daneben sind Kollagene vom Typ IX und XI vorhanden und nur im prähypertrophen, sowie hypertrophen Knorpel, auch vom Typ X. Aggrecan repräsentiert das dominierende Proteoglykan. Das große Molekül kommt kaum in anderen Geweben vor und formt sehr große Aggregate, indem es wie andere Proteoglykane mit Hilfe des Link Proteins (cartilage link protein; CLP) an das Glykosaminoglykan Hyaluronsäure bindet. Diese Konstruktion hat die Eigenschaft viel Wasser zu binden und zeichnet sich durch ihre Druckfestigkeit aus. Glykoproteine wie das Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP) und Matrilin, sowie Proteoglykane wie Perlecan und Fibromodulin, liegen je nach Knorpeltyp in variierenden Kon-

zentrationen vor. Die genannten Marker werden zum Nachweis der *in vitro* oder *in vivo* chondrogenen Entwicklung von Zellen herangezogen. Die Knorpelmatrix ist für die biomechanischen Eigenschaften des Knorpels verantwortlich, moduliert aber auch die Differenzierung und Aktivität von Chondrozyten [195]. Der Gelenkknorpel lässt sich histologisch in vier Zonen unterteilen [196]. Die Zone eins wird als Tangentialfaserzone bezeichnet, in der parallel zur Oberfläche spindelförmige Knorpelzellen angeordnet sind. Die Kollagenfasern zeigen den gleichen Verlauf und bilden Arkaden, die in die tiefer liegenden Zonen hineinreichen. Während der Kollagengehalt hier hoch ist, ist die Konzentration von Proteoglykanen gering. Die Zone zwei wird als Übergangzone bezeichnet, da sich die Zellen runder präsentieren und sich zu Chondronen zusammenlagern. Der Gehalt an Proteoglykanen ist im Vergleich zur Zone eins höher. Die Zone drei ist eine breite Radiärzone, in der sich die Chondrozyten zu Säulen anordnen. Dazwischen verlaufen ausgeprägte Kollagenfaserbündel. Hier findet sich auch die höchste Konzentration an Proteoglykanen. Zone vier stellt den Übergang zum subchondralen Knochen dar und wird als Zone des mineralisierten Knorpels bezeichnet, da hier bereits Kalziumkristalle in die extrazelluläre Matrix eingelagert sind. Histologisch lässt sich zwischen der Zone drei und vier eine basophile Grenzlinie erkennen (Tidemark), deren Funktion bisher nicht völlig geklärt ist. Während der Skelettentwicklung bilden sich im Rahmen der endochondralen Ossifikation zunächst Kondensationen mesenchymaler Zellen aus. Die Abläufe der frühen Chondrogenese sind teils unverstanden, werden aber u.a. durch mesenchymal-/epitheliale Zellinteraktionen reguliert [197,198]. Zelladhäsionsmoleküle wie N-Cadherin und NCAM (neural cell adhesion molecule), sowie Matrixmoleküle wie Tenascin C und Versican, sind nachweisbar. Im Zentrum der Kondensationen entwickeln sich Prächondrozyten, und die Expression von Markern undifferenzierter Zellen und von Kondensationsmarkern kommt zum Stillstand. Ab diesem Zeitpunkt ist Kollagen Typ II erstmals nachweisbar. Auf regulatorischer Ebene ist der Transkriptionsfaktor SOX9 von besonderer Bedeutung. Die Expression von SOX9 (Sry Type High Mobility Group Box) ist von der undifferenzierten mesenchymalen Zelle bis zum Übergang zum prähypertrophen Zustand detektierbar. Insgesamt ist SOX9 für die Bildung der Kondensationen, für die Proliferation und für die Weiterentwicklung zu Chondrozyten, sowie für die Expression der Transkriptionsfaktoren L-SOX5 und SOX6 notwendig. Zusätzlich reguliert SOX9 direkt die Expression der Gene für Kollagen Typ II, Typ XI und Aggrecan. Die Expression von SOX9 wird durch verschiedene Bone Morphogenetic Proteine (BMPs) initiiert, die somit die Kondensation beeinflussen [199]. Es ist bisher kein anderer Transkriptionsfaktor gefunden worden, der die frühe Chondrogenese stromaufwärts oder auf der gleichen Stufe wie SOX9 in allen sich entwi-

ckelnden Knorpel-elementen reguliert. Die Weiterentwicklung der Prächondrozyten zu frühen Chondroblasten geht mit einem Anstieg der Zellproliferation und der Matrixproduktion einher. So beginnen die Zellen verstärkt Kollagen Typ II zu sekretieren und Aggrecan, Link Protein, Kollagen Typ IX und XI werden erstmals nachweisbar. Neben SOX9 werden nun auch L-SOX5 und SOX6 detektiert. Diese sind sich strukturell ähnlich und haben teils vergleichbare Funktionen. SOX5-/-/SOX6-/- Doppel-Knock-out Mäuse versterben schon im Uterus. Einen Einfluss auf die Bildung von Prächondrozyten haben diese Mutationen nicht, es erfolgt aber keine Weiterentwicklung zum frühen Chondroblasten. Während der frühen Embryonalentwicklung bilden die Chondroblasten Knorpelanlagen, die als formgebende Elemente des sich entwickelnden Skeletts anzusehen sind. Im Zentrum der Diaphyse der zukünftigen Röhrenknochen differenzieren die frühen Chondroblasten rasch zu terminal differenzierten Zellen und werden apoptotisch. Die entstehenden Lacunen werden durch einwandernde knochenbildende Zellen aufgefüllt und es formieren sich primäre Ossifikationszentren. An beiden Seiten dieser Zentren bilden sich aus den frühen Chondroblasten die Wachstumsplatten aus. Nach Apoptose der terminal differenzierten Chondrozyten können sich die primären Ossifikationszentren ausdehnen. Die Säulenchondrozyten und die hypertrophen Chondrozyten ermöglichen letztlich das Längenwachstum der Röhrenknochen. Zellen in der Mitte der Epiphyse der sich formierenden Röhrenknochen durchlaufen ein ähnliches Programm und bilden sekundäre Ossifikationszentren aus. Die frühen Chondroblasten der Metaphyse beginnen, wenn die Zellen in der Diaphyse prähypertroph geworden sind, Zonen säulenförmig geordneter Chondroblasten zu formieren. Die ehemals runden Chondrozyten erscheinen nun flach und sind in parallelen Säulen angeordnet. Die am oberen Rand der Säule befindlichen Zellen proliferieren am stärksten. Die Proliferation nimmt nach unten hin ab und kommt beim Übergang zum prähypertrophen Chondrozyten zum Stillstand. L-SOX5 und SOX6 sind essentiell für die Entwicklung und den Erhalt der säulenförmigen Zone. Faktoren wie Indian Hedgehog (IHH), das Parathyroid Hormone-related Peptide (PTHrP), FGFs, BMPs und Moleküle des Wnt-Signalweges sind ebenfalls an der Formierung und dem Erhalt dieser Zone beteiligt [200]. Die Transkriptionsfaktoren CBFA1 (RUNX2) und RUNX3 stimulieren die Proliferation der Säulenchondroblasten und sind auch für deren Anordnung von Bedeutung. Vor allem CBFA1, der zentrale Transkriptionsfaktor der Osteogenese, wird bis zum Stadium des terminalen Chondrozyten exprimiert. CBFA1-/- Knock-out-Mäuse weisen in einigen skelettalen Elementen eine signifikante Reduktion der Proliferation von Chondroblasten auf, während CBFA1-/-/RUNX3-/- Doppel-Knock-out-Mäuse gar keine säulenförmigen Elemente bilden

[201]. Die weitere Differenzierung der Chondroblasten zu prähypertrophen Chondrozyten geht mit einer ausgeprägten phänotypischen Änderung einher. Die Zellen proliferieren nicht mehr und vergrößern ihr zytoplasmatisches Volumen etwa um den Faktor 10. Sie enthalten mehr RNA für Aggrecan, Kollagen Typ II und aktivieren sequentiell die Gene für PTHR, IHH und Kollagen Typ X. Im hypertrophen Stadium ist die Expression der frühen Markergene sowie von PTHR und IHH nicht mehr nachweisbar, wohingegen vermehrt Kollagen Typ X produziert wird. Verschiedene BMPs, FGFs und andere Signalmoleküle sowie eine PTHrP/IHH Rückkopplungsschleife regulieren die Rate des Übergangs in den prähypertrophen Zustand. Eine Überexpression von PTHrP führt zu einer ausgeprägten Inhibition der Knorpelreifung und verzögerter Bildung von Knochen. PTHrP^{-/-} Knock-out-Mäuse zeigen verkümmerte Röhrenknochen. Insgesamt, stellt das PTHrP-Signalling einen negativen Regulator der Entwicklung vom proliferierenden zum hypertrophen Chondrozyten dar [202]. IHH, welches die PTHrP Expression induziert, wird von prähypertrophen Chondrozyten exprimiert. IHH inhibiert die Differenzierung hypertropher Chondrozyten und verzögert somit eine Mineralisierung der Knorpelmatrix, ein Effekt der durch PTHrP vermittelt wird. Die negative Rückkopplungsschleife besteht also darin, dass IHH die Expression von PTHrP induziert, welches die Chondrozyten im proliferativen Stadium hält und somit die Produktion von IHH verzögert. L-SOX5 und SOX6 verzögern den Übergang in den prähypertrophen Zustand, sind aber für die Ausbildung der Hypertrophie notwendig, wobei der Mechanismus unverstanden ist. Die Abnahme der Expression früher chondrozytärer Markergene wird mit der nicht mehr nachweisbaren Expression von L-SOX5, SOX6 und SOX9, sowie mit der Expression von transkriptionalen Repressoren erklärt. CBFA1 und RUNX3 nehmen eine Schlüsselrolle bei der Induktion der Prähypertrophie und der Hypertrophie ein. CBFA1^{-/-} Knock-out-Mäuse generieren im Femur keine prähypertrophen Chondrozyten, während sich dieser Prozess in der Tibia nur verzögert. RUNX3^{-/-} Knock-out-Mäuse zeigen eine Verzögerung der endochondralen Ossifikation. CBFA1 ist potentiell ein transkriptionaler Aktivator von Genen, die für die Chondrozytenreifung verantwortlich sind. Es bindet *in vivo* an den Kollagen Typ X Promotor. Darüber hinaus ist CBFA1 in die IHH/PTHrP Rückkopplungsschleife integriert, die in der Wachstumsplatte die Chondrozytenreifung kontrolliert. Beim Übergang zum terminal differenzierten Chondrozyten wird die Expression von Kollagen Typ X herunterreguliert, während Gene für die Matrix-Metalloproteinase 13 (MMP13), Osteopontin und die alkalische Phosphatase hochreguliert werden. Letztere sind auch Marker für Osteoblasten. Wie Osteoblasten produzieren terminal differenzierte Chondrozyten eine mineralisierte Matrix. Obwohl nach wie vor kontrovers diskutiert, wird davon ausgegangen, dass

die meisten dieser Zellen, wenn nicht alle, sich nicht weiter zu endochondralen Osteoblasten entwickeln, sondern apoptotisch werden. Der transkriptionale Aktivator c-MAF (musculoaponeurotic fibrosarcoma AS42 oncogene homologe) ist an der Initiation der terminalen Differenzierung und der Beendigung der Chondrogenese beteiligt. Einer der ersten Schritte während der Gelenkbildung ist die Ausbildung einer Höhle. Dies geschieht, wenn mesenchymale Zellen, die je nach Gelenktyp, zwischen oder in präknorpeligen Kondensationen vorliegen, und die sich zu Prächondrozyten entwickelt haben, dedifferenzieren und apoptotisch werden [203]. Zum gleichen Zeitpunkt differenzieren Prächondrozyten, die die entstandenen Hohlräume umgeben, erst zu frühen und dann zu artikulären Chondroblasten. Am Ende der postnatalen Entwicklung differenzieren diese Zellen zu artikulären Chondrozyten, die sich kaum noch teilen und viel Aggrecan, aber wenig Kollagen Typ II sekretieren. Diese durchlaufen mit Ausnahme von Zellen der vierten Knorpelzone im Bereich der Tidemark, keine Weiterentwicklung zu hypertrophen Chondrozyten [204]. Es wird diskutiert, dass die qualitativen und quantitativen Unterschiede im Genexpressionsprofil von artikulären Chondrozyten und von Chondrozyten der Wachstumsplatten Unterschiede in der Expression und Aktivität spezifischer Transkriptionsfaktoren widerspiegeln, und dass Repressionsmechanismen aktiv sind, die im normalen Knorpel einer Hypertrophie entgegenwirken.

2.4.3.2.3.1 *In vitro* Chondrogenese

Die *in vitro* Chondrogenese mesenchymaler Stamm- und Progenitorzellen erfolgt oftmals in einem dreidimensionalen (3D) *in vitro* Kultursystem in Form von hochdichten Zellaggregaten [205]. Im serumfreien Medium, welches Dexamethason enthält, kann hier mit den Wachstumsfaktoren TGF beta 1 bzw. TGF beta 3 standardmäßig eine chondrogene Entwicklung induziert werden. Dexamethason entfaltet seine chondrogene Wirkung u.a. durch Beteiligung an der Stimulierung des Transkriptionsfaktors SOX9 [206]. Barry konnte zeigen, dass die TGF beta-Isoformen -beta 1, -beta 2 und -beta 3 eine unterschiedlich starke chondrogene Wirkung zeigen [207]. Obwohl humane MSC auf alle drei Isoformen reagierten, zeigte sich bei den Isoformen TGF beta 1 und -beta 3 im Vergleich zu -beta 2 eine frühere und ausgeprägtere Synthese von Kollagen Typ II. TGF beta 1 und TGF beta 3 binden an Endoglin, welches bei der Kontrolle der chondrogenen Differenzierung von MSC und deren Wechselwirkung mit hämatopoetischen Stammzellen von Bedeutung ist. *In vivo* wird TGF beta reichlich im embryonalen Knorpel gebildet und spielt somit eine Rolle bei der chondrogenen Transformation der Zellkondensationen [208].

2.4.3.2.4 Osteogenese

Knochen ist fest gegen Zug, Druck, Biegung und Dehnung. Er gehört zu den härtesten Geweben des menschlichen Körpers und ist wichtigster Bestandteil des Skeletts. Er ist das Stützgewebe des Körpers und sein formgebendes Prinzip basiert auf nicht-zellulären Strukturen, sondern einer organischen Grundsubstanz mit eingelagerten Kalksalzen. Die organische Grundsubstanz aus Proteoglykanen und Glykoproteinen besitzt zahlreiche eingelagerte Kollagenfasern, die zu Fibrillen aggregieren. Die anorganische Knochensubstanz besteht zu 85% aus Kalziumphosphat, 10% aus Kalziumcarbonat und 5% aus Alkali- und Magnesiumsalzen. Wichtige Knochencharakteristika, wie die physikalische Härte und die biologische Plastizität, beruhen auf der Integration von organischen und anorganischen Substanzen. Knochen wird letztlich von drei Zelltypen generiert: Chondrozyten, Osteoblasten und Osteoklasten. Chondrozyten und Osteoblasten sind mesenchymalen Ursprungs, während die Osteoklasten dem hämatopoetischen System zugeordnet werden.

Die Knochenregeneration und -homöostase, werden durch die Knochen aufbauenden Osteoblasten und die Knochen resorbierenden Osteoklasten reguliert. Der Knochenentwicklung erfolgt durch desmale (direkte Knochenbildung) und enchondrale (indirekte Knochenbildung) Ossifikation. Die desmale Ossifikation ist die häufigste Art der Knochenbildung, z.B. entstehen so die perichondralen Knochenmanschetten aller Röhrenknochen, nach diesem Modus wird Knochen auf der Oberfläche von Knorpelresten während der chondralen Ossifikation gebildet, oder erfolgt die Heilung von Knochenbrüchen. Die Entstehung ganzer Knochen durch desmale Ossifikation ist allerdings selten und beschränkt sich auf die Entstehung der Schädelknochen bzw. Teilen davon. Während dieses Vorgangs bilden sich Kondensationen mesenchymaler Stammzellen, die dann direkt in die Knochenmatrix produzierende Osteoblasten differenzieren. Die Osteoblasten beginnen alsbald mit der Kollagen- und Osteoidsynthese und mauern sich damit ein. Aus den Osteoblasten sind Osteozyten geworden. Bei der enchondralen Ossifikation, durch die die Knochen des axialen und des appendikulären Systems, sowie Teile des Gesichtsknochens, gebildet werden, erfolgt zunächst die Bildung eines knorpeligen Primordialskeletts (wie im Kapitel Chondrogenese beschrieben), welches im Rahmen der Osteogenese durch Osteoklasten resorbiert und letztlich durch von Osteoblasten sezernierte Knochenmatrix ersetzt wird. Das Längen- und Dickenwachstum des Knochens und die Bruchheilung erfolgt auf diese Weise. Das Längenwachstum erfolgt bidirektional, wobei kontinuierlich knorpelige Strukturen aufgebaut, resorbiert und durch Knochenmatrix ersetzt werden. Von der Peripherie zum Zentrum des Knochens wird in der Wachstumszone ein Gradient sich differenzierender Chondrozyten ausgebildet. Histologisch

wird zwischen einer Reservezone, einer Proliferationszone, einer Resorptionszone und einer Verknöcherungszone unterschieden. Die Reservezone besteht aus hyalinem Knorpel. Die Chondrozyten zeigen eine sehr geringe Teilungsaktivität. In der Proliferationszone entsteht Säulenknorpel, der durch stark proliferierende Chondrozyten entsteht, die sich in Längsrichtung des Knorpels anordnen. Die Interzellulärsubstanz wird nur noch in geringem Maße gebildet und hat im Vergleich zur Vorzone abgenommen. Blasenknorpel kennzeichnet die Resorptionszone. Hier liegen vergrößerte, glykogenreiche Chondrozyten in erweiterten Knorpelhöhlen und es kommt zur Kalzifizierung des Knorpels, durch Hydroxylapatitkristallbildung. In der Verknöcherungszone gehen die Knorpelzellen zu Grunde und die Knorpelhöhlen werden durch Chondroklasten eröffnet, wodurch Blutkapillaren einsprießen und MSCs in das Gewebe gelangen. Die MSC differenzieren zu Osteoblasten, welche sich auf den Septen der kalzifizierten Knorpelgrundsubstanz absetzen und mit der Bildung von Knochengrundsubstanz beginnen. Somit entsteht trabekulärer Knochen, der in seinem Inneren verkalkten Knorpel und auf der Oberfläche primäres Knochengewebe aufweist. Dieser entstandene Geflechtknochen wird später wieder abgebaut und durch den für das erwachsene Individuum typischen Lamellenknochen ersetzt.

Nach Aubin und Caplan leiten sich die Osteoprogenitorzellen von mesenchymalen Stammzellen ab, die der Ursprung zur Differenzierung einer Reihe von festgelegten und definierten Entwicklungslinien sind [209,210]. Es ist noch nicht völlig geklärt, welche regulatorischen Moleküle die Differenzierung der multipotenten MSC induzieren und kontrollieren. Da das aktuell verfügbare Spektrum an Markern für frühe Differenzierungsstadien begrenzt ist, ist es vor allem schwierig, Aussagen über Präosteoblasten oder noch frühere Entwicklungsstadien zu machen. Vereinfacht lässt sich die osteogene Entwicklung von der Stammzelle bis zum Osteozyten in die Zellstadien mesenchymale Stammzelle, Osteoprogenitorzelle, Präosteoblast, Osteoblast, osteozytischer Osteoblast und Osteozyt unterteilen. MSC sind CBFA1 positiv und *in vitro* positiv für die Marker SH2 (CD105) und ALCAM (CD166), während Osteoprogenitorzellen nur ALCAM positiv sind [211]. Beide Zelltypen zeichnen sich durch eine hohe Zellteilungsaktivität aus. Der Nachweis von alkalischer Phosphatase (ALP) und von Kollagen Typ I in diesen Zellstadien wird in der Literatur unterschiedlich angegeben. Auch die Präosteoblasten können sich weiterhin teilen, sind ALP positiv und synthetisieren Bone Sialoprotein (BSP) sowie Kollagen Typ I. Osteoblasten teilen sich nicht mehr und produzieren alle für die Knochenbildung notwendigen Matrixkomponenten, wie Osteocalzin und BSP, allerdings konnten aus Subpopulationen von Osteoblasten nachgewiesen werden. ALP und der PTH/PTHrP Rezeptor scheinen ubiquitäre *in vivo* Marker dieser Osteoblasten zu

sein, während alle anderen Marker sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene ein Expressionsmuster abhängig von der Subpopulation aufweisen [209]. Dies ist auch deshalb von Interesse, weil die einzelnen Matrixmoleküle eine regulatorische Wirkung auf die Osteogenese haben. Etwa 10-20% der Osteoblasten werden in Osteozyten umgewandelt. Die meisten Osteoblasten (65%) unterliegen nach der Erfüllung ihrer Aufgabe der Apoptose [212]. In Primärkulturen von Osteoblasten, die aus Kalvarien oder trabekulärem Knochen isoliert wurden, exprimieren die Zellen im Verlauf der Osteogenese ALP, Kollagen Typ I und alle nicht-kollagenen Proteine der Knochenmatrix. Darüber hinaus bilden die Zellen unter osteogenen Kulturbedingungen knochenähnliche Knötchen (Nodules) aus. Diese weisen histologisch, ultrastrukturell und immunhistochemisch nachweisbare Merkmale von Geflecht- bzw. embryonalem Knochen auf. Owen hat die Bildung der Nodules untersucht und es zeigte sich, dass diese sich aus den drei sequentiell ablaufenden Phasen Proliferation, Bildung und Reifung der Matrix, sowie Mineralisierung zusammensetzt. Diese drei Phasen unterscheiden sich u.a. in der Expression von den mit der Proliferation und der Osteogenese assoziierten Genen [213]. Die Transkriptionsfaktoren CBFA1 und Osterix gelten als wichtige Schlüsselfaktoren der Osteogenese im Rahmen der desmalen und der enchondralen Ossifikation. CBFA1 wird in Progenitorzellen, Chondrozyten und Osteoblasten exprimiert. CBFA1-/- Knock-out-Mäuse zeigen keine Knochenentwicklung [214,215]. Der Abbruch der Osteogenese erfolgt bereits während der frühen Knochenentwicklung, weil mesenchymale Zellen aus dem Periost bzw. dem Perichondrium nicht in die mineralisierte Knorpelmatrix einwandern können und auch keine Degradation der Matrix durch Osteoklasten erfolgt [215]. Auch eine Überexpression von CBFA1 in Osteoblasten resultiert in einer mangelhaften Knochenbildung [216]. Insgesamt weisen diese Daten darauf hin, dass CBFA1 verschiedene Prozesse der Osteogenese reguliert [217]. CBFA1 wird zum einen durch Phosphorylierung reguliert, interagiert aber mit einer Vielzahl von Transkriptionsfaktoren wie Smad1, -3, -5, Menin, STAT1 (signal transducer and activator of transcription 1) und Twists [218]. Zahlreiche Gene, die von reifen Osteoblasten exprimiert werden, wie Osteocalzin, BSP, Osteopontin und Kollagen Typ I, sind Zielgene von CBFA1 [219]. CBFA1 spielt auch während der Invasion von Blutgefäßen eine Rolle. In Mäusen, die keine CBFA1 Expression zeigen, ist auch keine Invasion in irgendein skelettales Element zu beobachten [220]. Auch eine Expression von VEGF durch hypertrophe Chondrozyten ist dann nicht mehr nachweisbar. Aktuell ist gezeigt worden, dass der transkriptionale Modulator TAZ (transcriptional co-activator with PDZ-binding motif) die CBFA1 abhängige Genexpression co-aktiviert und die PPARgamma-abhängige Genexpression supprimiert [221]. Durch Variation der Expression von TAZ in embryonalen

Fibroblasten der Maus, in mesenchymalen Stammzellen und *in vivo* im Zebrafisch, konnte das Gleichgewicht zwischen Osteogenese und Adipogenese verschoben werden. Dies deutet auf eine regulatorische Funktion von TAZ auf die Osteogenese und allgemeiner auf die Stammzellendifferenzierung hin. Die regulatorische Wirkung von Osterix auf die Osteogenese erfolgt stromabwärts von CBFA1. Wie dieser Faktor die Osteoblastendifferenzierung und Funktion reguliert, ist nicht gänzlich geklärt. In Osterix-/- Knock-out-Mäusen werden von Zellen, die in der Nachbarschaft von Chondrozyten vorliegen, keine Marker reifer Osteoblasten exprimiert, dafür aber Marker von Chondrozyten [222]. Dies legt den Schluss nahe, dass Osterix für die Initiation und den Erhalt der osteogenen Linie wichtig ist. In letzter Zeit hat sich darüber hinaus ein wichtiger Einfluss von beta-Catenin auf die Osteogenese herausgestellt. Beta-Catenin ist ein stromabwärts liegender Mediator des Wnt-Signalweges, in dem ein die Transkription regulierender Komplex (TCL/LEF) aus dem T-Cell Factor (TCL) und dem lymphoid enhancer-binding factor (LEF) formiert wird. Mutationen die das Gen für den Wnt Co-Rezeptor LRP5 (low density lipoprotein receptor-related protein 5) inaktivieren, der für die Aktivierung des Wnt Signalling erforderlich ist, führen zu Osteoporose und anderen Erkrankungen [223]. Studien, in denen die beta-Catenin Expression in verschiedenen Stadien der Osteogenese unterbunden wurde, zeigten einen wichtigen Einfluss auf verschiedene Schritte der Osteogenese [224]. Zahlreiche, nicht für die Osteogenese spezifische, Transkriptionsfaktoren weisen ebenfalls einen Einfluss auf die osteogene Entwicklung auf [218].

2.4.3.2.4.1 *In vitro* Osteogenese

Für die *in vitro* Osteogenese von mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen ist ein Standard Assay beschrieben worden [226,226]. Hier dienen Dexamethason, beta-Glycerophosphat und L-Ascorbinsäure-2-phosphat als stimulierende Faktoren. Dexamethason fördert die MSC-Proliferation und die osteogene Differenzierung [194]. Beta-Glycerophosphat dient als Phosphatquelle, unterstützt somit die Mineralisation und moduliert die Osteoblastenaktivität. Freie Phosphate, vom Beta-Glycerophosphat oder L-Ascorbinsäure-2-phosphat, induzieren die mRNA- und Proteinexpression von osteogenen Markern, wie Osteopontin, und haben einen Effekt auf die Produktion und nuklearen Export von CBFA, ein Schlüsselgen in der Osteogenese [194]. L-Ascorbinsäure-2-phosphat dient während der Kollagensynthese als Co-Faktor zur Hydroxylierung von Prolin und Lysin. Es bewirkt darüber hinaus eine erhöhte Aktivität der Synthese nicht-kollagener Proteine der Knochenmatrix [227].

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Antikörper

3.1.1.1 Antikörper für die Immunhistochemie

Die verschiedenen Antikörper sind in tabellarischer Form im Tabellenverzeichnis zu finden. Der biotinylierte Sekundär-AK für die SV-40-Färbung stammt aus dem MOM-Kit von Vector.

3.1.1.2 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Die für die Durchflusszytometrie genutzten Antikörper sind in tabellarischer Form im Tabellenverzeichnis unter Tabelle 4 zu finden.

3.1.2 Färbelösungen

Alcianblau

10g Alcianblau 8 GX Certistain von Merck wurden in 500ml 3% Essigsäure pH 2,5 gelöst.

Die 3% Essiglösung wurde durch Mischen von 485ml Aqua dest. mit 15ml Eisessig hergestellt.

Giemsa

15ml Giemsafärbelösung von Sigma wurden ad 80ml mit Phosphatpuffer pH 6,88 aufgefüllt.

Der Phosphatpuffer wurde aus 11,13g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ und 8,5g KH_2PO_2 ad 500ml Aqua dest. angesetzt.

Hämatoxylin

50ml Hämatoxylin Solution, Gill No.3 ist Bestandteil des Leukocyte Alkaline Phosphatase-Kit von Sigma.

Sudan III 0,3%

0,03g Sudan III-Pulver von Merck wird in 10ml 70% Alkohol gegeben und 15 min. im Wasserbad bei 60°C erhitzt. Die Lösung wird anschließend filtriert.

3.1.3 Geräte

| | |
|--------------------------------------|---|
| BD FACS Cytomics FC 500 CXP | Becton Dickinson, San Jose, CA, USA |
| CO ₂ Inkubator CB | Binder, Tuttlingen, Deutschland |
| Elektrische Feinwaage AK 160 | Mettler-Toledo GmbH, Giessen, Deutschland |
| Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M | Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland |
| Kryostat LEICA CM3050 S | Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland |
| Lichtmikroskop Wilovert S | Helmet Hund GmbH, Wetzlar, Deutschland |
| Neubauer Zählkammer | Brandt, Ludwigshafen, Deutschland |
| PCR Mastercycler 5330 | Eppendorf, Deutschland |
| Photometer | Eppendorf, Deutschland |
| Sterile Werkbank: Class II type A/B3 | Nuaire, Plymouth, MN, USA |
| Wasserbad | Köttermann GmbH & Co. KG, Uetze/Hänigsen, Deutschland |
| Zentrifuge Allegra™ 25R | Beckman, Palo Alto, CA, USA |

3.1.4 Gewebeproben

Für die Isolierung der Zellen aus humanen Speicheldrüsen wurde Gewebe genutzt, das bei operativen Eingriffen an der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde & plastische Operationen des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, bei Neck Dissection und Parotektomie, entnommen werden konnte. Die Speicheldrüsen selber zeigten keine tumorösen Infiltrate und wurden zur histopathologischen Befundung in das Institut für Pathologie der Universität zu Lübeck, gegeben. Die Patienten waren zwischen 52-75 Jahre alt.

Das murine Gewebe zur Gewinnung von Zellen aus Speicheldrüsen und das in Paraffin eingebettete Gewebe für die Immunhistochemie, stammen aus BalbC-Mäusen. Das Tierversuchsvorhaben wurde vom Ministerium für Natur und Umwelt des Landes Schleswig-Holstein unter der Tierversuchsnummer 33/1/06 genehmigt.

3.1.5 Kits

| | |
|------------------------------------|--|
| Nucleospin RNA II | Macherey und Nagel, Düren, Deutschland |
| Leukocyte Alkaline Phosphatase Kit | Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland |
| Avidin/Biotin-Blocking-Kit | Vector |
| DAB+ | Vector |
| MOM | Vector |

3.1.6 Molekularbiologische Chemikalien

| | |
|-------------------------------------|---|
| 5x DNA-Probenpuffer | 0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylencyanol 15% Glycerin in 50ml H ₂ O |
| 5x TBE-Puffer | 0,45 M Tris/HCL, pH 8, 0 0,45 M Borsäure 0,01 M EDTA |
| 10x Puffer + Magnesium | Roche, Mannheim, Deutschland |
| DTT | Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland |
| First strand 5x Puffer | Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland |
| Marker DNA Leiter, 0,1µg/µl | GIBCO BRL, Schottland |
| Oligo dt 12-18 Primer 0,5µg/µl | Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland |
| PCR Nukleotid-Mix (10mM jedes dNTP) | Roche, Mannheim, Deutschland |
| Polymerase-Puffer 10x | Roche, Mannheim, Deutschland |
| Taq DNA Polymerase 5U/µl | Roche, Mannheim, Deutschland |
| Superscript II | Invotrogen, Karlsruhe, Deutschland |

3.1.7 Primer

Die Primertabelle ist unter Tabelle 5 im Tabellenverzeichnis zu finden.

3.1.8 Reagenzien

| | |
|--|---|
| Aceton | J.T.Baker, Phillipsburg, NJ, USA |
| Anti-Mouse IgGκ / Negative control (FBS) | Compensation Particles Set, BD Biosciences, Deutschland |
| β-Mercaptoethanol | Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland |

| | |
|---|---|
| β -Glycerophosphat | Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland |
| Bovines Serumalbumin | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland |
| Collagenase Typ II | Invitrogen, Eugene, OR, USA |
| Dexamethason (Fortecortin Inject 8mg) | Merk, Deutschland |
| Dispase | Invitrogen, Karlsruhe Deutschland |
| DMEM high glucose | PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich |
| DMSO | Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland |
| Dulbecco's PBS | PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich |
| Ethanol | J.T.Baker, Phillipsburg, NJ, USA |
| FACSFlow™ | Beckton Dickinson, Heidelberg, Deutschland |
| FCS gold, inaktiviert | PAA, Pasching, Österreich |
| FKS, nicht inaktiviert | GIBCO, New York, CT, USA |
| Fluoromount-G | Southern Biotech, Birmingham, Alabama, USA |
| Formaldehyd 37% | Sigma-Aldrich, München, Deutschland |
| Hyaluronidase Typ 1s | Sigma-Aldrich, München, Deutschland |
| IBMX | Sigma-Aldrich, München, Deutschland |
| Indomethacin | Sigma-Aldrich, München, Deutschland |
| Insulin | Sigma-Aldrich, München, Deutschland |
| ITS Plus culture supplement | Beckton Dickinson, Heidelberg, Deutschland |
| L-Ascorbic-2-phosphat | Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland |
| L-Glutamat | Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland |
| LSM 1077 (Lymphocyte Separation Medium) | PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich |
| Methanol | J.T.Baker, Phillipsburg, NJ, USA |
| Natrium-Citrat | Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland |
| Natrium-Chlorid | Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland |
| Nicht-essentielle Aminosäuren (100x) | GIBCO, New York, CT, USA |
| Penicillin-Streptomycin | Biochrom, Deutschland |
| CSA-Protein Block, Serum free | DAKO, Cytomation, Dänemark |

| | |
|--------------------------|---|
| Sodium Pyruvate Solution | PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich |
| TGF- β 3 | R&D-Systems, Deutschland |
| Tris HCL | Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland |
| Tissue-Tek | Sakura, Zoeterwoude, Niederlande |
| Trypanblau | Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland |
| Trypsin-EDTA (1x) | PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich |
| Vectashield | Alexis, Grünberg, Deutschland |
| Wasserstoffperoxis 30% | Fluca |
| Xylol 99,9% | Applichem |

3.1.9 Verbrauchsmaterial

| | |
|--|--|
| BD Falcon™ 5ml Polystyrol Rundbodenröhrchen | BD Biosciences, Bedford, MA, USA |
| BD Falcon™ Zellsieb, 40 μ m, 70 μ m | BD Biosciences, Bedford, MA, USA |
| Chamber Slides | BD Biosciences, Bedford, MA, USA |
| Combitips plus, 2,5ml, 10ml | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Cryomold Intermediate | Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, Niederlande |
| Deckgläser | Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland |
| Eppendorfreaktionsgefäße 0,5ml, 1,5ml, 2 ml | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Kunststoffröhrchen, steril, mit Schraubverschluss, 15 und 50ml | Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland |
| Objektträger Super Frost / Plus | Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland |
| PCR-Tubes, Tube strips | Greiner, Deutschland |
| Pipettenspitzen, 10 μ l (weiß) | Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland |
| Pipettenspitzen, 200 μ l (gelb) | Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland |
| Pipettenspitzen, 1000 μ l (blau) | Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland |
| Röhrchen 15ml, 50ml | Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland |
| Serologische Pipetten, 5ml, 10ml, 25ml | Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland |

| | |
|---|--|
| Skalpell Feather disposalbe Scalpel No22 | feather safety razor Co., Osaka, Japan |
| Tissue Culture Flask, 75 cm ² | Sarstedt, Newton, NC, USA |
| Tissue Culture Flask, 175 cm ² | Sarstedt, Newton, NC, USA |
| Zellkulturschalen 6 cm | Sarstedt, Newton, NC, USA |

3.1.10 Zellkulturmedien

3.1.10.1 Stammzellmedium

500ml Kulturmedium

445ml DMEM high glucose

50ml FCS gold (inaktiviert)

5ml Penicillin-Streptomycin

500ml Grundmedium für die Differenzierung

435ml DMEM high glucose

50ml FKS (nicht inaktiviert)

5ml Penicillin-Streptomycin

5ml L-Glutamat;

5ml MEM

30mg L-Ascorbic-2-phosphat (in 10ml Medium lösen, sterilfiltrieren)

3.1.10.2 Adipozyten-Induktionsmedium

Differenzierungs-Medium Ansatz für 500ml

500ml Grundmedium +

59µl Dexamethasone (1µM Dexamethasone (Stock: 8,46mM) Sigma D-4902)

100µl Insulin (2µM Insulin (Stock: 10mM) Sigma 1-1882)

1ml IBMX (0, 5mM IBMX (Stock: 0, 25mM) Sigma 1-7018)

500µl Indomethacine (200µM Indomethacine (Stock: 200mM) Sigma 1-7378)

3.1.10.3 Adipozyten-Erhaltungsmedium

Erhaltungsmedium Ansatz für 500ml

500ml Grundmedium +

100µl Insulin (2µM Insulin (Stock: 10mM))

3.1.10.4 Osteoblasten-Induktionsmedium

Differenzierungs-Medium Ansatz 500ml

500ml Grundmedium +

5,9µl Dexamethasone (0,1µM Dexamethasone (Stock: 8,46mM))

1,0802g β-Glycerophosphate (10mM β-Glycerophosphate)

3.1.10.5 Chondroyten-Induktionsmedium

Differenzierungs-Medium Ansatz für 500ml

500ml Grundmedium +

5,9µl Dexamethasone (0,1µM Dexamethasone (Stock: 8,46mM))

60,5mg L-Prolin (1mM L-Prolin)

5000µl ITS (1% ITS Plus culture supplement BD 354352)

500µl TGF β3 (10ng/ml TGF β3 (Stock: 2ng/µl))

3.1.10.6 Einfriermedium

100ml Einfriermedium für MSC

50ml DMEM high glucose 4,5mg/l

Sodium pyruvat 110mg/l

L-Glutamin 2mM/l

40ml FCS gold hitzeinaktiviert

10ml DMSO sterilfiltriert

3.2 Methoden

3.2.1 Zellbiologische Methoden

3.2.1.1 Isolierung mesenchymaler Stammzellen aus Speicheldrüsen

Für die Herstellung einer Einzelzellsuspension wurde frisches, kurz zuvor in einer Operation entnommenes Speicheldrüsen­gewebe verwendet. Das Drüsen­gewebe wurde weitgehend von Fett- und Bindegewebe befreit und mit einem Skalpell in einer Petrischale, unter sterilen Bedingungen, zerkleinert. Das zerkleinerte Gewebe wurde in ein 50ml Röhrchen gegeben und anschließend in einer Waschlösung (PBS mit 2mM EGTA) bei 1200 U/min. für 5 min. zentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 10ml Dissectionsmedium (1ml Collagenase (collagenase type 2 Invitrogen 17101-015, 5,01mg/ml) + 1ml Hyaluronidase (Hyaluronidase Sigma H3506, 3,99mg/ml) + 8ml Medium (DMEM high glucose) resuspendiert und für 40 min. bei 37°C im Wasserbad, unter permanentem Schütteln, inkubiert. Die Hyaluronidase spaltet hierbei Hyaluronsäure, Chondroitin- und Mukoitinsulfate, was die Strukturauflockerung von Binde- und Stützgewebe zur Folge hat. Die Collagenase spaltet Peptidbindungen in Kollagenen und bewirkt somit ebenfalls eine Auflockerung der extrazellulären Matrix. Anschließend wurde das Gewebe bei 1200U/min. für 5 min. zentrifugiert. Es folgte eine erneute Inkubation im Wasserbad bei 37°C, diesmal für 60 min., in 20ml Dispersionsmedium (1ml Dispase (Dispase Invitrogen 17105-041, 33,4mg/ml) + 19ml Medium (DMEM high glucose)). Hierbei unterstützt die Dispase die weitere Auflösung des Gewebeverbandes. Die Gewinnung der Einzelzellen erfolgte durch Filtration in einem 70µm-Filter. Das Filtrat wurde dann im Medium (DMEM high glucose) gewaschen und bei 4°C bei 1200 U/min. für 5 min. zentrifugiert. Das Pellet wurde in Medium resuspendiert, es wurde die Zellzahl bestimmt, ein CFU-F-Assay für jede Probe angesetzt und die restlichen Zellen wurden in T175-Flaschen kultiviert.

3.2.1.2 Kultivierung mesenchymaler Stammzellen

Die isolierten Zellen aus der Speicheldrüse wurden in Zellkulturflaschen (175 cm²) angesetzt und bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. In der Zellkultur wurde DMEM (high glucose 4,5mg/l, Sodium pyruvat 110g/l, L-Glutamin 2 mM/l) als Kulturmedium eingesetzt, das mit 10% FCS gold (inaktiviert bei 56°C für 30 Minuten) und 1% Penicillin-Streptomycin versetzt wurde.

Der Zustand der Kultur wurde täglich mikroskopisch überprüft, bei einer 90% Konfluenz wurde die Probe passagiert. Das alte Medium wurde entfernt, die Probe mit 10ml PBS gewaschen und anschließend mit 5ml Trypsin-EDTA, für 5 min. bei 37°C im Brutschrank, inkubiert. Die Trypsinierung wurde durch Zugabe von 10ml Kulturmedium gestoppt und die Zel-

len durch auf- und abpipettieren mit einer 10ml Stabpipette, vereinzelt. Die Zellsuspension wurde in ein 50ml Röhrchen gegeben, welches mit Kulturmedium gefüllt wurde, und bei 1200U/min. für 5 min. zentrifugiert. Das Pellet wurde in 3ml Kulturmedium resuspendiert, je 1ml davon wurde in 19ml Zellkulturmedium gegeben und in eine neue T175-Kulturflasche gegeben. Alle 3-4 Tage erfolgte ein Mediumwechsel. In der 3ten Passage wurden die Zellen, mittels Durchflusszytometrie, untersucht, wofür die Zellen nach der Trypsinierung nicht im Kulturmedium, sondern in PBS mit 2% BSA-Zusatz aufgenommen wurden.

3.2.1.3 Differenzierung mesenchymaler Stammzellen

3.2.1.3.1 Adipogene Differenzierung

Für die Differenzierung wurden die Zellen in einer Dichte von 1000 Zellen/cm² auf zwei-chamber Cover Slides und eine 6 cm Petrischale gebracht. Die Zellen wurden 2-3 Tage mit Grundmedium kultiviert, bis die ersten Zellteilungen sichtbar wurden und eine Konfluenz von 40% bestand. Danach erfolgte die Induktion mit adipogenem Induktionsmedium. Das Induktionsmedium wurde nach 3 Tagen gegen das adipogene Maintenance-Medium gewechselt, welches für 4 Tage auf den Zellen verblieb. Dieser Zyklus wurde insgesamt dreimal wiederholt. Danach erfolgte eine ausschließliche Inkubation der Zellen mit Maintenance-Medium.

Als Nachweis der adipogenen Differenzierung wurde jeweils ein zwei-chamber Cover Slide an Tag 0, 9, 18, und 25 in Doppelbestimmung mit Sudan III gefärbt. Zusätzlich erfolgte ein Nachweis von Genen der Adipogenese (PPAR-gamma, C/EBP, aP2) mittels PCR. Hierfür wurden jeweils an Tag 0, 9, 18 und 25 die differenzierten Zellen einer 6 cm Petrischale genutzt und die RNA der Zellen mit dem Nucleospin RNA II-Kit von Macherey und Nagel isoliert.

3.2.1.3.2 Osteogene Differenzierung

Für diese Differenzierung wurden ebenfalls die Zellen in einer Dichte von 1000 Zellen/cm² auf zwei-chamber Cover Slides und eine 6 cm Petrischale gebracht. Die Zellen wurden 2-3 Tage mit Grundmedium kultiviert, bis die ersten Zellteilungen sichtbar wurden und eine Konfluenz von 40% bestand. Danach erfolgte die Induktion mit osteogenem Differenzierungsmedium. Das Differenzierungsmedium wurde alle 3-4 Tage gewechselt.

Als Nachweis der osteogenen Differenzierung wurde jeweils ein zwei-chamber Cover Slide an Tag 0, 9, 18, und 25 in Doppelbestimmung mit alkalischer Phosphatase, Osteopontin und

Bone Sialoprotein gefärbt. Zusätzlich erfolgte ein Nachweis von Genen der Osteogenese (Osteopontin, Osteocalzin) mittels PCR. Hierfür wurden jeweils an Tag 0, 9, 18 und 25 die differenzierten Zellen einer 6 cm Petrischale genutzt und die RNA der Zellen mit dem Nucleospin RNA II-Kit von Macherey und Nagel isoliert.

3.2.1.3.3 Chondrogene Differenzierung

Für die chondrogene Differenzierung braucht man ausreichend Zellkulturoberfläche zum Abtrypsinieren, da pro MMB 200000 Zellen benötigt wurden. Es wurden mindestens vier MMBs für die RNA-Gewinnung und ein MMB für Gefrierschnitte eingeplant.

Die Zellen wurden in genügend chondrogenem Medium resuspendiert, so dass 200000 Zellen in 0,5ml chondrogenem Medium in ein 15ml Röhrchen überführt werden konnten. Dies wurde bei 500rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Die Zellen lagerten sich daraufhin zu kleinen Kugeln zusammen und wurden in einem 15ml Röhrchen, mit losem Deckel, im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 3 bis 4 Tage.

Die MMBs wurden, entsprechend den anderen Differenzierungen, an den Tagen 0, 9, 18, und 25 aus den 15ml Röhrchen mit einer Pipette entnommen und entsprechend den Anforderungen weiterverarbeitet.

Pro Probestag wurde jeweils ein MMB in ein Cryomold gegeben, luftblasenfrei in TissueteK eingebettet und bei -20°C gelagert. Hiervon wurden anschließend Kryoschnitte gefertigt und Alcianblau und Kollagen II und X gefärbt.

Für die RNA-Gewinnung wurden jeweils vier MMBs in 350µl R1-Puffer des Macherey und Nagel Nucleospin RNA II-Kits gegeben, mit 3,5µl β-Mercaptoethanol versetzt und bei minus 20°C, bis zur Weiterverarbeitung, gelagert.

3.2.1.4 Bestimmung der Zellzahl

Um die Zellzahl zu bestimmen wurden 15µl der zu zählenden Zellsuspension entnommen und mit 15µl Trypanblau vermischt. Von dieser Suspension wurden jeweils 15µl in eine Neubauer-Zählkammer überführt, und die Zellzahl in einem Doppelansatz bestimmt. Durch die Zugabe des Farbstoffes Trypanblau werden ausschließlich tote Zellen angefärbt.

Die Anzahl der lebenden Zellen wurde mit Hilfe folgender Formel bestimmt:

$$\text{Zellen/ml} = \text{durchschnittliche Zellzahl pro Großquadrat} \times 10^4 \times \text{Verdünnung} \times \frac{1}{2}$$

3.2.1.5 CFU-F-Assay

Es wurden bei jeder Probe drei Kulturflaschen (T75) mit jeweils $0,5 \times 10^6$, 1×10^6 und 2×10^6 Zellen angesetzt. Die Kulturen wurden 14 Tage im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert.

Mediumwechsel mit Kulturmedium erfolgte 24 Stunden nach aussäen der Zellen und nachfolgend alle 4 Tage. Nach 14 Tagen wurden die Kulturen angefärbt und ausgewertet.

Das Kulturmedium wurde abgenommen und die Zellen mit PBS gespült. Anschließend erfolgte eine Fixierung der Zellen mit Methanol für 5 min. Die Proben wurden dann luftgetrocknet. Das Anfärben der Zellen erfolgte mit einer Giemsa-Lösung für 5 min. Nachfolgend wurden die Proben dreimal mit destilliertem Wasser behandelt. Die Kolonie bildenden Zellen färbten sich blau-rot an und waren makroskopisch auszuzählen.

3.2.2 FACS-Analyse

Im Jahr 1956 beschrieb Wallace H. Coulter ein Gerät, das elektronisches Zählen und Größenmessungen von in Flüssigkeit suspendierten Zellen erlaubte. Mit diesem ersten „Durchflusszytometer“ war lediglich die Bestimmung eines Parameters, die der Zellgröße, möglich. 1965 beschrieben Louis A. Kamensky, Myron R. Melamed und H. Derman das erste, zwei Parameter detektierendes Gerät, das mittels UV-Licht an ungefärbten Zellen Bestimmungen der Zellgröße und des Kern-DNA-Gehalts vornehmen konnte. Heutige, in der klinischen Diagnostik eingesetzte Durchflusszytometer erlauben die Akquisition einer Vielzahl unterschiedlicher Parameter an jeder einzelnen Zelle bei Analyseraten von 10000 oder mehr Zellen pro Sekunde. Zwei dieser Parameter beruhen auch bei modernen Geräten auf rein physikalischen Eigenschaften der Zellen, die Zellgröße und die innere Struktur (Granularität) der Zelle. Weitere Parameter einer Zelle, wie Oberflächenmoleküle, intrazelluläre Antigene, DNA-Gehalt, pH-Wert etc., können erst nach entsprechender Anfärbung mit Fluoreszenzfarbstoffen bestimmt werden.

Diese multiparametrische Analyse lässt sich grundsätzlich an allen biologischen Zellen durchführen, soweit diese in einer Flüssigkeit suspendiert vorliegen. In einer Zellsuspension enthaltene Zellen werden aus einem Proberöhrchen unter Druck in den Kern einer Mantelflüssigkeit injiziert und durch den Strom der Mantelflüssigkeit hydrodynamisch fokussiert. Die Zellen durchlaufen einzeln und hintereinander die Messkammer, daher stammt der Name Durchflusszytometrie.

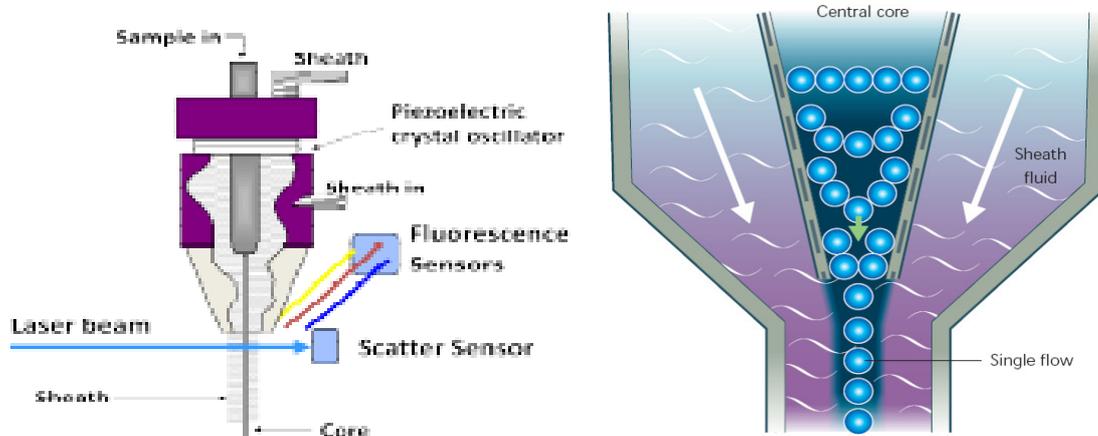


Abbildung 7: Hydrodynamische Fokussierung erzeugt einen Einzelstrom von Partikeln, indem die Zellen durch eine Mantelflüssigkeit vereinzelt und zentriert werden, um einen Laserstrahl nacheinander zu passieren [Quelle: Introduction to Flow Cytometry by Misha Rahman; AbD serotec].

Die linke Abbildung zeigt das Schema einer Flusszelle (engl. flow cell)

Die rechte Abbildung das Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung

Die physikalischen Eigenschaften der Zellen führen zu einer unterschiedlichen Streuung des Lichts. Gemessen wird das Streulicht an zwei unterschiedlichen Stellen; zunächst frontal, fast in Richtung eines ungehindert passierenden Laser-Strahls ($3-10^\circ$; Vorwärtsstreulicht, forward scatter, FSC) und im 90° Winkel zum ursprünglichen Strahl (Seitwärtsstreulicht, side scatter, SSC, Abb. 8).

Der forward scatter wird als indirektes Maß für die Zellgröße betrachtet, während der side scatter maßgeblich von der Granularität der Zelle, wie Membranfaltungen, Vakuolen und Lysosomen, beeinflusst wird. Allein die physikalischen Eigenschaften erlauben eine grobe Einteilung der Leukozyten des peripheren Blutes in lymphozytäre, monozytäre und granulozytäre Zellen.

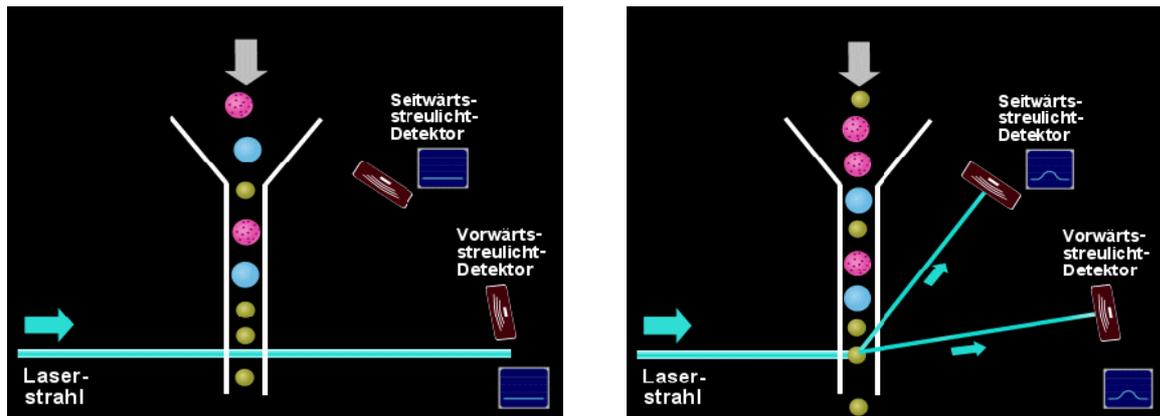


Abbildung 8: Schematische Darstellung von Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht [Quelle: www.med4you.at/.../lbet_durchflusszytometrie.htm].

Trifft der Laserstrahl in der Flusszelle auf keine Zelle, kann er diese ungehindert passieren und es entsteht kein Streulicht (linkes Bild).

Durch eine Zelle entsteht sowohl Vorwärtstreulicht als ein indirektes Maß für die Zellgröße, als auch Seitwärtsstreulicht, was im Wesentlichen durch die Granularität der Zelle beeinflusst wird (rechtes Bild).

Zur Bestimmung weiterer Parameter wie der Detektion spezifischer Oberflächenmoleküle, intrazellulärer Antigene und des DNA-Gehalts müssen Zellen mit monoklonalen Antikörpern beladen werden. Die in der Durchflusszytometrie verwendeten mononukleären Antikörper sind zusätzlich mit einer fluoreszierenden Gruppe, einem Fluorochrom, bestückt (konjugiert, gelabelt) oder können mittels eines weiteren mononukleären Antikörpers (Sekundär-Antikörper), der seinerseits ein Fluorochrom trägt (sekundär oder indirekt konjugiert, gelabelt) mit einem Fluorochrom versehen werden. Die Fluorochrome werden durch den Laserstrahl angeregt und ihre Elektronen auf ein höheres Energieniveau gehoben. Beim Rückfall auf ein niedrigeres Energieniveau wird die überschüssige Energie in Form von Photonen längerer Wellenlänge abgegeben (Emission). Die Energiedifferenz zwischen anregender Wellenlänge (Laser) und der Wellenlänge der emittierten Photonen wird nach dem Physiker und Mathematiker Sir George Gabriel Stokes als Stokes' Shift bezeichnet. Die unterschiedlichen emittierten Wellenlängen, und das durch die physikalischen Eigenschaften der Zelle bedingte Streulicht, werden durch dichroische Filter und Wellenlängen-abhängige Filter aufgetrennt und von spezifischen Photodetektoren registriert, verstärkt und in elektronische Signale umgewandelt (Abbildung 9).

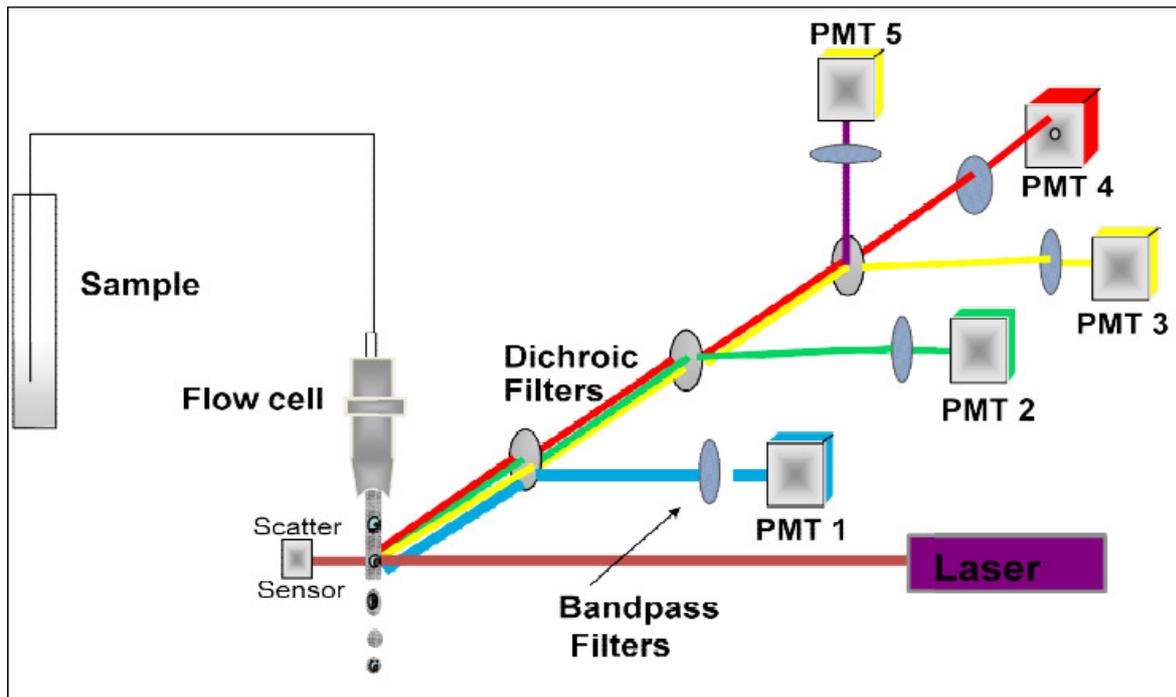


Abbildung 9: Schema des optischen Detektionssystems eines Durchflusszytometers [Quelle: www.who.edu/science/B/Olsonlab/Fig.1.jpg]. Emittierte Photonen werden durch dichroische Spiegel und Schmalband- (bandpass-) Filtern (FL) getrennt und zu Photomultipliern (PMT) geleitet.

Die Intensitäten der Signale werden der Größe nach in 1024 Kanäle verteilt und entweder eindimensional als Häufigkeitsverteilung oder zweidimensional als Zell- oder Punktwolken dargestellt. Ein Punkt stellt dabei eine Zelle mit ihren gemessenen physikalischen Eigenschaften und entsprechend der Anzahl der verwendeten Fluorochrome, mit ihren jeweiligen spektralen Eigenschaften, dar. Zur Analyse bestimmter Zelleigenschaften verwendet man eigens erstellte Protokolle, die die zu analysierenden Parameter in sogenannten Histogrammen (im Verhältnis zueinander) wiedergeben. Untergruppen von Messereignissen, die sich durch bestimmte physikalische oder spektrale Eigenschaften definieren, können gesondert mittels des sogenannten Gatings analysiert werden. Die gesamten Daten einer einzelnen Messung, in Form einer Listmode gespeichert, sind so einer probenunabhängigen Reanalyse zugänglich. Moderne, in der klinischen Diagnostik eingesetzte Durchflusszytometer verfügen häufig über vier Laser (z.B. Argon, Krypton, Helium-Cadmium, Helium-Neon Laser). Der am häufigsten verwandte Laser ist der Argon-Laser mit einer Anregungs-Wellenlänge von 488nm. Mit dem Argon-Laser werden die sehr häufig gelabelten Fluorochrome Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE) angeregt. FITC emittiert grünes Licht mit Wellenlängen von 525nm, während Phycoerythrin orangefarbenes Licht mit Wellenlängen von 575nm emittiert (Abbildung 5).

Aufgrund der Unterschiede im Wellenlängen-Spektrum können die von den Fluorochromen emittierten Lichtquanten getrennt voneinander detektiert werden. Anteilig werden jedoch Lichtquanten mit der Wellenlänge des jeweilig anderen Fluorochroms emittiert, wobei FITC deutlich mehr Photonen im PE-Spektrum abgibt, als umgekehrt (Abbildung 10).

| <i>Probe</i> | | <i>Excitation</i> | | <i>Emission</i> |
|---------------------------------|--------|---|--------|---|
| FITC | 488 nm |  | 525 nm |  |
| PE | 488 nm |  | 575 nm |  |
| APC | 630 nm |  | 650 nm |  |
| PerCP™ | 488 nm |  | 680 nm |  |
| Cascade Blue | 360 nm |  | 450 nm |  |
| Coumerin-Phalloidin | 350 nm |  | 450 nm |  |
| Texas Red™ | 610 nm |  | 630 nm |  |
| Tetramethylrhodamine-amines | 550 nm |  | 575 nm |  |
| CY-3 (indotrimethinecyanines) | 540 nm |  | 575 nm |  |
| CY-5 (indopentamethinecyanines) | 640 nm |  | 670 nm |  |

Abbildung 10: Auswahl in der Durchflusszytometrie eingesetzter Fluorochrome [Quelle: www.umt.edu]. Die Fluorochrome werden durch Licht bestimmter Wellenlänge angeregt (Excitation). Beim Rückfall auf ein niedrigeres Energieniveau werden Lichtquanten mit längerer Wellenlänge emittiert (Emission) und vom Detektionsapparat des Durchflusszytometers registriert.

Aufgrund der Überschneidung spektraler Eigenschaften müssen Messungen bestimmter Parameter, die an ein bestimmtes Fluorochrom gekoppelt sind, bereinigt werden. Dazu wird das von einem anderen, in benachbarter Wellenlänge emittierendem Fluorochrom, ausgehende zusätzliche Signal vom zu detektierenden Fluorochrom-Signal elektronisch subtrahiert. Diesen Vorgang bezeichnet man als Kompensation. Grundsätzlich gilt, je „entfernter“ das Wellenlängen-Spektrum von zwei oder mehreren emittierenden Fluorochromen ist, desto weniger Kompensation ist erforderlich. Je mehr das Wellenlängen-Spektrum eines Fluorochroms mit dem jeweils anderen überlappt, desto mehr muss kompensiert werden, was die Sensitivität

für schwächere Signale des betroffenen Fluorochroms senkt. In diesem Fall kann nicht eindeutig beurteilt werden, ob die Zellen, z.B. bei einer zweiparametrischen Messung mit FITC und PE, grünes oder rotes Licht emittieren. Durch die eingestellte Kompensation werden diese nicht eindeutig zuzuordnenden Fluoreszenz-Signale (und im Ergebnis die dieses Signal emittierenden Zellen) aus der Analyse ausgeschlossen.

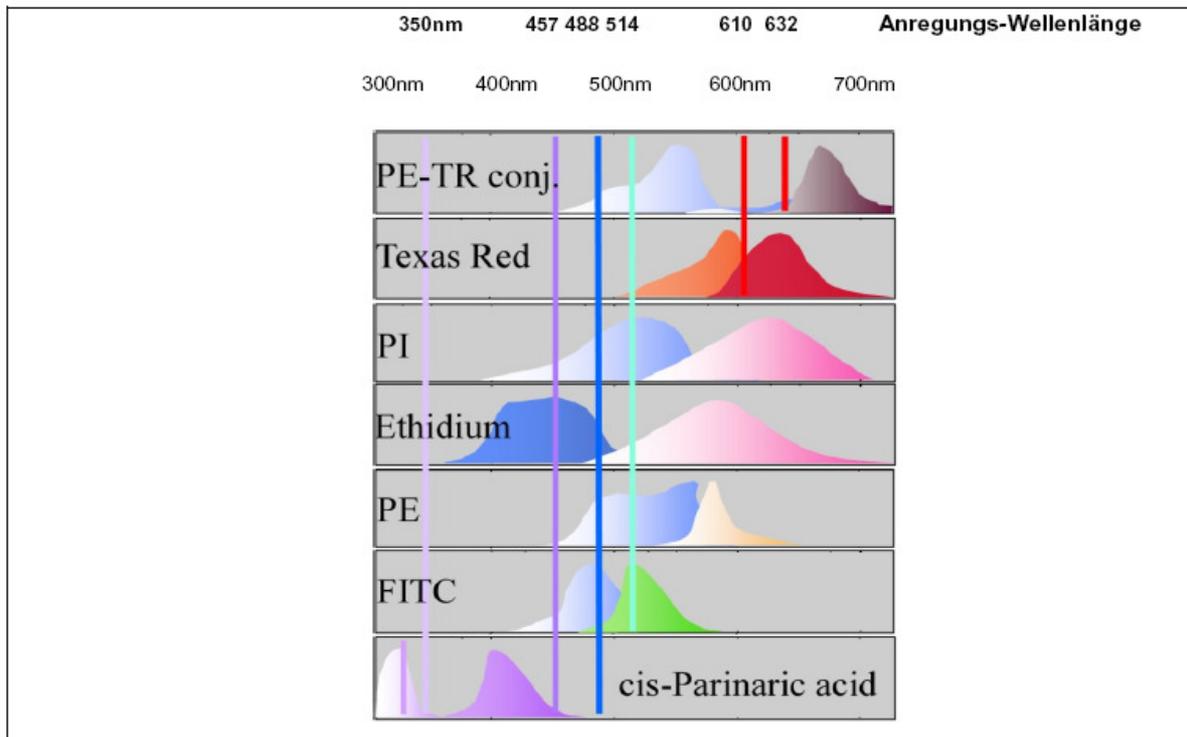


Abbildung 11: Absorptionsspektren (im Hintergrund) und Emissionsspektren (im Vordergrund) gängiger, in der Durchflusszytometrie eingesetzter Fluorochrome [Quelle: dvsscience.com/technical.html]. Die vertikalen Linien stellen die Exzitationswellenlängen (auch obere Zahlenreihe) der am häufigsten verwendeten Laser in der Durchflusszytometrie dar. Die blaue Linie symbolisiert den Argon-Laser, der die Fluorochrome Fluorescein (FITC) und Phycoerythrin anregt. Man beachte die Überlappung der von FITC emittierten Lichtquanten mit dem Spektrum von PE abgegebenen Photonen.

Oberflächenantigene und cytoplasmatische Proteine (Enzyme, Onkogene) können durch Antikörper erkannt werden. Die für die Durchflusszytometrie angebotenen Antikörper sind monoklonal, d.h. sie sind Immunglobuline eines Isotyps (IgG1, IgG 2a, IgG 2b oder IgM), die sich gegen ein bestimmtes Antigen richten. Ein Großteil der spezifischen Antikörper ist im Cluster of Differentiation zusammengefasst. Unter einer Cluster-Nummer sind alle Antikörper zusammengefasst, die das gleiche Antigen erkennen. Sie können aber unterschiedliche Epitope erkennen, was bei der Auswahl der Antikörper berücksichtigt werden muss, da die Nachweisempfindlichkeit von einem Antikörper-Epitop zum anderen variieren kann. Beim Messen einer Probe ist der kritische Punkt das korrekte Setzen der Statistikregionen im

Histogramm. In der Durchflusszytometrie eingesetzte Antikörper binden nicht nur spezifisch an die Fa/b-Regionen der Zielzellen, sondern gehen auch unspezifische Regionen mit Fc-Rezeptoren ein. Um diese unspezifischen Bindungen in der Auswertung zu subtrahieren, werden Negativkontrollen mitgeführt. Dabei werden die Zellen mit dem isotypischen Immunglobulin der gleichen Tierspezies inkubiert und in gleicher Weise wie die Messprobe der spezifischen Antikörper behandelt. Der mitzuführende Immunglobulintyp ist in der Regel im Datenblatt des jeweiligen spezifischen Antikörpers genannt. Bei Doppelfärbungen ist eine Negativkontrolle, bestehend aus beiden in den jeweiligen Datenblättern genannten Immunglobulinen, gelabelt mit dem entsprechenden Fluorochrom, mitzuführen. Bei der indirekten Fluoreszenz (der spezifische Antikörper wird ungelabelt eingesetzt und in einem weiteren Inkubationsschritt mittels eines gegen seine Fc-Region gerichteten, mit einem Farbstoff konjugierten Sekundär-Antikörpers detektierbar gemacht) wird eine ungelabelte isotypische Negativkontrolle mitgeführt, die ebenfalls im zweiten Inkubationsschritt konjugiert wird. Mit Hilfe dieser Isotyp-Kontrollen werden die Statistikregionen so gesetzt, dass 98% der Fluoreszenz-Signale durch die Statistikregion ausgegrenzt werden. Bei der nachfolgenden Messung mit dem oder den spezifischen mononukleären Antikörper werden die Statistikregionen beibehalten. Die Zellen, mit denen der Antikörper nur unspezifisch reagiert, werden so von der Messung ausgeschlossen.

3.2.2.1 Phänotypisierung von MSC mittels Durchflusszytometrie

Die MSC besitzt kein für sie charakteristisches Antigen, sondern trägt eine Reihe von Antigenen, die auch auf anderen Zellen exprimiert werden. Erst durch die Kombination verschiedener Antigene entsteht ein für die mesenchymale Stammzelle charakteristischer Phänotyp. Bisher gibt es kein einheitliches, standardisiertes Antikörper-Profil zur Charakterisierung mesenchymaler Stammzellen. Vielmehr wird eine Vielzahl von unterschiedlichen Antikörper-Kombinationen benutzt. Zur routinemäßigen Charakterisierung von mesenchymalen Stammzellen nach der dritten, fünften und gegebenenfalls zehnten Passage wurde hier ein eigens angefertigtes Protokoll, bestehend aus 14 unterschiedlichen Antikörpern verwendet. Das Antikörperprofil bestand aus den Antigenen: CD13, CD29, CD34, CD44, CD45, CD54, CD73, CD90, CD105, CD106, CD140b, CD166, CD271 und Stro-1. Mit Ausnahme der Bestimmung von CD34 und CD45 zum Ausschluss von hämatopoetischen Stammzellen wurden die Messungen in 1-Farb-Fluoreszenz durchgeführt. Abgesehen von CD45 und Stro-1 (FITC-konjugiert) sind alle verwendeten Antikörper PE-konjugiert. CD34 und CD45 wurden mit 2-Farb-Fluoreszenz gemessen, nachdem die Fluoreszenz-Signale der Fluorochrome gegenein-

ander kompensiert wurden. Bis auf CD105 waren alle Antikörper mit dem jeweiligen Fluorochrom direkt konjugiert. Für alle PE-gelabelten Antikörper wurde ein PE-konjugierter anti-mouse IgG1-Antikörper als Isotyp-Kontrolle mitgeführt; entsprechend wurde für CD34-FITC und CD105 (unkonjugiert) ein FITC-gelabelter und ein unkonjugierter IgG1-Antikörper mitgeführt, der im weiteren Verlauf mit einem gelabelten Sekundär-Antikörper konjugiert wurde. Eine Konzentrations-Anpassung der Antikörper war nicht erforderlich.

Nach dem Trypsinieren der Zellen, wurden diese zweimal mit FACS-Puffer (PBS + 1 BSA + 0,1% NaN₃) gewaschen und nach Neubauer-Zählung in einer Konzentration von 1 x 10⁶ Zellen/ml resuspendiert. Jeweils 100 µl der Zellsuspension wurden mit 10 µl des jeweiligen mouse-antihuman-Antikörpers oder 10 µl der jeweiligen mouse-anti-human Isotyp-Kontrolle für 15 min. bei 4°C inkubiert. CD34 und CD45 Antikörper wurden zusammen mit 100 µl der Zellsuspension unter gleichen Bedingungen inkubiert.

Nach der Inkubation wurden überschüssige Antikörper durch einen Waschschrift entfernt. Hierfür wurde FACS-Puffer auf die Probe gegeben und danach bei Raumtemperatur für 10 min. bei 300 g zentrifugiert. Anschließend kam der Sekundär-Antikörper zu CD105 und dessen Isotyp-Kontrolle wurde der Probe zugeführt. Es erfolgte ein weiterer Inkubationsschritt für 15 min. bei 4°C. Danach wurden überschüssige Sekundär-Antikörper durch einen erneuten Waschschrift entfernt.

Proben mit konjugierten Antikörpern wurden gleich nach dem ersten Waschschrift mit FACS-Puffer auf 500 µl aufgefüllt. Entsprechend wurde die Probe mit dem unkonjugierten Antikörper nach dem zweiten Waschschrift behandelt.

Vor der Messung wurden die Zellen, durch Scheren mittels einer 21g Kanüle, vereinzelt.

Alle Phänotypisierungen wurden an den Durchflusszytometern EPICS XL MCL und Cytomics FC 500 der Firma Beckman-Coulter (Krefeld, Deutschland) durchgeführt. Beide Geräte sind mit einem Argonlaser mit einer Wellenlänge von 488nm ausgestattet. Das Cytomics FC 500 hat zusätzlich einen Helium-Neon Laser mit einer Anregungs-Wellenlänge von 633nm, der wahlweise zugeschaltet werden kann. Für die Phänotypisierung wurde ein Protokoll mit einem Forward (y-Achse) und side scatter (x-Achse) Zweiparameter-Diagramm und einem Einzelparameter-Histogramm für die Fluoreszenz-Intensität des jeweiligen Antikörpers erstellt (FL 2). Für die zweiparametrische CD34/CD45 Detektion wurde dieses Protokoll um ein FL 1 (Band-pass Filter oder Kanal für die Detektion von grünem Licht; 525±5nm; x-Achse) und FL 2 (Band-pass Filter oder „Kanal“ für die Detektion von orangem Licht 575±5nm; y-Achse) Zweiparameter-Diagramm erweitert. Zusätzlich wurde ein Einzelpara-

meter-Histogramm für den FL 1 Kanal zur Detektion der Intensität des FITC-Fluoreszenz Farbstoffs eingefügt. Mittels Gating im forward scatter/side scatter Diagramm wurden Subpopulationen einer eigenen Analyse zugeführt bzw. Zelltrümmer vom Messvorgang ausgeschlossen. Listmode-Dateien wurden mit System II Version 2.1 oder Cytomics CXP Software (Beckman-Coulter) akquiriert und ausgewertet. Alle Messungen wurden bei mittlerem Probendruck (Durchflussgeschwindigkeit) durchgeführt und mindestens 10000 Zellen pro Probe gemessen.

3.2.2.2 Zellzahlbestimmung von mesenchymalen Stammzellen mit Hilfe von Flow-count™ Fluorespheres

Flow-Count™ Fluorespheres ist ein Reagenz, das zur absoluten und direkten Zellzahlbestimmung von Lymphozyten, Lymphozyten-Subpopulationen oder CD34 positiven Zellen am Durchflusszytometer entwickelt wurde. Der Vorteil dieser Methode gegenüber den gewöhnlichen, im hämatologischen Labor eingesetzten Zählgeräten, ist die zeitgleiche Immunphänotypisierung anhand spezifischer Oberflächen-Antigene. Dementsprechend ist es möglich, die Anzahl von Zellen in einer MSC-Kultur zu ermitteln und gleichzeitig die Expression von einigen ausgewählten Markern zu kontrollieren; bei Bedarf kann die ermittelte Gesamtzellzahl auf die Zellzahl der für ein spezifisches Antigen positiven Zellen korrigiert werden. Die Methode basiert auf der Präparation gleicher Volumina der zu bestimmenden Probe (100 µl) und einer bekannten Konzentration von Flow-Count™ Fluorespheres in einem genau identischen Volumen (100 µl). Die Gesamtzellzahl lässt sich aufgrund des Verhältnisses von Probe zu den Fluorespheres anhand folgenden Dreisatzes bestimmen:

$$\text{Absolute Zellzahl (Zellen/}\mu\text{l)} = \frac{\text{(Gemessene Zellzahl der Probe/gemessene Anzahl der Fluorespheres)}}{\text{Konzentration der zugegebenen Fluorespheres}}$$

Die hier verwendete Durchflusszytometer-Software Cytomics CXP ist in der Lage die absolute Zellzahl automatisch zu ermitteln, wenn die jeweilige Konzentration oder der sogenannte CAL Faktor der Fluorespheres bekannt ist. Die Konzentration und der Cal-Faktor jeder Fluorespheres Charge wird vom Hersteller in wiederholten Untersuchungen ermittelt und dem Benutzer mitgeteilt. Bei den Fluorespheres selber handelt es sich um 10 µm große polystyrene-

ne Kügelchen, die mit einem Fluorochrom beladen sind und Photonen im Wellenlängenbereich von 525nm–700nm emittieren, wenn sie durch einen Argon-Laser bei einer Wellenlänge von 488nm angeregt werden. Das Cytomics 500 FC Durchflusszytometer besitzt fünf-Band-Pass-Filter, die Licht mit Wellenlängen von 525nm (FL 1), 575nm (FL 2), 620nm (FL 3), 675nm (FL 4) und 755nm (FL 5) zu fünf unterschiedlichen Photomultipliern kanalisieren. Aufgrund des großen Emissionsspektrums werden die Flow-Count™ Fluorespheres im FL 1, FL 2, FL 3 und FL 4 Kanal detektiert. Deshalb müssen die Flow-Count Fluorespheres sorgfältig mittels Gating von den zu messenden Zellen selektiert werden, um eine gleichzeitige Immunphänotypisierung durchführen zu können. Zu diesem Zweck sind in einem zweiparametrischen Histogramm (Dot-Plot) der FL 4 Detektionskanal (x-Achse) gegenüber dem Forward scatter (y-Achse) aufgetragen worden, und die Fluorespheres wurden in einer Leerprobe selektiert. Den Fluorespheres entsprechenden Punktereignissen im Histogramm wurde eine Region mit der Bezeichnung CAL 1000 zugeordnet, welche die Software bei jeder Messung als Referenzwert für die Zellzahlbestimmung zugrunde legt.

Weiterhin wurden dem Protokoll für die Zellzahlbestimmung ein Dot-Plot mit forward scatter (y-Achse) und side scatter (x-Achse), ein Dot-Plot für die Detektion der Antikörper für die Immunphänotypisierung (FL 1: CD44 FITC (x-Achse); FL 2: CD29 PE (y-Achse)) und Einparameter-Histogramme für jeden der beiden Antikörper zugefügt. Zusätzlich wurden Kontroll-Dotplots mit den Detektionskanälen für die Antikörper (x-Achse) und dem forward scatter erstellt, um das Verhältnis zu den Fluorespheres beurteilen zu können.

In jedem dieser Plots sind die Microbeads durch ein Gate gesondert ausgewiesen. CD29 (PE-konjugiert) und CD44 (FITC-konjugiert) sind als Marker für die Immunphänotypisierung ausgewählt worden, weil sie in allen Subpopulationen von MSC hinsichtlich der Fluoreszenzintensität zu mehr als 95% über der der Isotyp-Kontrolle lagen. Durch Gating im forward / side scatter Dot-Plot wurden alle MSC-Subpopulationen in die Messung einbezogen, auch die, die sich in dem Bereich befanden, der gewöhnlich aufgrund des gehäuften Vorkommens von Zelltrümmern von Messungen ausgeschlossen werden. Die Software ist in der Lage neben der absoluten Zellzahl aller gemessener Ereignisse mit Hilfe des CD29/CD44-Markierung und CD29/CD44 Dot-Plots die absolute Zellzahl für nicht markierte, nur für einem Marker als positiv detektierte und für beide Marker als positiv detektierte Zellen zu ermitteln. Dementsprechend konnte die absolute Zellzahl bei Abweichungen der absoluten Zellzahl aller Ereignisse von der absoluten Zellzahl doppelt positiv markierter Zellen korrigiert werden. Alle Zellzahlbestimmungen sind an einem Durchflusszytometer Cytomics FC 500 mit Cytomics CXP bei mittlerem Probedruck durchgeführt worden.

Nach dem Trypsinieren der Zellen, wurden diese zweimal mit FACS-Puffer (PBS + 1% BSA + 0,1%NaN₃) gewaschen. Jeweils 200µl der Zellsuspension wurden mit 10µl CD29 PE und CD44 FITC konjugierten Antikörpern und entsprechenden Isotyp-Kontrollen für 15 min. bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden überschüssige Antikörper durch einen Waschschritt (10 min., RT, 300g) entfernt. 100µl der Zellsuspension wurden entnommen, mit FACS-Puffer auf 400µl aufgefüllt und anschließend mit einer 21G Kanüle geschert und somit die Zellen vereinzelt. Es wurden 100µl Flow-Count™ Fluorespheres hinzugegeben und vorsichtig mit der Probe vermischt.

Vor der Messung wurde die werksseitig angegebene Konzentration (oder der angegebene CAL Faktor) von Flow-Count™ Fluorespheres eingegeben. Es mussten mindestens 1000 Fluorespheres detektiert werden, bevor die Software, aufgrund oben genannter Formel, die absolute Zellzahl berechnen konnte.

3.2.2.3 Durchflusszytometrische Zellgrößenbestimmung

Für die Bestimmung der Zellgröße von MSC-Subpopulationen (n=7) wurden vier unterschiedliche Microbeads mit bekannten Durchmesser (7, 10, 15 und 20µm) verwendet. Die Verstärker (gain) und die Voltzahl der Photomultiplier am Cytomics FC 500 wurden so eingestellt, dass der forward scatter peak für die 20µm Microbeads bei ungefähr 650 der gemessenen Intensität bei linearer Auftragung und der side scatter peak für die 7 µm Microbeads bei ungefähr 450 auftrat. Benutzt man diese Richtwerte entstehen im forward scatter vier peaks für die vier unterschiedlich großen Microbeads. Zur Kalibrierung im side scatter nimmt man nur die 7 und 10µm beads und enthält dementsprechend 2 Peaks. Durch die Mitte (den Mittelwert) der Peaks legt man mittels Gating vertikale, den Mittelwert der gemessenen Ereignisse im Histogramm repräsentierende Linien. In vier unabhängigen Versuchen wurden die so ermittelten Werte in eine Tabelle übertragen, daraus wiederum Intensitäts-Mittelwerte ermittelt, und diese Mittelwerte in ein forward/side scatter Dot Plot übertragen. Anhand der übertragenen Linien entstehen im Dot Plot fünfzehn Felder, mittels derer man die ungefähre Zellgröße der Suspensionzellen abschätzen kann (Abbildung 13).

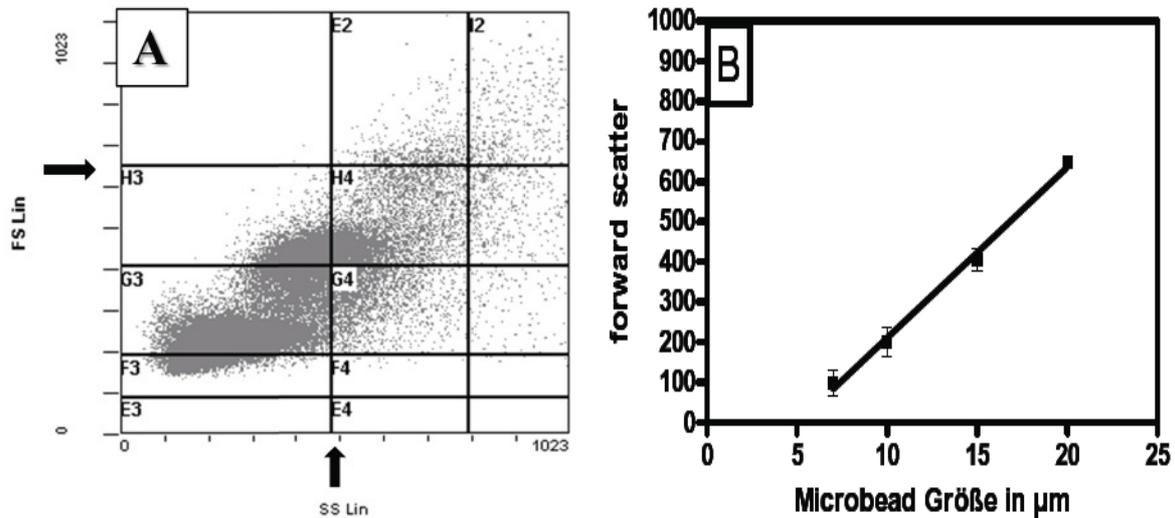


Abbildung 12: Assay für die Bestimmung der ungefähren Zellgröße von suspendierten mesenchymalen Stammzellen.

Bild A zeigt MSC einer dritten Passage, die auf Eck-Gel in einer Konzentration von 1×10^5 ausgesät und für 10 Tage im Brutschrank inkubiert wurden. Die Pfeile markieren die im forward scatter für die $20 \mu\text{m}$ Microbeads bei ungefähr 650 anhand von Mittelwerten standardisierte Orientierungslinie, und die im side scatter für $7 \mu\text{m}$ Microbeads eingerichtete Orientierungslinie bei ungefähr 450.

Bild B zeigt die Kalibrations-Kurve, bestehend aus Mittelwerten der in vier unabhängigen Versuchen detektierten Microbeads Signale im forward scatter. Mit Hilfe der errechneten Mittelwerte konnten die horizontalen Linien für den forward scatter im Bild A eingefügt werden. Entsprechend wurden die vertikalen Linien für den side scatter ermittelt.

Nach dem Trypsinieren der Zellen, wurden diese zweimal mit FACS-Puffer (PBS + 1% BSA + 0,1% NaN_3) gewaschen und nach Neubauer-Zählung in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml resuspendiert. Jeweils $100 \mu\text{l}$ der Zellsuspension wurden, ohne Zugabe von Antikörpern, auf Basis ihrer physikalischen Eigenschaften, durchflusszytometrisch analysiert.

3.2.2.4 Durchflusszytometrische Bestimmung der Stro-1- und Alkalischen Phosphatase-Expression

MSC lassen sich in Zellen mit einem osteoblastären Phänotyp differenzieren. Kennzeichnend dafür ist vor der Differenzierung die Expression von STRO-1 und während der Differenzierung die Expression von alkalischer Phosphatase (ALP). Dementsprechend wurde ein durchflusszytometrisches Protokoll zur Detektion der beiden Parameter entwickelt. Für die Detektion von STRO-1 wurde ein unkonjugierter Antikörper eingesetzt. Durch einen zweiten Inkubationsschritt mit einem FITC gelabelten Sekundär-Antikörper wurde die STRO-1 Expression visualisiert. Für die Detektion von ALP wurde ein Allophycocyanin- (APC) konjugierter Antikörper eingesetzt. Für die Detektion von APC musste der Helium-Neon-Laser mit einer Anregungswellenlänge von 633nm zusätzlich aktiviert werden (Abbildung. 14). Aufgrund der Emissionsspektren der eingesetzten Farbstoffe war nahezu keine Kompensati-

on notwendig. Das Protokoll besteht neben dem forward/side-scatter Dot-Plot aus einem FL 1 (Detektion von FITC, x-Achse) und einem FL 4 (Detektion von APC, y-Achse) Dot-Plot und zwei ein-parametrischen Histogrammen für die eingesetzten Farbstoffe (FL 1, FL 4).

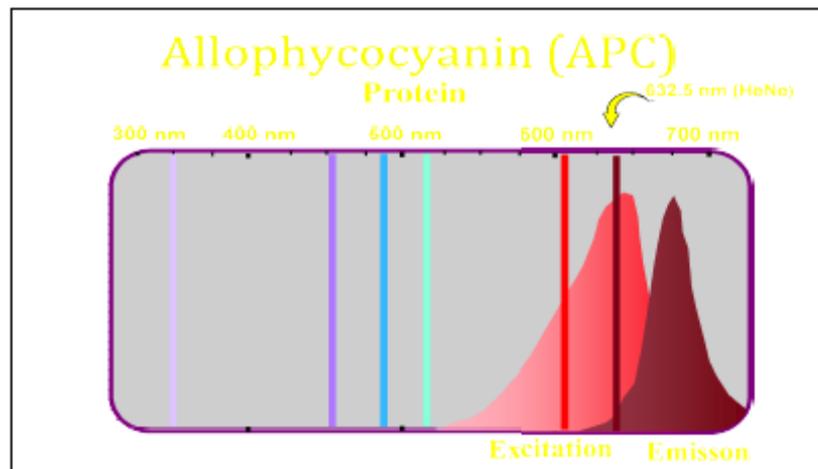


Abbildung 13: Anregungs-(Excitation) und Emissions-Wellenlängen-Spektrum von Allophycocyanin (APC) [Quelle: dvsscience.com/technical.html].

Für die Anregungs-Wellenlänge von 633nm muss beim Cytomics FC 500 der Helium-Neon Laser zusätzlich aktiviert werden.

Der STRO-1 Antikörper wurde in einer Konzentration von 0,1 mg/ml in Wasser gelöst und mit 0,1% NaN₃ zusätzlich konserviert. Die mesenchymalen trypsinisierten Stammzellen wurden zweifach mit FACS-Puffer (PBS + 1% BSA + 0,1% NaN₃) gewaschen und in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml resuspendiert.

Um die Fc-Rezeptoren von MSCs zu besetzen, wurden die Zellen mit 1 µg/ml eines humanen IgG1 Antikörpers für 15 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand wurde nach 10 min. Zentrifugation bei RT und 300g entfernt. Anschließend wurden die Zellen in 100µl FACS-Puffer resuspendiert und mit 10µl des unkonjugierten STRO-1-Antikörpers für 30 min. bei 4°C inkubiert. Es folgten zwei Waschschrte (10 min., RT, 300g), danach wurden jeweils 10µl eines FITC-konjugierten, goat anti-mouse IgM Sekundär-Antikörpers und 10µl des Anti-ALP APC-gelabelten Antikörpers auf die Proben gegeben und es folgte eine 30 min. Inkubation, bei 4°C in der Dunkelheit. Als Isotypkontrolle wurde ein unkonjugierter mouse anti-human IgG1 und ein APC-„gelabelter“ mouse anti-human IgG1-Antikörper mitgeführt. Die unkonjugierte Isotypkontrolle wurde ebenfalls mittels des oben genannten Sekundär-Antikörpers visualisiert. Vor der Messung wurden die Proben gewaschen (10 min., RT, 300g) und mit FACS-Puffer auf 500µl aufgefüllt.

3.2.3 Histologische und Immunhistologische Färbungen

3.2.3.1 Histologische Färbetechniken

3.2.3.1.1 Alkalische Phosphatase

Zur semi-quantitativen Analyse der alkalischen Phosphatase (ALP) in osteogen differenzierten Zellen wurde das Leukocyte Alkaline Phosphatase Kit von Sigma genutzt.

Die ALP gehört zu der Gruppe der katalytischen Enzyme der Matrixkalzifizierung des Knochens. Sie gilt als klassischer Marker der osteoblastären Kaskade bzw. der Knochenneubildung. Das Prinzip dieser Färbung beruht auf der Abspaltung von AS-BI aus AS-BI-Phosphat in Gegenwart von alkalischer Phosphatase und der anschließenden Bindung von AS-BI an Diazoniumsalz, welches dann als blauviolett pigment sichtbar wird.

Jeweils an Tag 0, 9, 18 und 25 wurde ein Cover Slide in Doppelbestimmung angefärbt. Als Negativkontrolle wurden Zellen verwendet, die nicht mit osteogenem Differenzierungsmedium kultiviert wurden.

Die Zellen auf den Cover Slides wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 400µl für 30 sec. fixiert. Die Fixierungslösung bestand aus 2,5ml Citratlösung, 6,5ml Aceton und 0,8ml 37% Formaldehyd (haltbar bei 4°C).

Anschließend wurden die Zellen dreimal mit Aqua dest. gewaschen und mit 400µl Naphtol-Färbelösung für 15 min. im Dunkeln inkubiert. Die Färbelösung wurde jeweils frisch angesetzt, wobei 125µl Natrium Nitrit Lösung mit 125µl FRV Alkaline Solution vermischt wurden und für 2 min. bei Raumtemperatur inkubierten. Danach wurden 5,63ml Aqua dest. und 125µl Naphtol AS-BI Alkaline Solution hinzu gegeben.

Die Proben mussten danach für 2 min. mit Aqua dest. gewaschen werden und die Kerne wurden für 10 sec. mit Hämatoxylin gegengefärbt. Es erfolgte Bläuen mit Leitungswasser und anschließendes Spülen mit Aqua dest. Danach wurden Chamber und Silikon von den Objektträgern entfernt, die Präparate mit Vectashield eingedeckt und anschließend mikroskopisch beurteilt.

3.2.3.1.2 Alcianblau

Alcianblau 8 GX ist ein wasserlöslicher Phthalocyaninfarbstoff, der zum selektiven Nachweis von sauren Mukosubstanzen (Glucosaminoglykane) dient. Es handelt sich hierbei um eine undifferenzierte Methode, da sowohl Glucosaminoglykane mit einer Karboxyl-, als auch die mit einer Sulfatgruppe leuchtendblau angefärbt werden. Zellkerne werden von dem Farbstoff nicht angefärbt, eine Kernfärbung erfolgte mit DAPI.

Die Kryoschnitte der MMBs (20µm) wurden nach dem Schneiden luftgetrocknet, bei -20°C gelagert und anschließend in einer Glasküvette zweimal mit PBS gewaschen und für 30 min. mit 3,7% Formaldehyd fixiert. Es folgte ein dreimaliger Waschschrift mit PBS, danach wurden die Schnitte bei Raumtemperatur über Nacht gefärbt. Die Verteilung des Farbstoffes aus der Küvette erfolgte durch Kapillarwirkung zwischen zwei Objektträgern.

Die Proben wurden dreimal mit PBS gewaschen und mit Vectashield eingedeckt. Das Deckglas wurde mit Nagellack fixiert, um ein Austrocknen der Schnitte zu vermeiden. Bei Bedarf erfolgte eine Kernfärbung mit DAPI (1µg/ml 1:1000).

3.2.3.1.3 Sudan III

Sudan III ist ein Nachweis für die adipogene Differenzierung. Der Farbstoff wird in Alkohol gelöst, da er schlecht wasserlöslich ist. Es handelt sich um eine rein physikalische Färbung, in der der Farbstoff aus einem guten Lösungsmittel (Alkohol) in ein besseres (Lipoide, Lipide) diffundiert.

Das Kultivierungsmedium wurde vorsichtig von den Zellen entfernt. Es erfolgte ein dreimaliger Waschschrift mit PBS, danach wurde der Farbstoff auf die Zellen gegeben und mikroskopisch beobachtet, wann die Zellen ausreichend angefärbt waren. Die Präparate wurden mit PBS gewaschen, Chamber und Silikon mit Spezialwerkzeug entfernt und mit Vectashield eingedeckt.

3.2.3.2 Immunhistochemische Färbungen

3.2.3.2.1 Osteopontin

Osteopontin (OPN) ist ein Glykoprotein, das zu den nicht-kollagenen Komponenten des Osteoids des Knochens gehört und in den Prozess der Matrixkalzifizierung eingebunden ist.

Die Färbung erfolgte an osteogen differenzierten Zellen in zwei-Chamber Cover Slides jeweils an Tag 0, 9, 18 und 25 in Doppelbestimmung. Hierfür wurden die Zellen vom Medium befreit, zweimal mit PBS gewaschen und anschließend Methanol:Aceton (7:10) fixiert. Das Fixierungsmittel wurde mindestens 20 min. bei -20°C vorgekühlt und verblieb für 5 min. auf den Zellen. Danach erfolgte ein dreimaliges Waschen der Zellen mit PBS und ein Blockierungsschritt mit 7,5% BSA in PBS bei Raumtemperatur für 30 min. Pro Chamber wurden 300µl Primärantikörper genutzt (Osteopontin (MPIII10) von DSHB 1:20) und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Es folgten vier Waschschriffe mit PBS, dann erfolgte eine einstündige Inkubation bei 37°C mit dem zweiten Antikörper. Hierbei handelte es sich um einen FITC-

AK, Kaninchen-Anti-Maus IgG von DAKO 1:200 verdünnt. Zusätzlich wurde die Antikörperlösung mit 1µg/ml DAPI (1:1000) versetzt. Anschließend wurde die Probe viermal mit PBS gewaschen, das Chamber und Silikon mit einem Spezialwerkzeug entfernt und mit Vectashield eingedeckelt.

3.2.3.2.2 Bone Sialoprotein

Bone Sialoprotein (BSP) ist ein nicht-kollagenes Protein in Knochen und anderen mineralisierten Geweben. Es wird exprimiert während der initialen Mineralisierung und während de novo Knochenformation.

Die Färbung erfolgte unter den gleichen Konditionen wie bei Osteopontin mit dem Primärantikörper von DSHB (WVID1(9C5)-s) in einer Verdünnung von 1:20.

Die Auswertung der Schnitte erfolgte an einem Fluorescencemikroskop Axioskop von Zeiss.

3.2.3.2.3 Kollagen

Die MMBs wurden mit Collagen II (II-II6B3 von DSHB 1:50) und Collagen X (X-AC9 von DSHB 1:50) gefärbt.

Die geschnittenen MMBs der Parotisproben wurden hierfür in eine Küvette mit PBS gestellt, anschließend mit eiskaltem Methanol:Aceton (7:10) für 5 Minuten fixiert und dann dreimal mit PBS gewaschen. Ein Blockieren der Schnitte erfolgte mit 7,5% BSA für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Der Primärantikörper wurde 1:50 in 2ml PBS verdünnt und für 1 Stunde bei 37°C in die Küvette gegeben. Das Benetzen der Schnitte erfolgte durch Kapillarwirkung zwischen den Schnitten. Es erfolgten vier Waschschrte, danach folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper, ebenfalls für 1 Stunde bei 37°C. Der FITC gelabelte Antikörper wurde hierfür 1:200 verdünnt. Der Antikörperlösung wurde ebenfalls DAPI in einer Verdünnung 1:1000 zugesetzt. Die Objektträger wurden mit PBS gewaschen und mit Vectashield eingedeckelt.

Die Kryoschnitte der Submandibularis-MMBs wurden anders behandelt. Sie wurden für 20 Minuten mit eiskaltem Methanol fixiert und anschließend für 10 Minuten bei Raumtemperatur in PBS rehydriert. Der Proteinblock erfolgte mit CSA von DAKO für 5 Minuten, dieser wurde abgekippt und die Schnitte mit den gleichen Antikörpern wie bei den Parotisproben, für 1 Stunde bei Raumtemperatur, inkubiert. Es folgten drei Waschschrte. Der Sekundärantikörper war hier HRP gelabelt (Envision G-2 von DAKO). Die Inkubation erfolgte eine

Stunde bei Raumtemperatur, die Schnitte wurden gewaschen und die Zellkerne wurden anschließend mit Hämatoxylin gegengefärbt.

3.2.3.2.4 SV-40-Färbung

Die Paraffinschnitte der verschiedenen Mausgewebe wurden 30 min. in 100% Xylol entparaffinisiert. Anschließend wurden die Schnitte jeweils 5 min. in 100% Ethanol, 96% Ethanol und 70% Ethanol und Aqua dest. rehydriert.

Die Antigendemaskierung erfolgte durch 20 min. Kochen in 0,01 M Citratpuffer pH 6,0 in der Mikrowelle. Anschließend kühlten die Schnitte 10 min. ab und wurden 3-mal für 5 min. in 1xTris-NaCl-Puffer pH 7,5 gewaschen.

In 7,5% Wasserstoffperoxid wurde die endogene Peroxidase blockiert. Hierbei waren 10 min. ausreichend. Die Schnitte wurden danach unter fließendem Leitungswasser gewässert.

Jeweils für 10 min. wurde unspezifisches Avidin bzw. Biotin mit dem Avidin/Biotin-Kit von Vector blockiert. Nach 2-maligem Waschen im Tris-Puffer erfolgte ein 1 stündiges Blockieren der Schnitte mit dem MOM-Mouse-Ig.

Anschließend wurden die Schnitte 2-mal in Tris-Puffer gewaschen und mit einem speziellen Serum-Block aus dem MOM-Kit behandelt. Dieser wurde nach 5 min. Inkubation abgekippt und die Schnitte wurden anschließend 1 h bei RT mit dem primären SV-40-AK inkubiert.

Es erfolgten 2 weitere Waschschrte im Tris-Puffer und eine 10 min. Inkubation der Schnitte bei RT mit dem biotinylierten sekundären Antikörper aus dem MOM-Kit.

Nach 2x5 min. Waschen wurden die Schnitte für 5 min. mit dem ABC-Komplex aus dem MOM-Kit behandelt. Es folgten weitere 2 Waschschrte und eine anschließende Chromogenentwicklung mit dem DAB+-Kit von Vector für 3 min.

Die Schnitte wurden für 10 min. gewässert, dann für 10 sek. in Hämatoxylin gegengefärbt und wieder 10 min. unter fließendem Leitungswasser gewässert.

Danach wurden die Schnitte eingedeckt.

3.2.4 Molekularbiologische Methoden

3.2.4.1 RT-PCR

Die Polymerasekettenreaktion dient der Amplifizierung eines spezifischen Genabschnitts. Für einen Nachweis auf RNA-Ebene wird die aus den Zellen isolierte RNA mittels einer reversen Transcriptase in DNA umgeschrieben, der sogenannten cDNA (copyDNA), und anschließend in die PCR-Reaktion eingesetzt.

Mit dem Nucleospin RNA II-Kit von Macherey und Nagel wurde die Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert (nach Herstellerangaben) und die Ausbeute anschließend photometrisch bestimmt. Hierfür wurden 2µl RNA in 98µl RNase freies Wasser gegeben und die Absorption sowohl bei 260nm als auch bei 280nm Wellenlänge gemessen. Bei einer Wellenlänge von 260nm wird die Absorption von Nukleinsäuren bestimmt, bei 280nm die Absorption von Proteinen. Der Quotient daraus gibt somit ein Maß für die Reinheit der RNA an. Eine Verunreinigung mit Proteinen führt zu einem niedrigen Quotienten, während ein Quotient zwischen 1,4 und 1,8 das Ergebnis einer ausreichend reinen RNA anzeigt. Um die Konzentration der RNA zu bestimmen, wird der Absorptionwert bei 260nm mit dem Verdünnungsfaktor (hier 50) und dem Faktor 40 multipliziert. Als Ergebnis erhält man die RNA-Konzentration in µg/ml.

Die cDNA-Synthese wurde folgendermaßen, auf Eis, durchgeführt. 500ng jeder RNA-Probe wurde in ein 0,5ml Tube gegeben und auf 11µl mit PCR-Wasser aufgefüllt. 1µl Oligo dt wurde hinzugegeben, die Probe an zentrifugiert und bei 70°C für 10 min. inkubiert. Während dessen wurde der Mastermix, bestehend aus 4µl first strans Puffer, 2µl 0,1 M DTT und 1 µl dNTP (10mM) pro Probe angesetzt. Jeder Probe wurde 7µl Mastermix zugeführt und anschließend für 2 min. bei 42°C inkubiert. Die Transkription der Proben wurde durch Zugabe von 1µl Superskript RT II gestartet und erfolgte bei 42°C für 50 min. Durch 5 min. Inkubieren bei 95°C wurde die Reaktion gestoppt, und die Proben konnten bei -20°C gelagert werden.

Für die Amplifizierung der spezifischen Genabschnitte wurden folgende Substanzen genutzt: Zwei spezifische Primer, dNTPs, Taq-Polymerase, 10xPuffer, RNase-freies Wasser und die cDNA. Bei den Primern handelte es sich um DNA-Oligonukleotide, die eine komplementäre Sequenz zum 5'- bzw. 3'-Ende des Zielgens aufwiesen. Durch 2 min. Erhitzen der cDNA-Proben bei 95°C wurde der DNA-Doppelstrang denaturiert und in Einzelstränge aufgetrennt. Dies ermöglichte den Primern, bei ihrer spezifischen Temperatur (siehe Primertabelle), sich komplementär an den DNA-Einzelstrang anzulagern (Annealing). Die DNA-Polymerase konnte sich daraufhin an den Komplex binden und mit der Zweitstrangsynthese beginnen

(Elongation). Dieses Enzym stammt aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*, ist hitzestabil und benötigt, um seine gesamte Aktivität zu entfalten, Mg^{2+} als Kofaktor. Das Temperaturoptimum der Polymerase liegt bei $72^{\circ}C$, bei dieser Temperatur wurden die dNTPs, als Bausteine für die Zweitstrangsynthese, an den entsprechenden Stellen, eingebaut. Die dNTPs bestehen aus den Purinnukleotiden dATP und dGTP, sowie aus den Pyrimidinnukleotiden dTTP und dCTP.

Ein Ansatz für die PCR sah folgendermaßen aus:

- | | | |
|--------------|---------------------|-----------------|
| 1) Mastermix | PCR- H_2O | 15,45 μ l |
| | Puffer | 2,5 μ l |
| | $MgCl_2$ | 1,8 μ l |
| | dNTP (10mM) | 1 μ l |
| | Primer (10 μ M) | je 1,25 μ l |
| | Taq-Polymerase | je 0,25 μ l |
- 2) Je 0,75 μ l (Monolayer) bzw. 1,5 μ l (MMB) cDNA zugeben
 3) Die Proben mischen, abzentrifugieren und in den Thermocycler stellen.

Das PCR-Programm bestand aus den Schritten:

Denaturierung: $95^{\circ}C$, 2 min.

$95^{\circ}C$, 40 sec.

Annealing: variable Temperatur, 40 sec.

Elongation: $72^{\circ}C$, 40 sec.

$72^{\circ}C$, 8 min.

Die Amplifikation erfolgte bei allen PCRs in 35 Zyklen, während die Annealingtemperaturen (siehe Primertabelle) je nach Primerzusammenstellung variierte. Die Annealingtemperatur ist hierbei abhängig von der Länge der Primer und deren G-C-Basengehalt. Die PCR-Proben wurden auf $4^{\circ}C$ gekühlt und konnten so gelagert werden. Zur Größenbestimmung der PCR-Produkte wurde der 25 μ l-Ansatz mit 5 μ l loading buffer versetzt und davon wurden jeweils 15 μ l auf ein 2% Agarosegel aufgetragen. Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine einfache und effektive Methode, DNA-Fragmente von 0,5 bis 25kb Länge voneinander zu trennen und zu identifizieren. Dabei bewegen sich die negativ geladenen DNA-Moleküle in der Matrix des Gels mit einer Geschwindigkeit, die umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Größe ist, zur Anode. Sichtbar gemacht werden die DNA-Fragmente im Gel durch Zugabe des Farbstoffes Ethidiumbromid in die bereits geschmolzene Agarose. Nach Interkalation in die DNA-Moleküle fluoresziert Ethidiumbromid unter UV-Licht. Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente variiert man die Agarosekonzentration zwischen 0,5% und 2%. Große

DNA-Fragmente lassen sich in niedrig konzentrierten Gelen (Endkonzentration ca. 0,5%) gut auftrennen, für kleinere Fragmente eignen sich höher konzentrierte Agarose-Gele. Als Laufpuffer wurde 1xTBE-Puffer verwendet, in dem auch die Agarose angesetzt und durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst wurde. Nach dem Abkühlen auf ca. 50°C wurde das Ethidiumbromid (10mg/ml Ethidiumbromidlösung) zugegeben. Das erkaltete Gel wurde mit 1xTBE-Puffer überschichtet und die DNA-Proben konnten in die Slots gegeben werden. Das Gel wurde mit einer Feldstärke von 5-10 Volt/cm gefahren, bis eine ausreichende Bandentrennung erreicht war. Zur Abschätzung der Lauflänge dienten die beiden Farbstoffe im DNA-Probenpuffer (Bromphenolblau und Xylencyanol). Zur Größenbestimmung der PCR-Produkte wurde eine 1kb DNA-Leiter mitgeführt. Nach erfolgter Auftrennung konnte das Gel unter UV-Licht betrachtet und fotografiert werden.

4 Ergebnisse

4.1 Mesenchymale Stammzellen aus der Speicheldrüse

4.1.1 Isolierung humaner MSC

Zur Klärung der Frage, ob humane mesenchymale Stammzellen aus Speicheldrüsen isoliert werden können, wurden jeweils zehn Gewebeproben der Glandula parotidea und der Glandula submandibularis verwendet und direkt nach Entnahme der Gewebeprobe eine Einzelzellsuspension hergestellt.

Zur Etablierung einer reproduzierbaren Methode für die *in vitro* Kultivierung und Expansion primärer humaner MSC, diente als Grundlage ein Protokoll, welches auf ein von Haynesworth publiziertes Verfahren zurückzuführen ist [230]. Hierbei wird vom Prinzip der selektiven Adhärenz Gebrauch gemacht, d.h. der Tatsache, dass mesenchymale Stammzellen auf Zellkulturoberflächen adhären, während der überwiegende Teil der nicht-mesenchymalen Zellen nicht anhaftet und während der alle 2-3 Tage erfolgenden Medienwechsel langsam ausgewaschen werden. Die anhaftenden MSC begannen nach initialer Adhärenz zu proliferieren. Ein Merkmal zur Beurteilung der Kulturen war deren morphologisches Erscheinungsbild. Bereits in der Morphologie zeigten Zellen aus der Glandula parotidea und der Glandula submandibularis Unterschiede. Alle Zellen zeigten anfangs eine spindelförmig fibroblastoide Zellform. Insgesamt war eine sehr homogene Primärkultur zu beobachten. Während der Subkultivierung über mehrere Passagen war allerdings eine morphologische Veränderung der Zellen aus der Glandula submandibularis zu beobachten. Die Zellen wurden voluminöser und großflächiger. Neben dem Parameter der Morphologie, wurde von jeder Probe ein CFU-F-Assay angefertigt, die durchflusszytometrische Analyse von charakteristischen Zelloberflächenmarkern durchgeführt, sowie von jeweils fünf Proben das multipotente Differenzierungspotential (osteogene, adipogene und chondrogene Entwicklung) ermittelt.

4.1.2 Kulturverlauf humaner MSC

24 h nach Isolierung der Zellen erfolgte der erste Mediumwechsel. Bereits zu diesem Zeitpunkt, oftmals aber auch erst nach einer Woche, waren in den Kulturen lichtmikroskopisch erste adhärente mesenchymale Stammzellen zu erkennen. Diese lagen als individuelle, spindelförmig fibroblastoide Zellen vor. Daneben waren noch nicht adhärente runde Zellen zu erkennen, die bei jedem erneuten Mediumwechsel langsam ausgewaschen wurden. Es dauerte etwa 14-21 Tage bis die Zellen in einer T175-Zellkulturflasche eine Konfluenz von 90% erreicht hatten. Eine Passagierung der Zellen erfolgte jeweils bei 90% Konfluenz. Die Split-

tung wurde im Verhältnis 1:3 vorgenommen. Bis in die fünfte Passage dauerte es in der Regel 4-5 Tage bis eine Konfluenz von 90% erreicht wurde. Dieser Zeitraum erhöhte sich in höheren Passagen auf mehr als eine Woche. Die Zellen aus den Gewebeproben der Glandula parotidea behielten ihr fibroblastoides Erscheinungsbild, während die Zellen aus der Glandula submandibularis ab der dritten Passage, ein breiteres, flächigeres Aussehen annahmen.

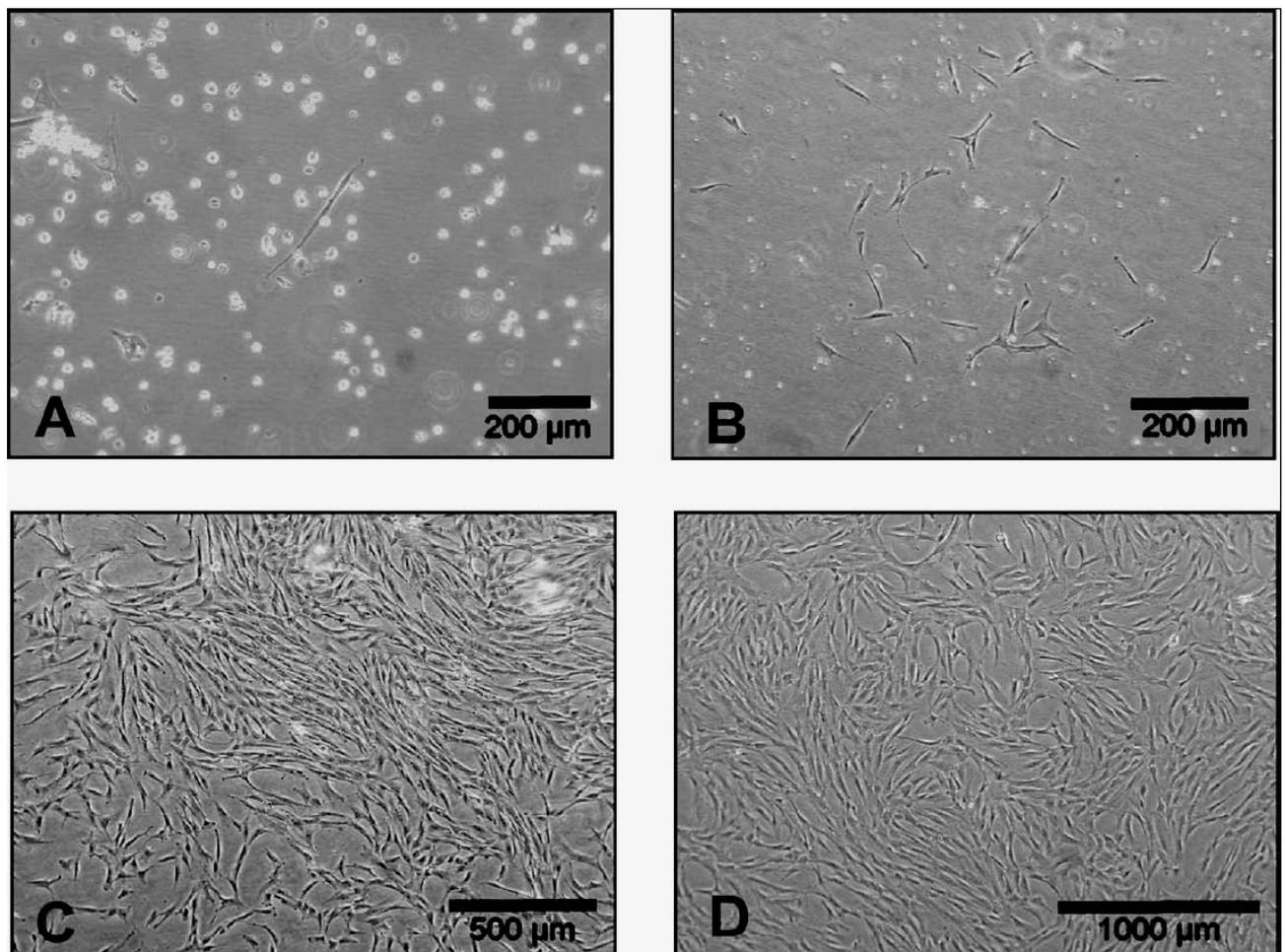


Abbildung 14: Primärzellkultur aus humanen Speicheldrüsen.

A: Es sind nach 4 Tagen Kultivierung der Zellen wenige fibroblastoide Zellen (putative MSC) und einige kleine runde Zellen (Erythrozyten) zu erkennen.

B: Nach 7 Tagen in Kultur sind fast nur noch fibroblastoide Zellen zu erkennen. Die Erythrozyten sind fast komplett aus der Kultur ausgewaschen.

C: Durch 14tägige Kultivierung sind nur noch mesenchymale Stammzellen in der Kultur vorhanden.

D: Nach 21 Tagen haben die MSCs einen Rasen in der Zellkulturflasche gebildet.

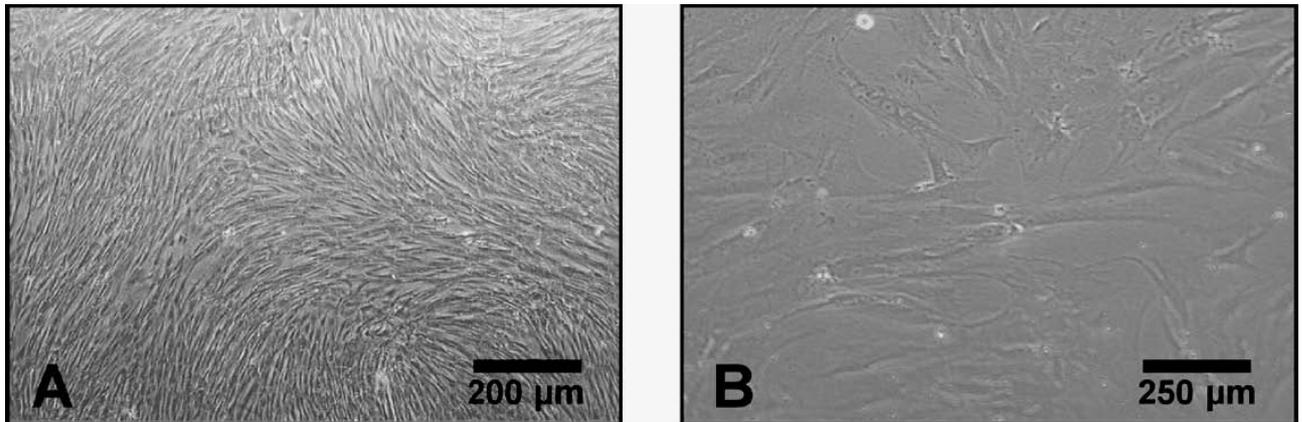


Abbildung 15: Humane MSCs aus der Speicheldrüse in der 3. Passage

A: Die Zellen aus der humanen Glandula parotidea zeigen eine fibroblastoide Morphologie.

B: Die Zellen aus der humanen Glandula submandibularis zeigen, im Gegensatz zu denen aus der Glandula parotidea, eine große flächige voluminöse Morphologie.

4.1.3 Fibroblast colony-forming unit-assay

Neben morphologischen Kriterien wurde die Kapazität der Kolonie bildenden Einheiten der Zellen aus dem Speicheldrüsengewebe getestet. Nach Entfernen des Fett- und Bindegewebes aus der Speicheldrüse konnte aus 1 g Speicheldrüsengewebe ca. $5,2 \pm 0,8 \times 10^6$ Zellen isoliert werden. Hierbei sind keine signifikanten Unterschiede zwischen Glandula parotidea und Glandula submandibularis festgestellt worden. Ebenso verhielten sich die Speicheldrüsen im CFU-F-Assay identisch. Die Anzahl der kolonie-bildenden-Einheiten betrug im Durchschnitt 160 ± 9 in $0,5 \times 10^6$ Zellen, was einer Frequenz von 0,03% entspricht.

4.1.4 Präsentation von Oberflächenmarkern

Zur immunophänotypischen Charakterisierung wurden die aus den Speicheldrüsen gewonnenen Zellen, von jeweils zehn Proben der Glandula parotidea und zehn Proben der Glandula submandibularis, durchflusszytometrisch untersucht. Hierfür wurden die Zellen routinemäßig in der dritten, fünften und zehnten Passage auf die Expression der Antigene CD13, CD29, CD34, CD44, CD45, CD54, CD73, CD90, CD105, CD106, CD140b, CD166 und Stro-1 untersucht. Dieses Expressionsmuster beinhaltet putative mesenchymale Stammzellmarker und die hämatopoetischen Stammzellmarker CD34 und CD45.

Die Antigene CD34 und CD45 wurden zur Abgrenzung zu hämatopoetischen Stammzellen bestimmt. Sie waren in allen untersuchten Proben und in allen Passagen negativ.

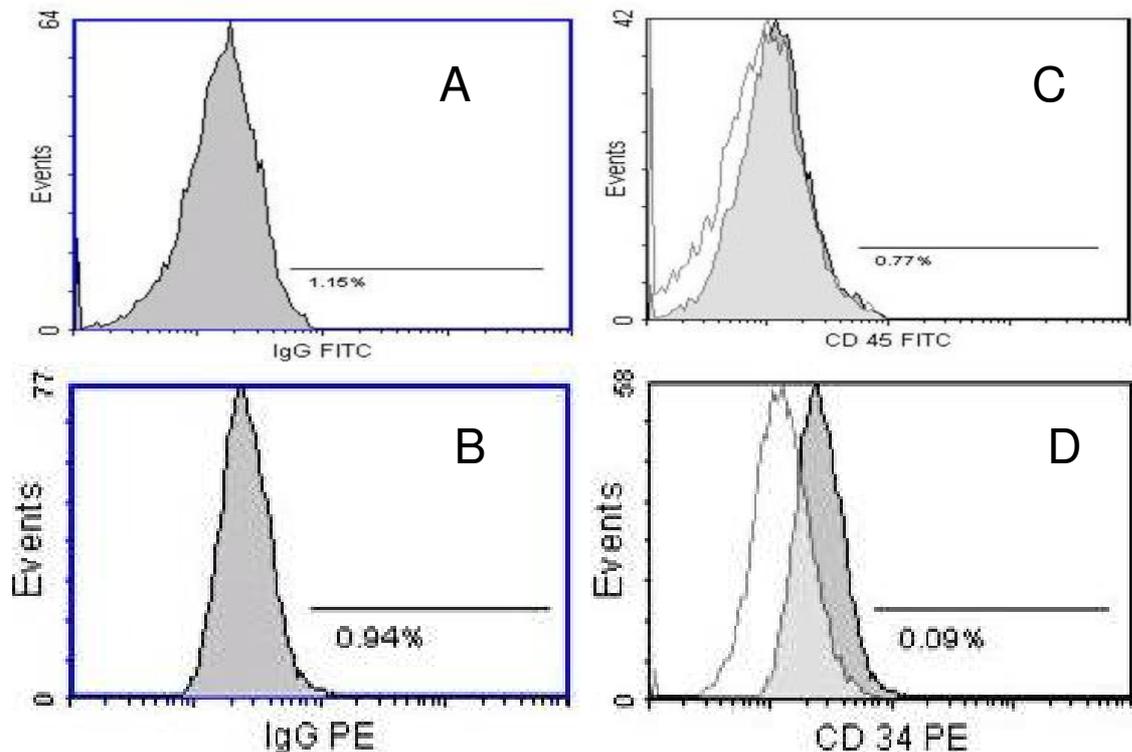


Abbildung 16: Durchflusszytometrische Untersuchung von isolierten Stammzellen aus der Speicheldrüse. Die hämatopoetischen Stammzellmarker CD34 (PE) und CD45 (FITC) sind negativ, was dafür spricht, dass es sich bei den Zellen um mesenchymale Stammzellen handelt.

A-B: Isotypkontrolle

C-D: Repräsentative Probe der isolierten Zellen aus der Speicheldrüse (grau) CD34 bzw. CD45 markiert gegen die jeweilige Isotypkontrolle (weiß) aufgetragen.

Die Zellen waren stark positiv für CD13, CD29, CD44, CD73 und CD90. Eine positive, aber variable Expression von CD54, CD140b und CD166 konnte festgestellt werden. CD105 konnte auf Zellen der Parotisproben in allen Passagen und Proben gleichstark, auf Zellen der Submandibularisproben hingegen uneinheitlich innerhalb der Passagen, festgestellt werden. CD106 konnte in keiner Probe detektiert werden. Das Expressionsniveau von CD54 war innerhalb der Proben einheitlich, nahm aber im Laufe der Passagierung der Zellen ab. Hierbei konnte eine Expression von 87% in den frühen Passagen beobachtet werden, während in Passage zehn nur noch 52% der Zellen CD54-positiv waren. CD140b konnte in den Parotisproben in allen Passagen homogen um die 80% nachgewiesen werden, während die Expression in den Submandibularisproben sehr unterschiedlich war. Hier schwankte der Anteil der CD140b-positiven-Zellen zwischen 42-95%. Diese Schwankungen traten in allen Passagen auf. In den Parotisproben war eine einheitliche Expression von CD166 nachweisbar, während die Submandibularisproben eine Expressionsvarianz aufzeigten. Einige Proben besaßen lediglich einen 40%igen Anteil CD166-positiver-Zellen, während die Zellen anderer Proben zu 85% CD166 positiv waren. Diese Varianz zeigte sich in allen Passagen.

Stro-1 war nur in geringem Maße (11%) oder gar nicht in der dritten Passage nachweisbar, woraufhin von jeweils fünf Parotis- und Submandibularisproben die Zellen der ersten und zweiten Passage durch FACS-Analyse in Kombination mit der ALP-Expression, untersucht wurden. In den frühen Passagen konnte eine höhere Expression von Stro-1 nachgewiesen werden, welche aber stetig abnahm, je mehr ALP auf der Zelloberfläche exprimiert wurde. Es konnten keine Unterschiede in der Stro1-Expression zwischen Parotis- und Submandibularisproben festgestellt werden.

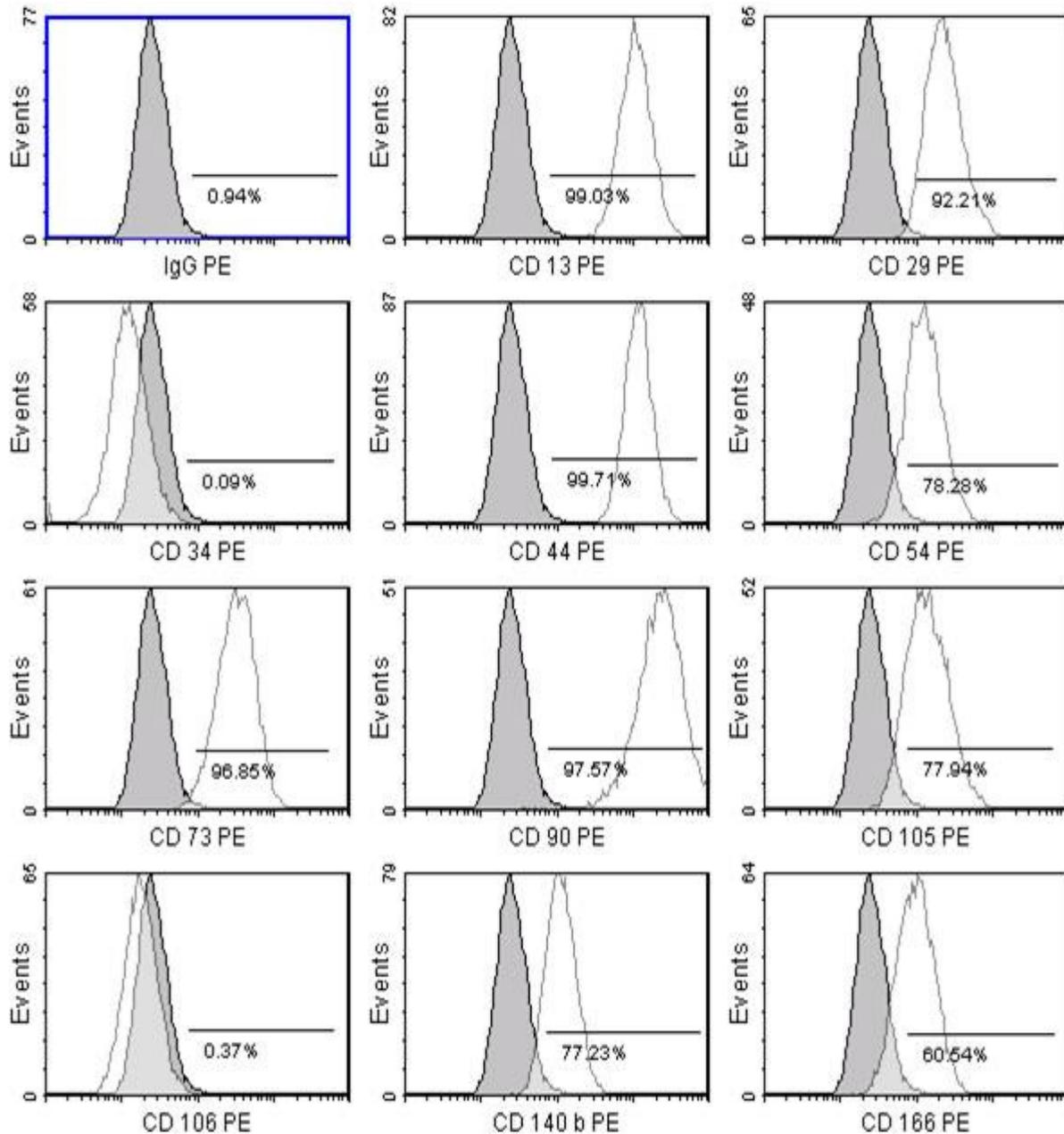


Abbildung 17: Repräsentative FACS-Analyse einer Parotisprobe in der dritten Passage mit prozentualer Angabe der positiven Zellen für den jeweils angegebenen Oberflächenmarker. Die Probe (grau) ist gegen die Isotypkontrolle (weiß) aufgetragen.

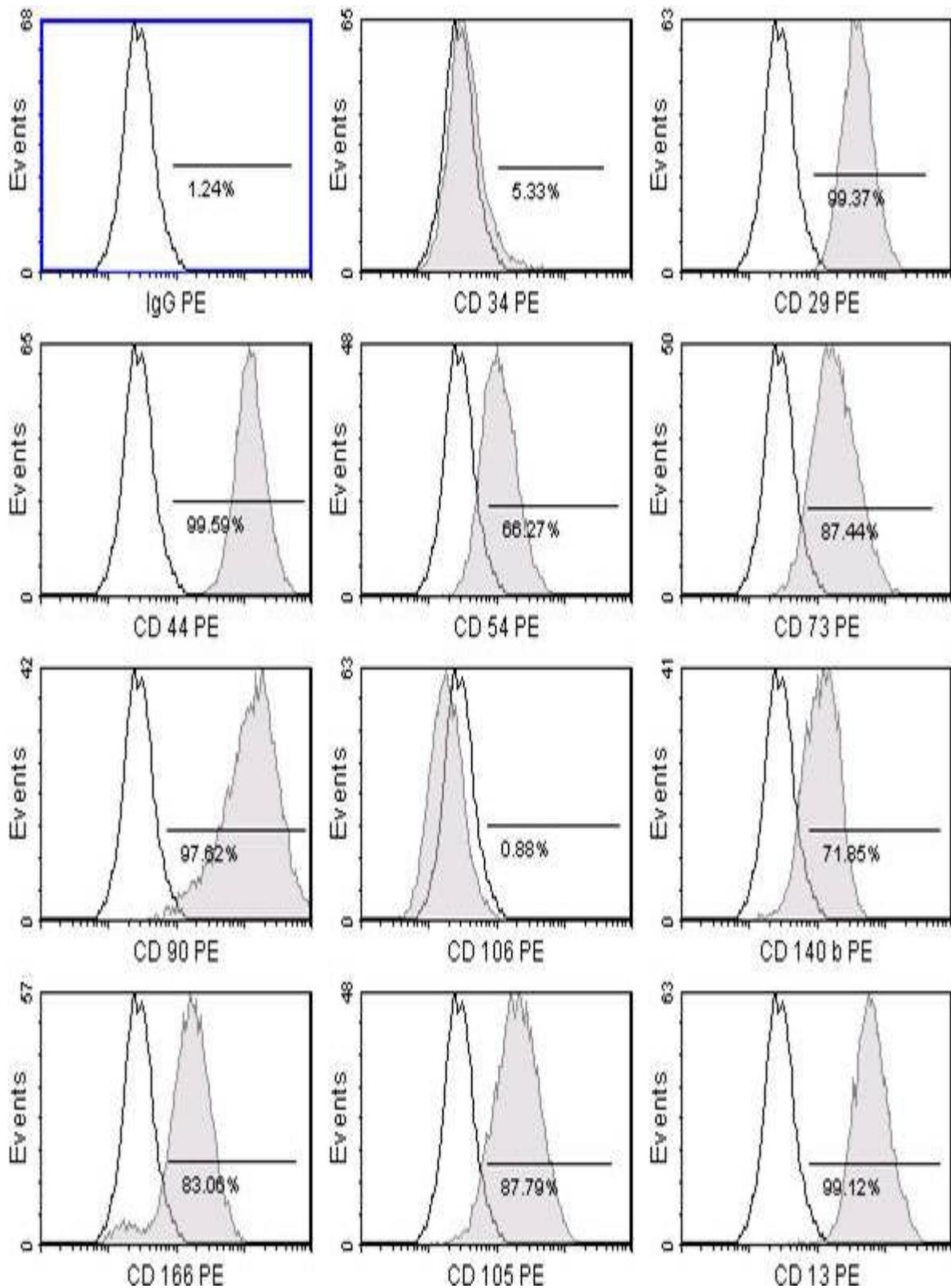


Abbildung 18: Repräsentative FACS-Analyse einer Submandibularisprobe in der dritten Passage mit prozentualer Angabe der positiven Zellen für den jeweils angegebenen Oberflächenmarker. Die Probe (grau) ist gegen die Isotypkontrolle (weiß) aufgetragen.

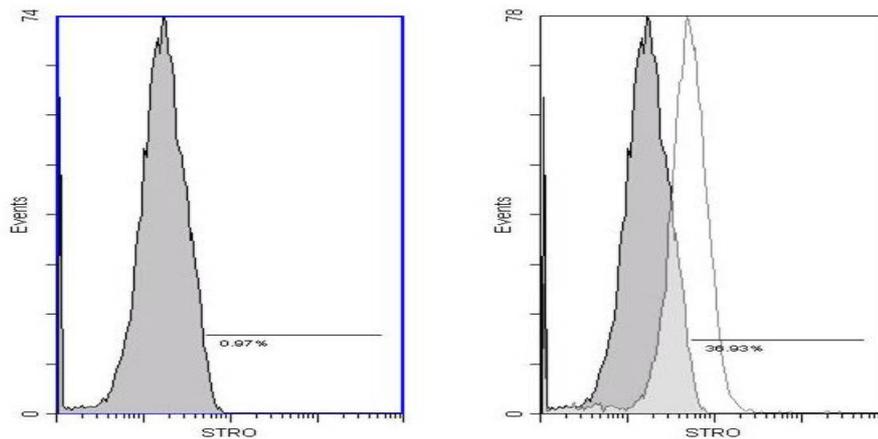


Abbildung 19: Repräsentative Darstellung der Stro-1-Expression in der ersten Passage

Für die Etablierung eines Xerostomie-Mausmodells, in dem die Speicheldrüsen radiogen geschädigt werden, wurden primäre murine mesenchymale Stammzellen benötigt, die mit denen aus dem humanen Gewebe vergleichbar sind. Hierfür wurde Submandibularisgewebe aus BalbC-Mäusen entnommen, das nach dem gleichen Protokoll aufgearbeitet wurde wie das humane Speicheldrüsengewebe. Anschließend wurden die isolierten Zellen unter den gleichen Bedingungen und mit den gleichen Medien kultiviert, wie im Kapitel 3.2.1.3 beschrieben. Der Kulturverlauf der murinen Zellen war identisch mit dem der humanen. Morphologisch zeigten sie einen spindelförmigen fibroblastoiden Zelltyp. Um festzustellen, ob die aus der Maus isolierten Zellen mit denen aus den humanen Speicheldrüsen vergleichbar sind, erfolgte eine Analyse der Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Die analysierten Zellen stammten aus Gewebe von drei verschiedenen Individuen und befanden sich in der dritten Passage der Kultivierung.

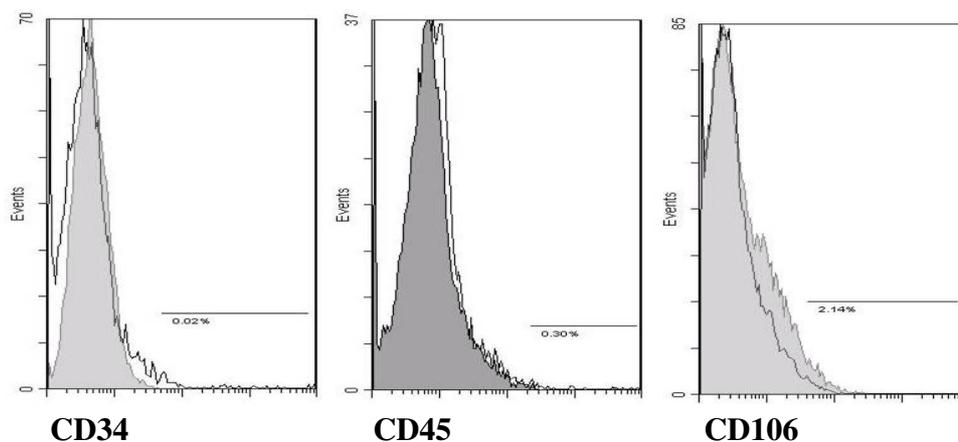


Abbildung 20: Repräsentative FACS-Analyse muriner MSCs aus der Submandibularis in der dritten Passage (negative Marker).

Die Zellen waren für die hämatopoetischen Stammzellmarker CD34 (PE) und CD 45(APC) und für CD106 (FITC) negativ, was den Ergebnissen der humanen MSC aus der Speicheldrüse entspricht. Repräsentative Probe (grau) gegen Isotypkontrolle (weiß) aufgetragen.

Wie die aus dem humanen Gewebe isolierten Zellen, waren die murinen Zellen negativ für die hämatopoetischen Stammzellmarker CD34 und CD45 und den putativen mesenchymalen Stammzellmarker CD106. Ebenfalls war die Expression von CD29, CD44, CD54, CD73, CDE105, CD140b und CD166 identisch mit der Expression hMSCs in der dritten Passage.

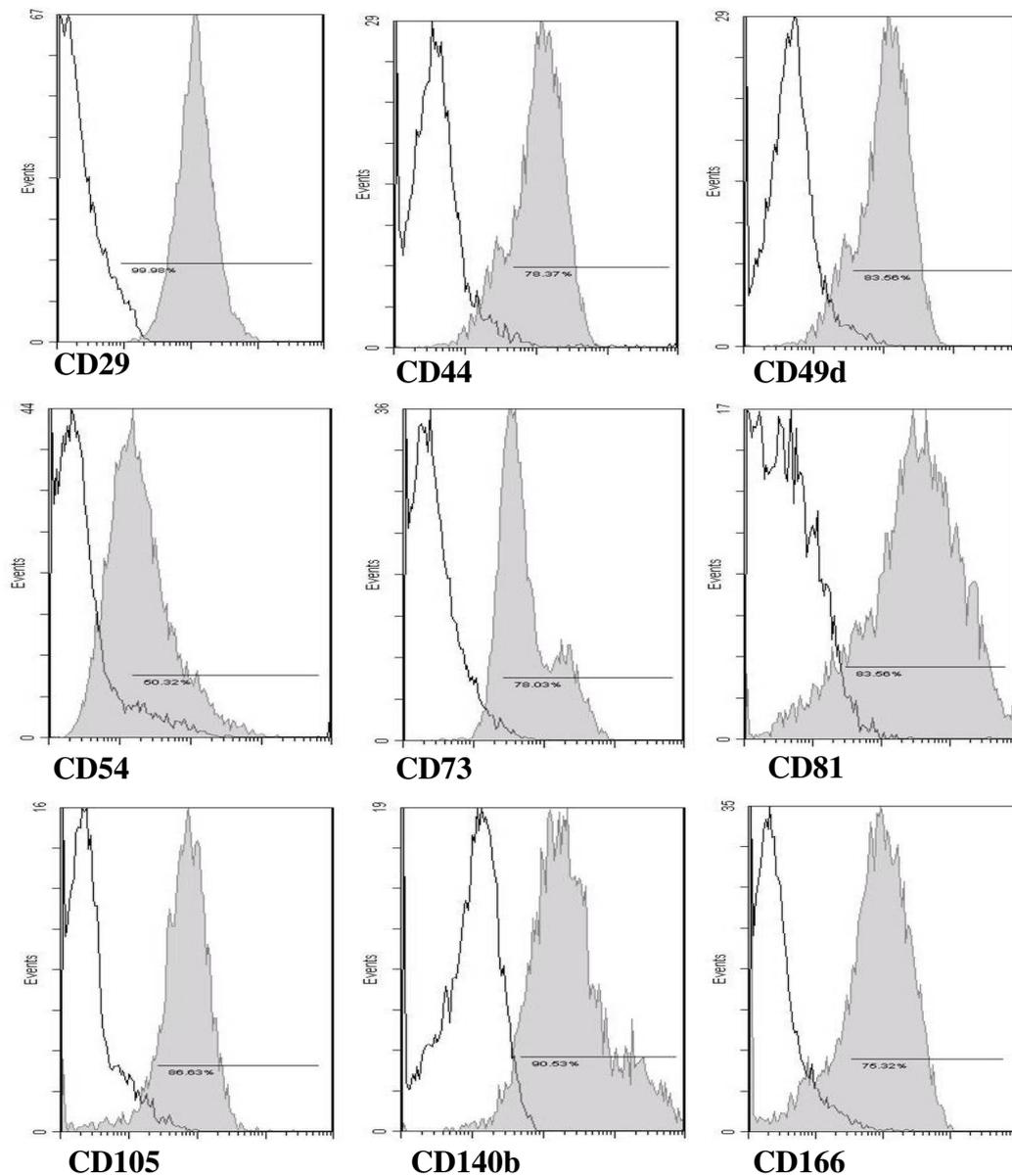


Abbildung 21: Repräsentative FACS-Analyse muriner MSCs aus der Submandibularis in der dritten Passage (positive Marker). Repräsentative Probe (grau) gegen Isotypkontrolle (weiß) aufgetragen.

4.1.5 Natives Speicheldrüsengewebe

Bevor jeweils fünf Proben der Zellen aus der Glandula parotidea und fünf Proben der Zellen aus der Glandula submandibularis differenziert wurden, erfolgte die Anfärbung von Kryoschnitten des Speicheldrüsengewebes.

Als erstes wurde das Gewebe Sudan II gefärbt, in Anlehnung an die Fettzell-Linie. Es konnten Fettzellen im interstitiellem Bindegewebe nachgewiesen werden (Abb.22 a). Als Nachweis der osteogenen Kaskade erfolgte eine Färbung mit alkalischer Phosphatase, die im Speicheldrüsengewebe nicht nachweisbar war (Abb. 22 b). Weiterhin wurde das Gewebe Osteopontin und Bone Sialoprotein gefärbt. (Abb. 22 c-d). Beide Glykophosphoproteine waren in den Strukturen der Gangsysteme nachweisbar. Die Analyse für chondrale Zelltypen ergab, dass einige Matrixgebiete im Speicheldrüsengewebe positiv für Alcianblau waren. Ebenso waren Teile der Sekretgranula positiv, als Nachweis von sauren Mukosubstanzen (Abb. 22 e). Allerdings konnte kein Kollagen II nachgewiesen werden.

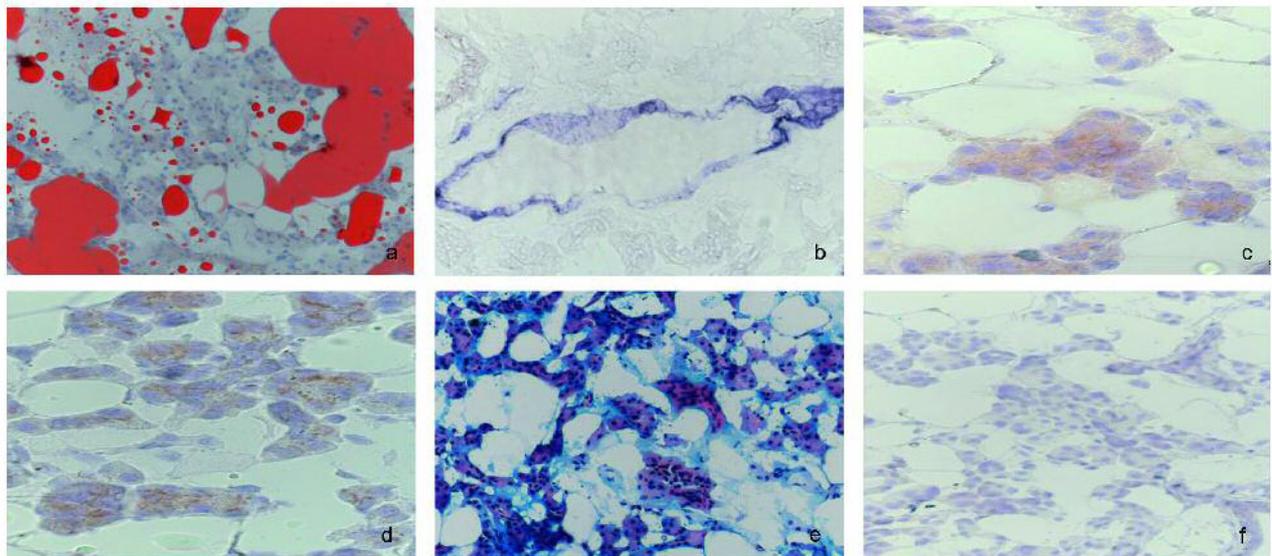


Abbildung 22: Kryoschnitte von humanem Parotisgewebe (Vergrößerung x20).
[Quelle: Rotter et al. 2007]

- a) Positive Sudan III-Färbung
- b) Negative Alkalische Phosphatase-Färbung
- c) Positive Bone Sialoprotein-Färbung
- d) Positive Osteopontin-Färbung
- e) Positive Alcianblau-Färbung
- f) Negative Kollagen II-Färbung

4.1.6 Multipotentes Differenzierungspotential humaner MSC

Der Stammzellnachweis und die Bestätigung, ob das Isolierungs- bzw. Expansionsprotokoll für die Anreicherung humaner mesenchymaler Stammzellen geeignet ist, erfolgt letztendlich über das ausgeprägte Proliferations- und Differenzierungspotential. Pittenger wies in Differenzierungs-Assays nach, dass humane MSC einer klonalen Ausgangspopulation alternativ in

die osteogene, adipogene und chondrogene Richtung gelenkt werden können [130]. Nach den im Kapitel 3.2.1.3 genannten Protokollen konnte in dieser Arbeit mittels Dexamethason, L-Ascorbinsäure-2-phosphat und β -Glycerophosphat in Monolayerkulturen regelmäßig eine osteogene Differenzierung, sowohl in den Parotis- (Abb. 25 e-p) als auch in den Submandibularisproben (Abb. 26 e-p), induziert werden. Der Nachweis erfolgte über eine ansteigende Aktivität der alkalischen Phosphatase (Abb. 25 e-g und 26 e-g) und dem Nachweis der Bildung von Osteopontin und Bone Sialoprotein (Abb. 25 h-p und 26 h-p). Die adipogene Differenzierung wurde mittels 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX), Dexamethason, Insulin und Indomethazin induziert. Zum Nachweis der Induktion sind die für Adipozyten typischen Lipid-Vakuolen (Abb. 25 a-d und 26 a-d) mit dem Farbstoff Sudan III angefärbt worden. Zur chondrogenen Differenzierung wurden die humanen MSC anfangs zu Zellaggregaten (micro mass bodies) zentrifugiert und dann im Medium mit dem Wachstumsfaktor TGF β 3 induziert (Abb. 23 und 24). Die MMBs wiesen nach kurzer Zeit eine vielschichtige matrixreiche Morphologie auf, und histochemisch konnte mittels Alcianblau-Färbung die Bildung einer für chondrozyten-typischen sauren sulfatreichen Proteoglycanmatrix nachgewiesen werden (Abb. 23 A-C und 24 A-C). Darüber hinaus wurde immunhistochemisch knorpel-typisches Kollagen Typ II und Kollagen Typ X angefärbt (Abb. 23 D-I und 24 D-I). Die immunhistochemischen Kollagen-Färbungen der Submandibularisproben erfolgten mit einem chromogen gelabelten Sekundärantikörper, da hier eine Autofluoreszenz der Proben nachgewiesen werden konnte.

Die MMBs der Parotis- und Submandibularisproben zeigten keine Unterschiede. In allen Proben war eine gleichmäßige Zunahme der Proteoglycanmatrix und der Kollagenfasern zu beobachten.

Anders verhielt es sich bei den Färbungen für Sudan III, alkalische Phosphatase, Osteopontin und Bone Sialoprotein. Hier waren deutliche Unterschiede zwischen den Parotis- und Submandibularisproben zu erkennen. In der Sudan III-Färbung konnte man in den Parotisproben wenige, große Lipid-Vakuolen feststellen, die ab Tag 18 deutlich zu erkennen waren. In den Submandibularisproben waren die Vakuolen im Zytoplasma klein, aber zahlreich, und konnten bereits ab Tag 9 nachgewiesen werden. Die Expression von alkalischer Phosphatase, Osteopontin und Bone Sialoprotein war in den Parotisproben ab Tag 9 deutlich zu erkennen, während in den Submandibularisproben die Expression später und deutlich dezenter einsetzte.

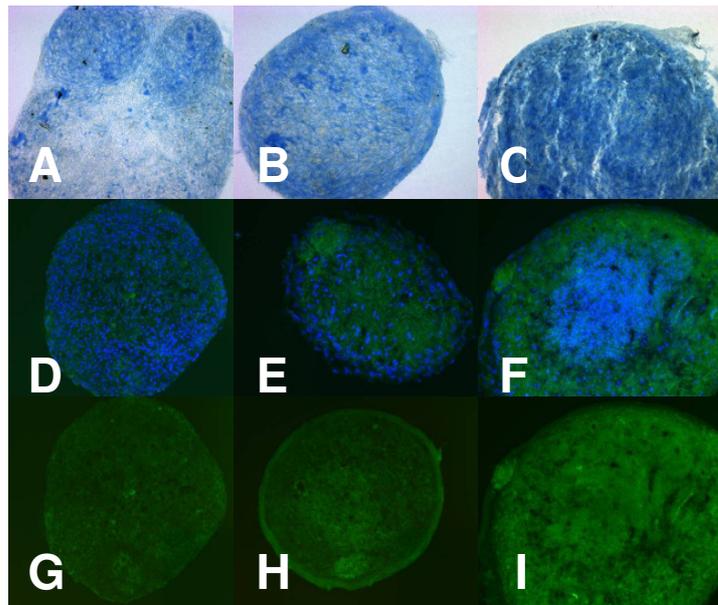


Abbildung 23: Micro mass bodies der chondrogenen Differenzierung hMSC aus der Glandula parotidea (Vergrößerung: x10)
Chondrogene Differenzierung an Tag 9 (A, D, G), Tag 18 (B, E, H) und Tag 25 (C, F, I), man kann lediglich die Zunahme der Matrix während der Differenzierung erkennen

A-C: Alcianblau-Färbung

D-F: Kollagen II-FITC-Färbung (grün) mit DAPI-Kernfärbung (blau)

G-I: Kollagen X-FITC-Färbung

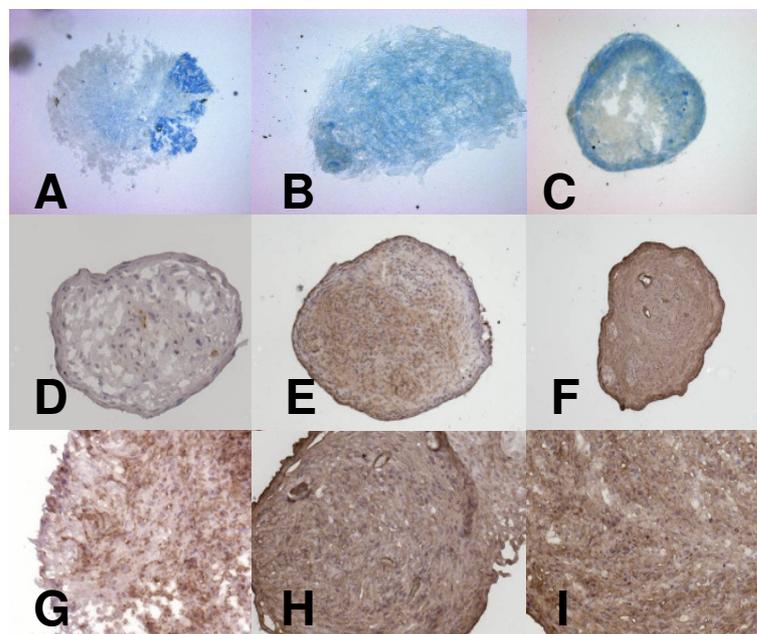


Abbildung 24: MMBs der chondrogene Differenzierung hMSC aus Glandula submandibularis
Tag 9 (A, D, G), Tag 18 (B, E, H) und Tag 25 (C, F, I), man kann lediglich die Zunahme der Matrixanteile während der Differenzierung erkennen.

A-C: Alcianblau-Färbung

D-F: Kollagen II-Färbung (Chromogen)

G-I: Kollagen X-Färbung (Chromogen)

A-F: Vergrößerung x10

G-I: Vergrößerung x20

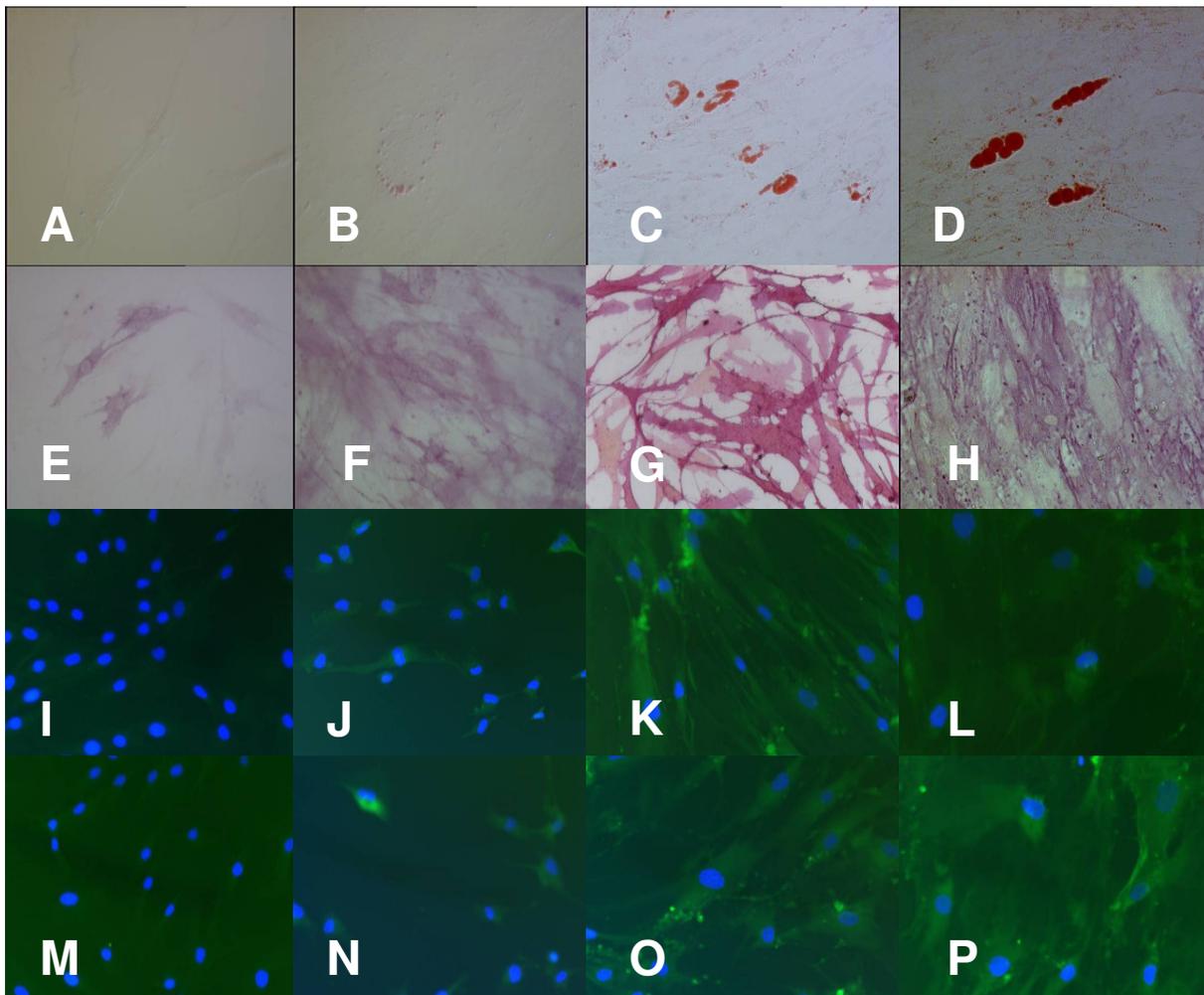


Abbildung 25: Adipogene und osteogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen aus der Glandula parotidea (Vergrößerung x20)

Tag 0 (A, E, I, M)

Tag 9 (B, F, J, N)

Tag 18 (C, G, K, O)

Tag 25 (D, H, L, P)

A-D: Sudan III-Färbung

E-H: Alkalische Phosphatase-Färbung

I-L: Osteopontin-Färbung-FITC, Kernfärbung mit DAPI

M-P: Bone Sialoprotein-Färbung-FITC, Kernfärbung mit DAPI

Während der Differenzierung (0 bis 25 Tage) nimmt der Anteil der Zellen zu, die adipogene Marker (A-D) bzw. osteogene Marker exprimieren (E-P)

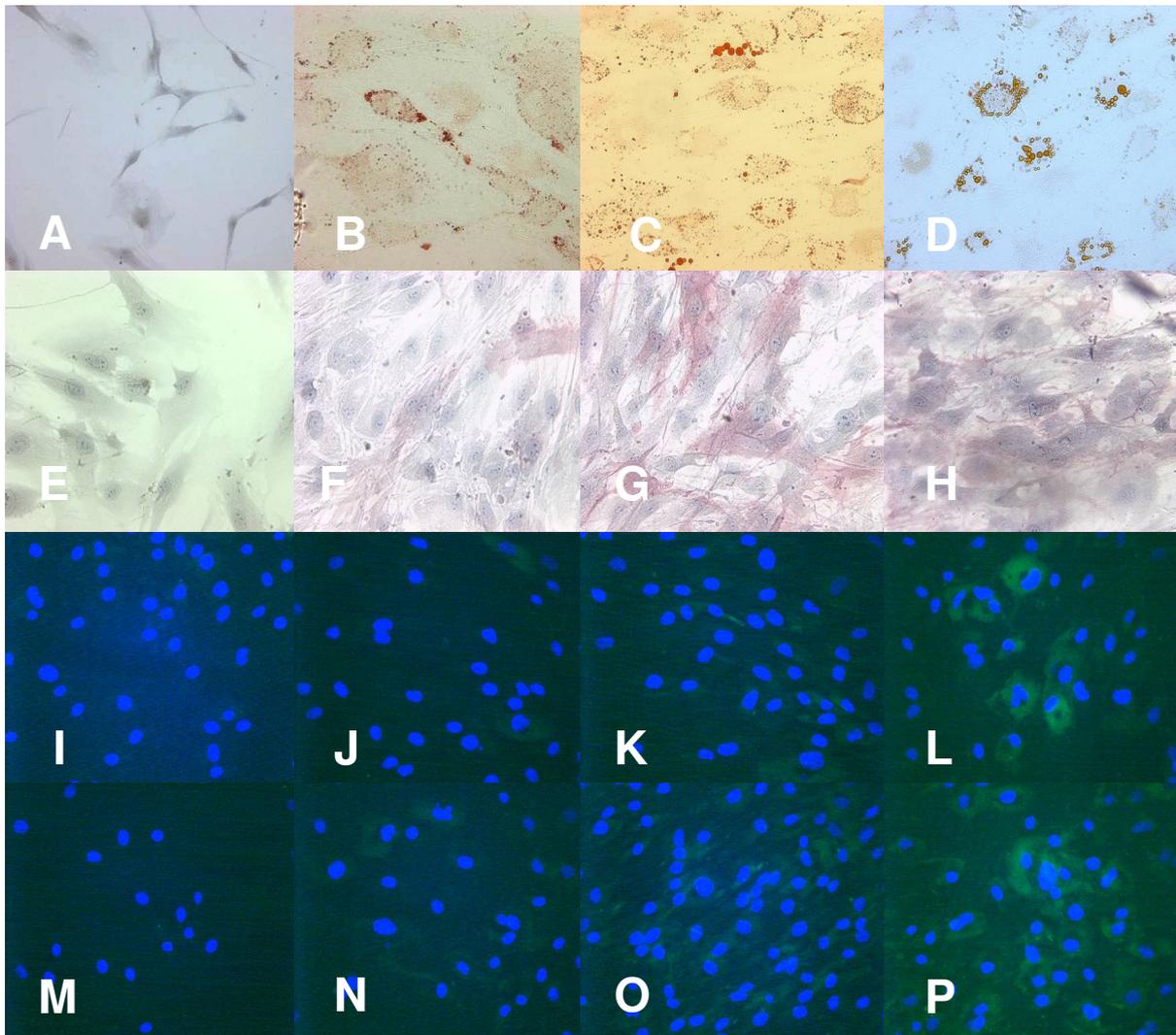


Abbildung 26: Adipogene und osteogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen aus der Glandula submandibularis (Vergrößerung x20)

Tag 0 (A, E, I, M)

Tag 9 (B, F, J, N)

Tag 18 (C, G, K, O)

Tag 25 (D, H, L, P)

A-D: Sudan III-Färbung

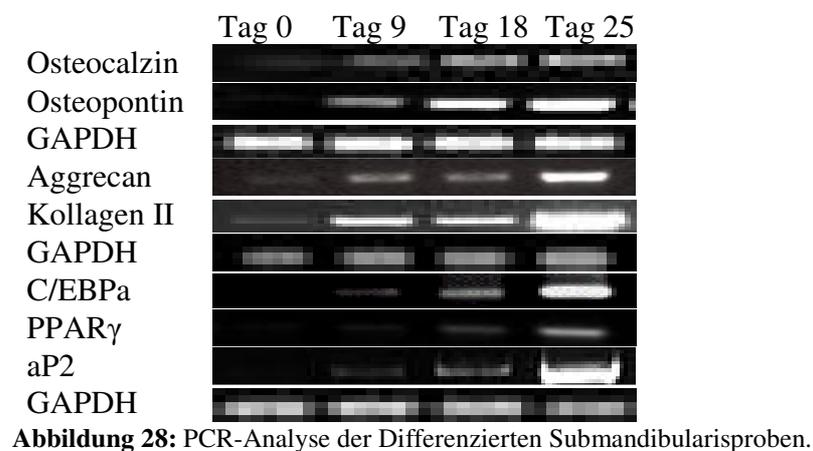
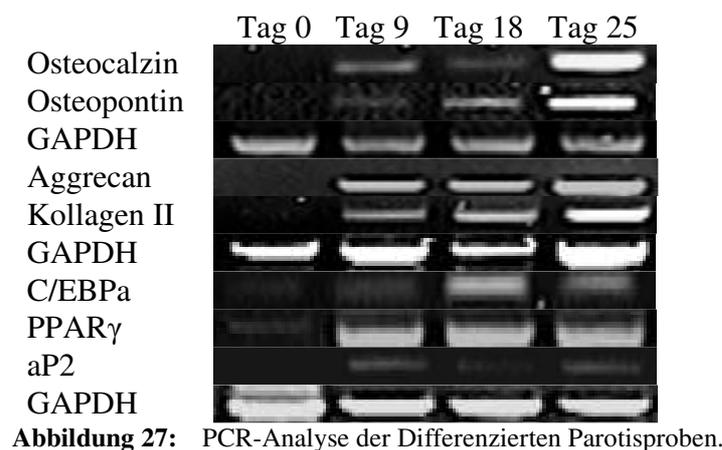
E-H: Alkalische Phosphatase-Färbung

I-L: Osteopontin-Färbung-FITC, Kernfärbung mit DAPI

M-P: Bone Sialoprotein-Färbung-FITC, Kernfärbung mit DAPI

Während der Differenzierung (0 bis 25 Tage) nimmt der Anteil der Zellen zu, die adipogene Marker (A-D) bzw. osteogene Marker exprimieren (E-P)

Das multipotente Differenzierungspotential hMSCs konnte durch histochemische und immunhistochemische Färbungen nachgewiesen werden. Zusätzlich erfolgte eine Genexpressionsanalyse durch RT-PCR. Unter osteogener Induktion konnte mRNA für Osteocalzin und Osteopontin nachgewiesen werden. Die chondrogene Induktion resultierte in der Produktion von Aggrecan und Kollagen II spezifischer mRNA. Unter adipogenen Differenzierungsbedingungen war es möglich die Genexpression von C/EBPa, PPAR γ und aP2 nachzuweisen. Während der 25-tägigen Kultivierung der Zellen unter Differenzierungsbedingungen nahm die Genexpression der linienspezifischen Markergene in allen Speicheldrüsenproben zu. In Abbildung 27 sind die Parotis- und in Abbildung 28 die Submandibularisproben an den verschiedenen Proben Tagen mit GAPDH-Abgleich zu sehen.



4.1.7 Etablierung eines Xerostomie-Mausmodells

Nachdem die aus humanen Speicheldrüsen isolierten Zellen als mesenchymale Stammzellen identifiziert werden konnten, sollte ein Mausmodell erstellt werden, indem die Speicheldrüsen durch Radiatio geschädigt werden. In diesem Modell sollte das Homing-, Engraftment- und Regenerierungspotential von mesenchymalen Stammzellen nachgewiesen werden. Als erster Schritt wurden Zellen aus murinem Submandibularisgewebe isoliert und kultiviert. Dies erfolgte nach den gleichen Protokollen, wie sie für das humane Gewebe etabliert wurden. Es sollte gezeigt werden, dass die primären Zellen aus murinem und humanem Gewebe vergleichbar sind. Die Phänotypisierung der murinen MSCs erfolgte mittels Durchflusszytometrie (siehe Kapitel 4.1.4). Für die Versuche *in vivo* sollte eine durch das SV 40 Large T immortalisierte CD34-negative Stammzelllinie aus dem Knochenmark von BalbC-Mäusen genutzt werden, die von PD Dr. med. Ralf Huss zur Verfügung gestellt wurde. Ein spezifischer Nachweis der transplantierten Zellen sollte durch den Antikörper gegen das SV 40 Large T Antigen erfolgen (siehe Kapitel 3.2.3.2.4).

Die immortalisierte murine Stammzelllinie zeigte mikroskopisch eine uneinheitliche Zellmorphologie von kuboidalen und fibroblastoiden Zellen. In der Durchflusszytometrie bestätigte sich, dass es sich bei der Stammzelllinie um ein Gemisch von zwei verschiedenen Zelllinien handelte.

Die radiogene Bestrahlung der BalbC-Mäuse sollte mit einem Siemens Linear Accelerator (Mevatron 74) mit einer Photonenergie von 10MV und einer Elektronenenergie von 12Mev bei 15 Gy erfolgen. 15 Gy ist eine in mehreren Publikationen beschriebene Dosierung, die zu einer ausreichenden Schädigung der Speicheldrüsen führt und eine Xerostomie induziert [90-91,234-237]. Die ersten bestrahlten Kontrollgruppen verstarben nach zehn Tagen. Der Bestrahlungsmodus mit 15 Gy erwies sich als letale Dosis. Die Versuche wurden daraufhin mit 12 Gy fortgesetzt. Die Kontrollgruppen bestanden aus jeweils n=4 Tieren und die Gewebe wurden an Tag 3, 30, 60 und 90 entnommen. Die entnommenen Speicheldrüsen zeigten die bereits beschriebenen Effekte: in der Frühphase (Tag 1-10) vakuolisiertes Zellplasma, pyknotische Zellkerne, Apoptose, und Apoptosekörper, um Tag 30 konnten, wie beschrieben, keinerlei histologische Veränderungen nachgewiesen werden und ab Tag 60 war eine einsetzende Fibrosierung zu beobachten [20,90-91,235,238]. Innerhalb einer Gruppe waren die individuellen Reaktionen auf die Bestrahlung unterschiedlich, so dass bei der geringen Gruppengröße keine statistischen Daten erhoben werden konnten. Es handelte sich hierbei eher um die Beschreibung von Einzelphänomenen.

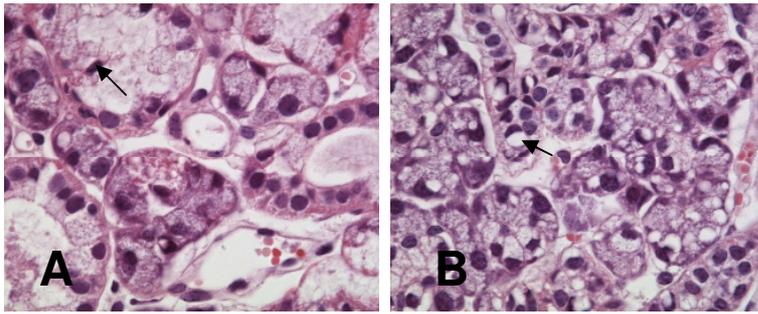


Abbildung 29: HE-Färbung einer murinen Glandula submandibularis 3 Tage nach Bestrahlung mit 12 Gy
 A: männliches Tier, Apoptosekörper
 B: weibliches Tier, deutliche Vakuolen im Zytoplasma
 Vergrößerung: x630

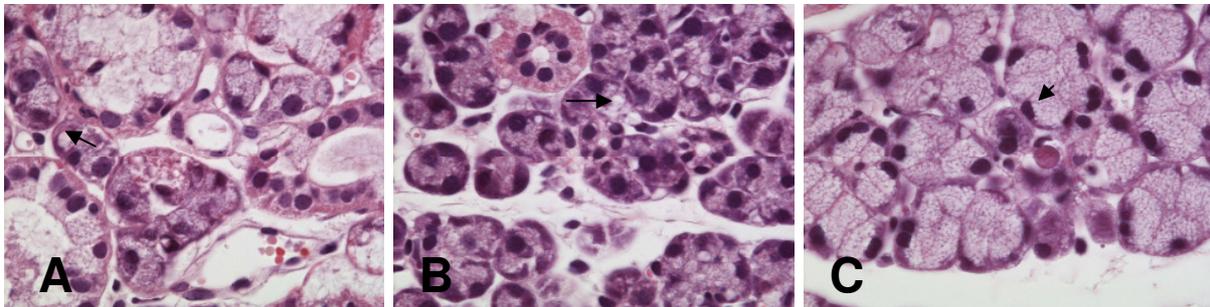


Abbildung 30: HE-Färbung von murinen Parotisproben 3 Tage nach Bestrahlung mit 12 Gy
 A: männliches Tier, beginnende Vakuolisierung und anfängliche Apoptose
 B: weibliches Tier, Vakuolisiertes Plasma und pyknotische Zellkerne
 C: weibliches Tier, Apoptosekörper
 Vergrößerung: x630

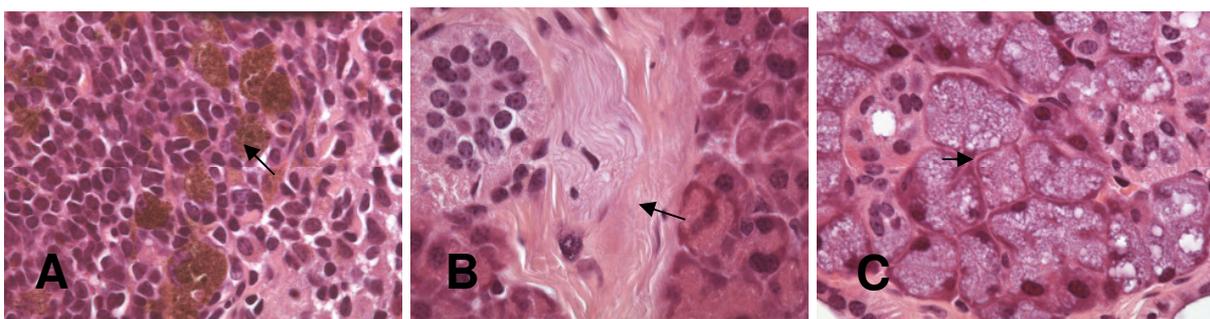


Abbildung 31: HE-Färbung von murinen Gewebeproben Tag 60 nach Bestrahlung mit 12 Gy
 A: Einlagerung von Eisenpigmenten im Lymphknoten
 B: Einsetzende Fibrosierung in der Parotis
 C: Vermehrte Bindegewebeinlagerung in der Glandula submandibularis
 Vergrößerung: x630

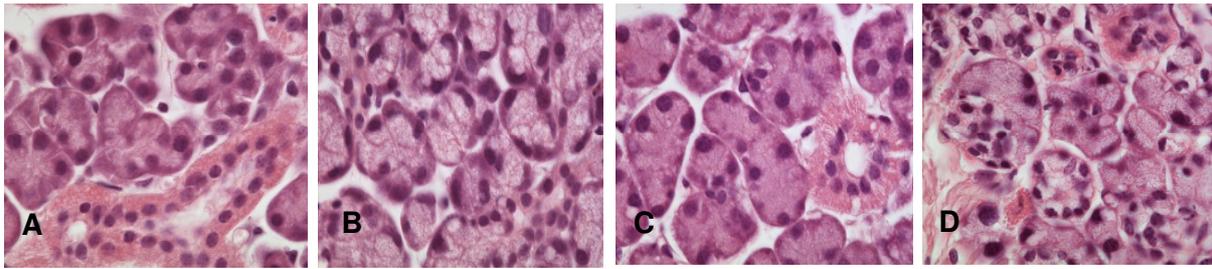


Abbildung 32: HE-Färbung gesunder muriner Speicheldrüsen

A-B: Glandula parotidea

C-D: Glandula submandibularis

Vergrößerung: x630

Neben den histologischen Veränderungen in der Speicheldrüse nach Radiatio, wurde das Gewicht der Glandulae submandibulares und der Speichelfluss nach Pilocarpin-Gabe in den unterschiedlichen Versuchsgruppen ermittelt. Das Gewicht der Speicheldrüsen nahm mit zunehmendem Probestag ab, das makroskopische Aussehen der Glandulae submandibulares veränderte sich ebenfalls. An Tag 3 erschien das Gewebe sulzig, während die Gewebekonsistenz mit zunehmendem Probestag derber wurde und die Speicheldrüse verkleinert wirkte

Das Sammeln des Speichels erfolgte mit einem modifizierten Lashley-Cup, unter Injektionsnarkose mit Ketamin (120 mg/kg) und Rompun (5 mg/kg), nach ip-Gabe von 2 mg/kg Pilocarpin. Die Proben wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten gesammelt und ergaben in den unbestrahlten Kontrollgruppen ca. 100µl Speichel. Die Proben einer Gruppe wurden auf Eis gesammelt und anschließend in Kooperation mit Dr. med. Dippelt aus der Klinischen Chemie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein untersucht. Die gemessenen Parameter waren Amylase, Lipase, Natrium, Kalium, Chlor, LDH und Gesamteiweiß. Die Parameter wiesen individuelle Unterschiede auf, insbesondere die Amylase zeigte bei den unbestrahlten Kontrollgruppen starke Schwankungen. An Tag 3 nach Radiatio war die Speichelmenge unverändert, allerdings nahm der Gehalt von Natrium, Kalium und Chlor ab, während die Menge an Gesamteiweiß zunahm. Mit Zunahme der Probestage (d30, d60, d90) wurde die gewonnene Speichelmenge geringer (< 50µl), so dass eine aussagekräftige Untersuchung des Speichels nicht mehr möglich war.

Den Versuchsgruppen wurde einen Tag nach Radiatio 1×10^6 Zellen pro 25 g Maus iv in die Schwanzvene injiziert und anschließend wie die Kontrollgruppen behandelt. Sie zeigten keine signifikanten Unterschiede in Gewicht, Aussehen und Konsistenz der Submandibularisproben oder der Speichelmenge und -zusammensetzung im Verhältnis zu den Kontrollmäusen. Zusätzlich wurden den Versuchstieren an den Probestagen folgende Gewebe für die SV-40-Färbung und dem damit verbundenen Nachweis der Stammzellen, entnommen: Darm,

Milz, Lunge und verschiedene Lymphknoten. Es konnten zu keinem Zeitpunkt Stammzellen in der Glandula parotis oder der Glandula submandibularis nachgewiesen werden. Ebenso war ein Stammzellnachweis in den Lymphknoten nicht möglich. An Tag 3 konnten vereinzelt im Darm und massiv im Kapillargebiet von Milz und Lunge Stammzellen nachgewiesen werden. Zu späteren Zeitpunkten (d30, d60, d90) war allerdings auch in diesen Geweben ein Nachweis von Stammzellen nicht mehr möglich.

5 Diskussion

Die spezifischen Charakteristika von Stammzellen beinhalten uneingeschränkte Kapazität der Selbsterneuerung und die Fähigkeit in multiple Zelllinien zu differenzieren. In diesem Zusammenhang ist die Isolation von Stammzellen aus neuen Quellen wichtig. Die bisher bekannten Quellen für Stammzellen haben verschiedene Nachteile, unter anderem die geringe Menge von Stammzellen, die man aus ihnen isolieren kann. Selbst die Zellen des Knochenmarks weisen nur einen 0,01-0,001%igen Anteil an mesenchymalen Stammzellen auf [130,239]. Somit bedarf es großer Mengen Spendergewebe, um genügend Stammzellen isolieren zu können. Bis heute hat man viele Gewebe identifiziert, die als potentielle Quellen für Stammzellen gelten, wie das Knochenmark [240], der Gastrointestinaltrakt [241,242], das Herz [243], die Lunge [244], die Kornea [245], die Haut [246], das Pankreas [247-249], die Leber [250], das Brustgewebe [251], ebenso wurden die Speicheldrüsen von Maus und Ratte als Stammzellquelle beschrieben [252,253] und aus der Glandula submandibularis der Ratte isoliert [254]. Diese Arbeit hat gezeigt, dass eine Isolierung mesenchymaler Stammzellen aus humanen und murinen Speicheldrüsen möglich ist. Hierbei zeigte es sich, dass ein höherer Anteil an mesenchymalen Stammzellen aus humanen Speicheldrüsen isoliert werden konnte, als aus dem Knochenmark.

5.1 Mesenchymale Stammzellen aus der Speicheldrüse

Das in dieser Arbeit etablierte Isolierungsprotokoll für mesenchymale Stammzellen zeigte sowohl für humane, als auch für murine Speicheldrüsen eine hohe Effizienz. Die isolierten Zellen waren in ihrer Morphologie sehr homolog und zeigten ein spindelförmiges fibroblastoides Aussehen. Schon frühere Studien beschrieben, dass aus dem Knochenmark isolierte mesenchymale Stammzellen einen hohen Grad an Homologie in ihrer Morphologie aufweisen. Pittenger wies eine 98%ige Homologie der sich bildenden CFU-Fs nach [130]. Neuere Studien hingegen weisen darauf hin, dass Kolonien, die aus einer einzelnen Zelle hervor gegangen sind, eine heterogene Morphologie aufweisen und aus mindestens zwei verschiedenen Zelltypen bestehen. Hierbei sind fibroblastoide Zellen, nach ihrem Proliferationspotential small rapidly-renewing cells, neben kuboidalen oder abgeflachten Zellen, large slowly-renewing cells, zu beobachten [264]. Coulter et al. postuliert sogar eine dritte Population von kleinen agranulären Zellen (RS-1), die als früheste Progenitorzellen mit dem größten Differenzierungspotential angesehen werden [265]. Ein heterogenes Erscheinungsbild der Zellen konnte in dieser Arbeit nicht beobachtet werden, allerdings veränderte sich die Mor-

phologie der Zellen während der Kultivierung, je nachdem aus welcher Speicheldrüse sie isoliert wurden. Die Zellen aus der Glandula submandibularis zeigten ab der dritten Passage ein breiteres abgeflachteres Aussehen, während die Zellen aus der Glandula parotidea ihre fibroblastoide Morphologie beibehielten. Nach Colter et al. sind diese voluminöseren abgeflachten Zellen als mature mesenchymale Stammzellen mit geringem Proliferations- und Differenzierungspotential anzusehen [265]. Die Zellen aus der Submandibularis zeigten allerdings kein eingeschränktes Proliferationspotential. Ebenso ließen sich die Zellen aus allen Submandibularisproben differenzieren, zeigten aber ein anderes Differenzierungsprofil als die Zellen aus den Parotisproben. So konnte ein früheres Einsetzen der Adipogenese beobachtet werden, während die osteogene Differenzierung später und dezenter einsetzte. Unabhängig davon, welches Differenzierungspotential die mesenchymalen Stammzellen aufwiesen, eine osteogene Differenzierung der meisten Klone war möglich (Unipotenz), während sich die Differenzierung in die adipogene Linie häufig als schwierig erwies und meist nur mit MSCs möglich war, die tripotent waren [256]. Pittenger beschrieb, dass nur 1/3 der MSCs aus dem Knochenmark differenziert werden konnten. Neuere Studien zeigen, dass die *in vitro* Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen, egal aus welchem Gewebe sie isoliert wurden, durch optimierte Kultivierungsbedingungen verbessert werden konnten. Hierbei ist nicht nur die angemessene Zusammensetzung für eine spezifische Differenzierung wichtig, sondern auch die Zelldichte und die mechanischen Kräfte, die auf die Zellen gewirkt haben [257]. Es erwies sich, dass eine geringe Zelldichte von 1×10^4 - $0,4 \times 10^6$ Zellen/cm² einen positiven Effekt auf die Proliferation und das Differenzierungspotential von humanen mesenchymalen Stammzellen hat [270,271]. Jeder Faktor der auf die Differenzierung von MSCs eine Auswirkung hat, kann optimiert werden, allerdings haben einige Faktoren unterschiedliche Wirkungen auf mesenchymale Stammzellen, je nachdem aus welcher Spezies sie isoliert wurden. Als Beispiel wäre hier das rekombinante humane Bone Morphogenic Protein-2 (rhBMP-2) zu nennen. Für die osteogene Differenzierung muriner mesenchymaler Stammzellen bedarf es einer geringen Konzentration von rhBMP-2 [266], während es bei humanen MSC einer hohen Dosierung dieses Faktors bedarf, um den gleichen Effekt zu erzielen [267].

Es konnte in keiner humanen oder murinen MSC-Kultur das Auftreten einer spontanen Differenzierung beobachtet werden. Dies betrifft die humanen MSC-Kulturen bis in die zwanzigste Passage und die murinen MSC-Kulturen bis zur fünfundzwanzigsten Passage. Während der Kultivierung der humanen und murinen Zellen konnte ein weiteres Phänomen beobachtet werden, die replikative Seneszenz. In den humanen Kulturen war bereits in der siebten Passage eine Verlangsamung der Proliferationsrate zu beobachten, während für die murinen Zel-

len, wie auch für MSCs aus der Ratte beschrieben wurde [152], dieses Phänomen nicht nachzuweisen war. Für humane MSC *in vitro* sind ca. 40 Populationsverdopplungen angegeben, bis eine replikative Seneszenz einsetzt [150,268]. Von Stenderup et al. wurde beschrieben, dass diese Seneszenz abhängig vom Alter des Spenders ist. Bei Zellen aus dem Knochenmark älterer Personen war nur eine Proliferation von fünfundzwanzig Passagen möglich [268]. Allerdings bestand kein altersabhängiger Unterschied in der Frequenz der isolierten mesenchymalen Stammzellen. Die replikative Seneszenz ist ein charakteristisches Problem von diploiden Zellen *in vitro*. Einer der Gründe ist die progressive Verkürzung der Telomere während der kontinuierlichen Subkultivierung durch fehlende oder eingeschränkte Telomeraseaktivität [263]. Bisher konnte nicht geklärt werden, ob die nicht vorhandene Telomeraseaktivität eine Folge suboptimaler Bedingungen in der Kultivierung ist, oder ein Merkmal isolierter mesenchymaler Stammzellen darstellt. Kassem et al. gelang es durch Überexpression des humanen telomerase reverse transcriptase Gens (hTERT) die Telomeraseaktivität in kultivierten MSCs wieder herzustellen [263]. Telomerisierte glatte Muskelzellen zeigten sogar eine bessere Qualität für das Tissue Engineering von Arterien, als nicht telomerisierte Zellen [269]. Die Möglichkeit die Telomeraseaktivität in kultivierten MSCs wieder herzustellen, bietet der regenerativen Medizin ein breites Einsatzgebiet der Zellen. Der Nachteil dieser Zellen ist, dass eine genetische Instabilität in den Zellen auftritt und zu einer Transformation der mesenchymalen Stammzellen führt. Prinzipiell ist es aber möglich, die Genexpression von hTERT, durch Überexpression oder chemischer Stimulation der Expression, zu erhöhen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Speicheldrüse eine geeignete Quelle für die Isolierung mesenchymaler Stammzellen zu sein scheint. Im Vergleich zum Knochenmark (ca. 0,001-0,01%), konnte ein höherer Anteil an Stammzellen gewonnen werden (0,03%), Speicheldrüsen sind für Biopsien leicht zugänglich, der Eingriff kann unter Lokalanästhesie vorgenommen werden und man kann aus 1g Biopsiematerial $5,2 \pm 0,8 \times 10^6$ Zellen gewinnen, die ein homologes Erscheinungsbild aufweisen und hohe Proliferations- und Differenzierungsraten aufweisen. Es konnte keine schnell einsetzende Differenzierung der MSCs beobachtet werden und bei einer postulierten Beibehaltung des Differenzierungspotentials bis in die 20-30igste [271] bzw. 50igste [180] Passage bieten diese Zellen ein breites therapeutisches Einsatzgebiet in der regenerativen Medizin.

5.2 Charakterisierung mesenchymaler Stammzellen

Im Gegensatz zu anderen Zelltypen die spezifische Oberflächenmarker exprimieren, wie z.B. die hämatopoetischen Zellen CD14, CD34 und CD45 oder endotheliale Zellen CD31, ist die phänotypische Identifizierung mesenchymaler Stammzellen schwierig, da sie keinen einzigartigen Marker exprimieren, sondern ein Gemisch aus Markern vieler Zelllinien, inklusive mesenchymaler, hämatopoetischer, endothelialer und von Muskel-Zellen. Erschwerend kommt hinzu, dass sich das Expressionsprofil, je nach Präparation der Zellen und Zeitverlauf in der Kultur, verändert [262].

Eine Reihe von Antikörpern ermöglichte es, spezifische Epitope der MSCs zu detektieren. Hier wären die Antikörper SH2 (CD105), SH3, SH4 (CD73) und SB-10 (CD166) zu nennen, die eigentliche Isolierung mesenchymaler Stammzellen erfolgt aber fast ausschließlich durch negative Selektion, insbesondere für die Marker CD34 und CD45. Pittenger war der Meinung, dass die Co-Expression von CD105 und CD73 ausreichend für die Aufreinigung MSCs [130], während Alsalameh et al. die Expression von CD166 und CD105 am geeignetsten hielt, um die frühesten Precursor von den maturen mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark zu isolieren [273]. Es wurde bis heute kein Konsens darüber gefunden, welche Kombination von Markern sich am besten für die Charakterisierung von MSCs eignet. Die International Society for Cellular Therapy legte somit als minimale Kriterien zur Definierung humaner mesenchymaler Stammzellen fest, dass sie für CD105, CD73 und CD90 positiv sein müssen und negativ für CD45, CD34, CD14 oder CD11b, CD79 oder CD19 und HLA-DR.

Der erste Antikörper für die positive Identifizierung mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark war mit Stro-1 gefunden. Allerdings ist er als alleiniger Marker nicht ausreichend, da seine Expression *in vitro* während der Subkultivierung verloren geht. Dies konnte auch in dieser Arbeit festgestellt werden. Mit zunehmender Passagierung der Zellen nahm die Expression von Stro-1 ab, während zeitgleich die Expression von alkalischer Phosphatase zunahm.

CD271 ist ebenfalls ein Marker, der spezifisch für immature humane MSCs aus dem Knochenmark ist [272]. Nur MSCs die CD271 stark exprimieren beinhalteten CFU-Fs, somit ist eine hoch aufgereinigte Isolation von MSCs aus dem Knochenmark möglich.

Welches Expressionsmuster für die Charakterisierung mesenchymaler Stammzellen man auch zugrunde legt, die Zellen, die in dieser Arbeit aus humanen und murinen Speicheldrüsen isoliert wurden, zeigten alle eine signifikante Expression der vorausgesetzten Marker. Honczarenko et al. beschrieb während der Subkultivierung humaner MSCs neben dem Ver-

lust der Expression von verschiedenen Chemokin-Rezeptoren eine Abnahme in der Expression von Adhäsionsmolekülen wie CD54 [274]. Dieses Phänomen konnte auch in dieser Arbeit beobachtet werden. Mit zunehmender Passagierung nahm die Anzahl der CD54-positiven Zellen kontinuierlich ab.

Die variable Expression einiger Marker (CD140b, CD166) in verschiedenen Proben der gleichen Passage lässt sich dadurch erklären, dass sich die Probenpopulation aus Klonen unterschiedlicher Maturationsgrade zusammensetzt. Hierdurch ist ein unterschiedliches Proliferationsverhalten und Expressionsmuster innerhalb der Population zu beobachten.

5.3 Speicheldrüsengewebe

Der Differenzierungsnachweis von mesenchymalen Stammzellen in die verschiedenen Zelllinien erfolgt über histologische oder immunhistologische Färbungen oder auf mRNA-Ebene durch den Nachweis bestimmter Markergene. Die Kriterien hierfür sind definiert und durch verschiedene Arbeitsgruppen reproduzierbar nachgewiesen worden. Anders sieht es für die Gewebe aus, aus denen Stammzellen isoliert werden. So liegen für die Speicheldrüse unterschiedliche Ergebnisse vor, ob Osteopontin oder Bone Sialoprotein exprimiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden deshalb die für den Nachweis der Differenzierung der MSCs genutzten histologischen und immunhistologischen Färbungen auch im nativen Speicheldrüsengewebe angewendet.

Die chondrogene Differenzierung wurde durch Kollagen II-, Kollagen X- und Alcianblau-Färbungen nachgewiesen. Im Speicheldrüsengewebe konnte kein Kollagen II, ein fibrilläres Kollagen das hauptsächlich in hyalinem Knorpel vorkommt und ca. 50% des gesamten Knorpelproteins ausmacht, nachgewiesen werden. Kollagen X, ein netzbildendes Kollagen das im hypertrophen und mineralisierenden Knorpel vorkommt, war ebenfalls nicht nachweisbar. Allerdings waren Teile der Sekretgranula und der Matrixgebiete im Speicheldrüsengewebe positiv für Alcianblau. Hierbei handelt es sich um den Nachweis von sauren Mukosubstanzen im nativen Gewebe. In den chondrogen differenzierten Zellen bzw. den MMBs wurde durch Alcianblau-Färbung lediglich die Zunahme der Matrixsubstanzen während der Differenzierung verdeutlicht.

Für den Nachweis der osteogenen Differenzierung wurden alkalische Phosphatase-, Osteopontin- und Bone Sialoprotein-Färbungen genutzt. Die alkalische Phosphatase kommt in 15 verschiedenen Isoformen im menschlichen Körper vor, vier davon stammen von unterschiedlichen Genen (Dünndarm-, Plazenta-, Keimzell- und Gewebe-unspezifische ALP). Die Ge-

webe-unspezifische ALP wird je nach Gewebe unterschiedlich glykosyliert, wodurch weitere Isoenzyme entstehen, u.a. die Knochen-ALP. Die Gesamtheit aller Isoenzyme wird als alkalische Phosphatase bezeichnet, wodurch die hier nachgewiesene ALP nicht knochenspezifisch ist. ALP konnte in mesenchymalen Stammzellen, Osteoprogenitorzellen und Präosteoblasten nachgewiesen werden, allerdings nicht in Osteoblasten [262]. Ebenso konnte keine ALP im Speicheldrüsengewebe nachgewiesen werden. Osteopontin und Bone Sialoprotein sind Mitglieder der SIBLING-Familie (small intergrin-binding ligand n-linked glycoproteins). Sie binden mit hoher Affinität an Matrix-Metalloproteinasen, wodurch diese aktiviert werden. Osteopontin wird stark in Knochen und Zähnen adulter Individuen exprimiert, ist aber auch im normalen nicht-mineralisiertem Gewebe, wie Niere, laktierendem Brustgewebe und Immunzellen nachweisbar. 1992 berichtete Brown et al. erstmals, dass OPN auch in verschiedenen epithelialen Geweben incl. der Speicheldrüsen nachweisbar ist [278]. Im Gegensatz dazu, konnte die Arbeitsgruppe um Kusufuka kein OPN im Speicheldrüsengewebe nachweisen [279]. Bone Sialoprotein wurde hauptsächlich im Knochen und im Dentin nachgewiesen, eine Expression wurde aber auch in Trophoblasten und Ameloblasten beobachtet [276]. Mittlerweile konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass Osteopontin und Bone Sialoprotein im murinen und humanen Speicheldrüsengewebe exprimiert wird [275-278]. Das Ergebnis konnte in dieser Arbeit bestätigt werden.

5.4 Mesenchymale Stammzellen *in vivo*

Über mesenchymale Stammzellen *in vivo* ist wenig bekannt. Insbesondere die Frage der MSC-Nische wird kontrovers diskutiert. Stammzellnischen sind Gewebestrukturen, die es den Zellen erlauben in ihrer spezifischen Mikroumgebung sich selbst zu erneuern, ohne dabei zu differenzieren und es den Stammzellen erlauben über Wochen oder Monate im Ruhezustand vorzuliegen. Für die meisten adulten Stammzellen ist die spezialisierte Nische in ihrem Herkunftsgewebe bereits beschrieben worden. Die hämatopoetischen Stammzellen haben ihre Nische im Knochenmark [280], epidermale Stammzellen sind im Haarfollikel von Säugern lokalisiert [281] und neurale Stammzellen befinden sich in der Subventrikularzone [282]. Dagegen scheinen die bislang isolierten mesenchymalen Stammzellen im gesamten Organismus vorhanden zu sein und ihre Lokalisation muss es ihren Nachkommen ermöglichen alle Gewebe und Organe zu erreichen. Unter diesen Voraussetzungen sind drei Theorien für die mesenchymale Stammzellnische postuliert worden.

1. Mesenchymale Stammzellen sind in einem spezifischen Organ oder Gewebe lokalisiert, von dem aus sie bei Bedarf aktiviert werden und die Zellpopulation wieder auffüllen die durch Apoptose im Zuge des physiologischen Turnovers oder durch Nekrose bei Gewebsläsionen untergegangen sind. Für diese Theorie spricht, dass es Lombaert et al. durch G-CSF-Gabe gelang den MSC-Anteil im peripheren Blut zu erhöhen und eine Geweberegeneration in bestrahlten Mäusen zu erzielen [90]. Ebenso konnte gezeigt werden, dass Hypoxie die Konzentration von MSCs im peripheren Blut ansteigen lässt [283] und MSC-Kulturen unter hypoxischen Bedingungen ein erhöhtes Regenerationspotential besitzen [284]. Der Prozentsatz mesenchymaler Stammzellen, der aus dem peripheren Blut gewonnen werden konnte ist gering und in verschiedenen Spezies unterschiedlich hoch, dennoch ist die Isolierung aus dem Blut möglich [285].
2. Neben dem Knochenmark [240], sind mesenchymale Stammzellen aus dem Gastrointestinaltrakt [241,242], dem Herzen [243], der Lunge [244], der Kornea [245], der Haut [246], dem Pankreas [247-249], der Leber [250], dem Brustgewebe [251] und vielen anderen Geweben isoliert worden. Auch die Isolation aus verschiedenen Spezies ergab ein sehr einheitliches morphologisches, immunphänotypisches und funktionales Bild der MSCs. Dies könnte auf die Existenz von gewebespezifischen Stammzellen hindeuten oder Folge der *in vitro* Kultivierung sein.
3. Eine weitere Möglichkeit ist, dass mesenchymale Stammzellen als Perizyten in einer perivaskularen Nische vorliegen. Dies könnte die einheitliche Morphologie und den starken trophischen Effekt der MSCs erklären. Für diese Theorie sprechen die Untersuchungen von Caplan et al., die eine lineare Korrelation zwischen CFU-F und Gefäßdichte zeigen [261]. Ebenso postulieren Meirelles et al., einen abnehmenden MSC-Titer älterer Individuen durch die Abnahme der Gefäßdichte in einigen Organen im Alter [255]. Dagegen sprechen die Ergebnisse von Stenderup et al. die bei älteren Knochenmarkspendern ein geringeres Proliferationspotential der MSCs feststellen konnten, aber keine erniedrigte Frequenz der MSCs.

Welche Theorie für die Stammzellnische auch zutreffend sein mag, unstrittig ist, dass mesenchymale Stammzellen eine wichtige Rolle im Knochenmark spielen. Sie bilden ein Gerüst, das dem hämatopoetischen System als mechanische Unterstützung dient und sie sezernieren verschiedene Stoffe, die für das Milieu des Knochenmarks essentiell sind. Sie sezernieren extrazelluläre Matrixproteine wie Laminin, Kollagen und Proteoglykane [286], hämatopoeti-

sche und nicht-hämatopoetische Wachstumsfaktoren, Zytokine und Chemokine und beteiligen sich an der Regulierung der Hämatopoese durch die Produktion von IL-1a., IL-1b, IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-14, IL-15, Makrophagen kolonie-stimmulierenden Faktor, Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimmulierenden Faktor (GM-CSF), Leukämie inhibierenden Faktor, Stammzellfaktor (SCF), foetale Leber-Thyrosinkinase-3, Thrombopoetin und den Hepatozyten Wachstumsfaktor (HGF) [127,265,287-289]. Die von den mesenchymalen Stammzellen sezernierten bioaktiven Faktoren haben parakrine und autokrine, sowie direkte und indirekte Wirkung. Die direkte Wirkung wird über intrazelluläre Signalkaskaden induziert, während die indirekte Wirkung darin besteht, Zellen in der Nachbarschaft zur Sekretion funktionell aktiver Moleküle anzuregen. Diese indirekte Wirkung wird von Caplan et al. als trophischer Effekt bezeichnet, in Anlehnung an diesen Begriff in der Neurobiologie, der den Vorgang bezeichnet, in dem Nervenenden bioaktive Moleküle sezernieren, die keine Neurotransmitter sind [260]. Das Regenerationspotential, das mesenchymale Stammzellen aufweisen und ihre trophischen Effekte, lassen MSCs als vielversprechende Kandidaten für den therapeutischen Einsatz erscheinen. Allerdings scheinen die positiven therapeutischen Effekte der mesenchymalen Stammzellen eher auf ihrem trophischen Effekt zu beruhen, als auf ihrem Homingeffekt und dem Regenerationspotential. Viele Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Homingeffizienz der MSCs nur 1-2% beträgt [257,259] und die Zellen nur in geringem Maße an den Regenerationsprozessen beteiligt sind [90,291]. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass hMSCs, die mit GFP markiert waren, nach Transplantation in die Tibia von NOD/SCID-Mäusen, zu funktionellen Komponenten der hämatopoetischen Mikroumgebung wurden und aktiv die Hämatopoese, durch sezernierte Faktoren und physikalische Interaktion mit primitiven hämatopoetischen Zellen, beeinflussten [290]. Ebenso konnte gezeigt werden, dass eine Co-Transplantation von MSCs und HSCs einen positiven Effekt auf das Homing der HSCs in das Knochenmark und die Regeneration des Knochenmarks haben [292-294].

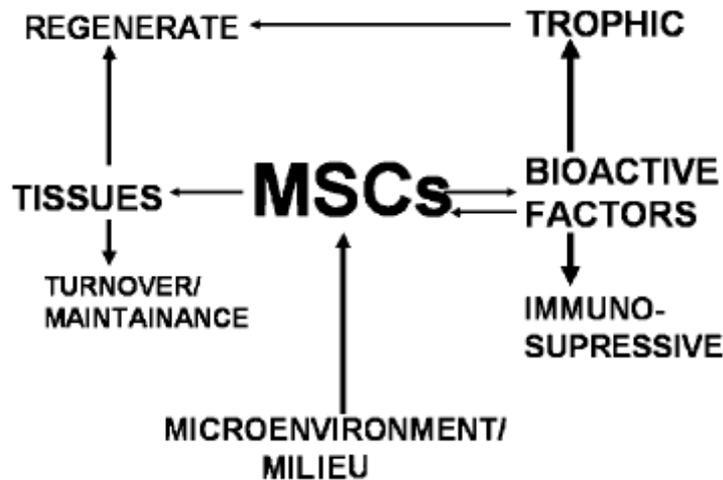


Abbildung 33: Schema von Anregung und Wirkung mesenchymaler Stammzellen im Organismus. MSCs werden durch ihr Mikromilieu angeregt in die Geweberegeneration einzugreifen oder in der Erhaltung und dem Turnover im Knochenmark. Die zweite Rolle von MSCs ist es, durch die Sekretion bioaktiver Moleküle, indirekt in die Regeneration von Gewebe einzugreifen [Caplan et al. 2006].

In der Schlaganfallforschung konnte gezeigt werden, dass MSCs in Ratten nicht in Neuronen oder neuronale Zellen differenzierten, sondern durch die Sekretion bioaktiver Moleküle die Narbenbildung und Apoptose inhibierten, die Angiogenese anregten und neurale Progenitorzellen aktivierten, die regenerative Prozesse im Gewebe induzierten [260]. MSCs, die in Versuchen zur Regeneration nach Herzinfarkt eingesetzt wurden, zeigten ein Homing in die Randzone des Infarktgebietes und eine früh einsetzende Differenzierung in Kardiomyozyten [291]. Zusätzlich konnte eine verbesserte Herzfunktion durch einsetzende Neovaskularisation, verminderte Narbenbildung und Apoptose von Kardiomyozyten und eine erhöhte Nervenregeneration beobachtet werden [295].

Neben den trophischen Effekten zeigen die bioaktiven Moleküle, die von MSCs sezerniert werden auch immunsuppressive und antiinflammatorische Eigenschaften. So konnte bei T-Lymphozyten eine verminderte Aktivierung und Proliferation festgestellt werden, wobei die eingeschränkte Proliferation der T-Zellen auf einer erniedrigten Zellteilung und nicht auf Apoptose beruht [255]. NK-Zellen werden durch MSCs in ihrem ruhenden Zustand gehalten, allerdings können aktivierte NK-Zellen nur partiell wieder durch mesenchymale Stammzellen inaktiviert werden [296,297]. Die Stimulation von B-Zellen konnte durch MSCs inhibiert werden, ebenso ihre Proliferation, indem der Zell-Zyklus in der G0/G1-Phase blockiert wurde. Mesenchymale Stammzellen zeigen auch einen Einfluss auf Antigen präsentierende Zellen (APC). Es konnte eine verminderte Formation von dendritischen Zellen aus Monozyten beobachtet werden, die in ihrer Maturation, Migration und Fähigkeit alloreaktive T-Zellen zu aktivieren, eingeschränkt waren [258].

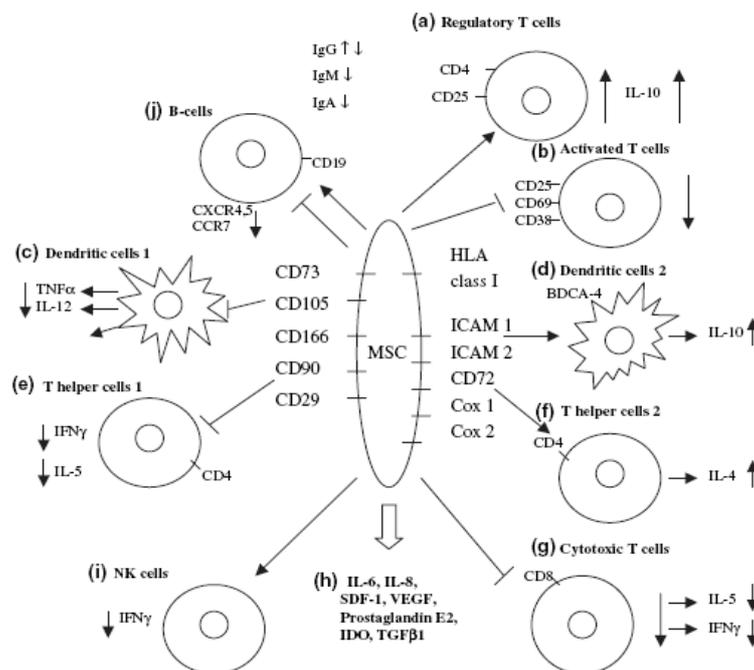


Abbildung 34: Die verschiedenen Effekte mesenchymaler Stammzellen auf Immunzellen [Le Blanc et al. 2007]

- a) MSCs erhöhen den Anteil an CD4-positiven und CD25-positiven Zellen und die IL-10 Produktion
- b) MSCs reduzieren die Marker für aktivierte T-Zellen, CD25, CD69 und CD38, MSCs verzögern die Maturation von APCs und vermindern die HLA-DR-Expression
- c) Stimulierte dendritische Zellen Typ 1 sezernieren weniger TNF-alpha und IL-12
- d) Durch LPS-aktivierte dendritische Zellen Typ 2 sezernieren erhöht IL-10
- e) T-Helferzellen Typ 1 sezernieren signifikant weniger IFN-gamma
- f) T-Helferzellen Typ 2 sezernieren erhöhte Mengen an IL-4 in Gegenwart von MSCs
- g) MSCs inhibieren zytotoxische T-Zellen
- h) Bioaktive Moleküle, die von MSCs sezerniert werden
- i) Verminderte Sekretion von TNFgamma bei NK-Zellen
- j) Die Chemokin-Rezeptor-Expression auf B-Zellen ist erniedrigt

Ein weiterer Vorteil von mesenchymalen Stammzellen ist, dass sie keine MHC II-Moleküle exprimieren und MHC I negativ sind. Ebenso konnte keine HLA II-Expression *in vitro* induziert werden [298] und ko-stimmulierende Moleküle wie CD80, CD86 und CD40 fehlen ebenfalls, was mesenchymale Stammzellen zu hypoinmunogenen Zellen macht.

Das in dieser Arbeit zu etablierende Xerostomie-Mausmodell zeigt mehrere Schwachstellen. Die zur Verfügung gestellten immortalisierten CD34-negativen Stammzellen erwiesen sich als Gemisch unterschiedlicher Zelllinien. Zur Etablierung eines Tiermodells sollten gut definierte Stammzelllinien im Vergleich zu primären mesenchymalen Stammzellen genutzt werden. Zusätzlich ist eine Optimierung der radiogenen Bestrahlung notwendig. Trotz Ausblen-

dung der Strahlung durch Bleiblöcke erfolgte keine ausschließliche Bestrahlung der Speicheldrüsen und die Ergebnisse der Bestrahlung waren zu inhomogen. Immunhistochemisch sollte ein Nachweis erbracht werden, wie weit das Speicheldrüsengewebe, insbesondere die Acinuszellen, tatsächlich radiogen geschädigt wurde.

Ebenfalls sollten unterschiedliche Applikationsarten der Stammzellen getestet werden. Die intravenöse Applikation der Stammzellen hatte zur Folge, dass die relativ großen Stammzellen das Kapillargebiet der Lunge und der Milz nicht passieren konnten und dort abgebaut wurden. Eine lokale Implantation mesenchymaler Stammzellen hat den Vorteil, dass die Zellen direkt ins Zielgewebe gelangen, vorher nicht abgebaut werden und ihre Wirkung vor Ort beurteilt werden kann.

Außerdem sollte die Anzahl der Tiere pro Versuchsgruppe erhöht werden, um statistisch signifikante Daten zu erhalten.

5.5 Therapeutische Ansätze für die Nutzung mesenchymaler Stammzellen in der regenerativen Medizin

5.5.1 Lokale Implantation

Es gibt viele Studien in der die Nutzung mesenchymaler Stammzellen für die lokale Implantation beschrieben ist. Hauptsächlich werden MSCs für die Regeneration der Gewebe genutzt, in die sie differenzieren können. So konnte bereits 1995 von Lazarus et al. gezeigt werden, dass MHC-inkompatible MSCs, die in große Knochendefekte implantiert wurden, keine immunogene Reaktion hervorrufen, sondern den Defekt durch neue Knochenbildung ausfüllen [299]. Liebermann et al. nutzte 1998 erstmals MSCs für die Gentherapie, indem er murine MSCs mit rhBMP-2 transfizierte und diese lokal in einen Knochendefekt des Femurs einbrachte. Innerhalb von 8 Wochen konnte eine substantielle Heilung des Knochens beobachtet werden [300]. Ebenso gibt es verschiedene Ansätze MSCs für die Knorpelregeneration zu nutzen. Als Beispiele sind hier die Regeneration des Knorpels der Zwischenwirbelscheibe und des Gelenkknorpels zu nennen [301-303]. Aber auch auf anderen Gebieten finden mesenchymale Stammzellen in der lokalen Implantation ihren Einsatz. So konnte im Rattenmodell für akute Rückenmarksverletzung gezeigt werden, dass durch die Transplantation von 5×10^5 MSCs direkt in das Epizentrum der Verletzung eine signifikant verbesserte Funktion der sensorischen und motorischen Komponenten erreicht werden konnte [304]. Auch in der chronischen Wundheilung konnten mesenchymale Stammzellen erfolgreich eingesetzt werden. Im Mausmodell erzielten Wu et al. eine verbesserte Wundheilung, indem sie

MSCs aus dem Knochenmark subkutan in das Wundgebiet appliziert. Für die Wundheilung sind Keratinozyten, Fibroblasten und endotheliale Zellen in einer adäquaten extrazellulären Matrix notwendig. Direkt nach der Verletzung entsteht ein hypoxisches Milieu im Wundgebiet, was chemoattraktiv auf die genannten Zellen, inflammatorische Zellen und Progenitor- oder Stammzellen wirkt. Allerdings konnten keine differenzierten MSCs im Wundgebiet nachgewiesen werden, woraufhin Wu et al. postulierten, dass die verbesserte Angiogenese und Wundheilung auf parakrinen Effekten der MSCs beruhen müssen [305]. Dieser Nachweis gelang ihnen in einer Folgestudie [306].

Der Vorteil der lokalen Implantation mesenchymaler Stammzellen besteht darin, dass die recht großen Zellen direkt in das geschädigte Gewebe gebracht werden und nicht, wie bei der systemischen Applikation, im Kappilargebiet der Lunge verbleiben. Ebenso liegt die Homingeffizienz der MSCs für ihr Zielgewebe lediglich bei 1-2% [259]. Zusätzlich wurde in einer Studie von Fibbe et al. gezeigt, dass primäre MSCs aus dem Knochenmark, die effizient in das Knochenmark und die Milz einwanderten, diese Homingkapazität bereits nach 24-48h in der Zellkultur verloren [292].

5.5.2 Systemische Transplantation

Vielversprechende therapeutische Erfolge mit mesenchymalen Stammzellen konnten bei der systemischen Ko-Transplantation mit hämatopoetischen Stammzellen erzielt werden. Die ersten Ergebnisse in der Nutzung mesenchymaler Stammzellen GVHD zu verhindern stammen aus dem Jahr 2002. Lee et al. berichtete von einer Patientin mit akuter Leukämie, die mit HLA-haploidentischen peripheren Blut-Stamm-Zellen und mesenchymalen Stammzellen von ihrem Vater behandelt wurde und unter Standard-Immunsuppression weder eine akute noch chronische GVHD entwickelte, und auch keine Anzeichen dafür 31 Monate nach der Transplantation zeigte [307]. Der erste dokumentierte Nachweis der Effizienz von MSCs in der therapeutischen Nutzung gegen die GVHD wurde vom Karolinska Transplant Centre 2004 erbracht. Hier wurde einem 9 Jahre alten Jungen, der an einer akuten steroidresistenten Grad IV GVHD litt, durch Transplantation von MSCs geholfen werden [308]. In einer Pilotstudie zur besseren Ansiedelung hämatopoetischer Stammzellen im Knochenmark wurden MSCs ko-transplantiert. Die MSC-Gabe erfolgte, da es bei vorherigen Transplantationen zu Spender-Misserfolgen und zur Re-Transplantation kam. Innerhalb von 100 Tagen konnte ein 100%iger Spenderchimerismus in den Patienten festgestellt werden [309]. Neuere Studien zeigen, dass die Dosis der transplantierten MSCs wichtig für die Ansiedelung der hämatopoetischen Zellen im Knochenmark ist. So konnten Park et al. zeigen, dass das Ho-

ming humaner CD34-positiven Zellen im NOD/SCID-Mausmodell von der Menge der ko-transplantierten MSCs abhängig ist. Bei alleiniger Transplantation von HSCs konnten 29% der Zellen nach vier Wochen im Knochenmark der Mäuse nachgewiesen werden. Wurden 1×10^6 MSCs mit den HSCs ko-transplantiert, erhöhte sich der Anteil der HSC im Knochenmark auf 41%, bei einer Ko-Transplantation von 5×10^6 MSCs erhöhte sich der Anteil sogar auf 55% [310]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der Zeitpunkt der MSC-Gabe entscheidend ist, um eine GVHD zu vermeiden. Polchert et al. etablierte ein Mausmodell von allogenen HSCT, indem sich alle MHCs von Spender und Empfänger unterschieden. Die mesenchymalen Stammzellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der hämatopoetischen Stammzell-Transplantation vorgenommen. So ergaben die Versuche, dass lediglich die Gabe von MSCs 2 und 20 Tage nach der HSCT eine GVHD effektiv verminderte. Offensichtlich brauchen MSCs eine adäquate inflammatorische Umgebung, um ihre immunsuppressorischen Eigenschaften zu entwickeln. Hierbei scheint IFN γ eine entscheidende Rolle zu spielen [311].

In der Therapie der Osteogenesis imperfecta konnte durch die systemische MSC-Transplantation ebenfalls eine signifikante Verbesserung erzielt werden. Patienten mit OI zeigten nach einer Knochenmarkstransplantation ein Einwandern von Spender-Osteoblasten in den Knochen, was eine erhöhte Mineralisation und eine erhöhte Dichte des Knochens zur Folge hatte. Ebenso konnte eine verminderte Frequenz der Knochenfrakturen und eine verbesserte Heilung der Frakturen beobachtet werden [312-314].

5.5.3 Die Kombination von Stammzellen und Gentherapie

Mesenchymale Stammzellen werden in der Gentherapie als Vehikel für den Gen-Transfer genutzt. Hierbei können die transfizierten Gene ein fehlendes Protein ersetzen oder wie in der Tumorthherapie, antitumorale Stoffe codieren.

Bei der Osteogenesis imperfecta wurden nicht nur durch die Gabe von MSCs verbesserte Knochenstrukturen beobachtet, sondern durch die Transfektion von MSCs mit einer dominant negativen Mutante des Kollagen I therapeutische Erfolge erzielt werden [54]. Ebenso wurden retroviral modifizierte mesenchymale Stammzellen für die Gentherapie der Hämophilie A genutzt [315].

In der Tumorthherapie bieten mesenchymale Stammzellen den Vorteil, dass sie nicht nur als Vehikel für toxische oder immunstimulatorische Gene oder antiangiogenetische Moleküle dienen, sondern auch in der Lage sind durch ihre tumor-homing Eigenschaften in das Tu-

morgebiet einzudringen. Komarova et al. gelang es unter Nutzung adenoviraler Vektoren onkolytische Viren in Ovarialtumoren zu schleusen [316]. Studeny et al. konnten den inhibitorischen Effekt von IFN-beta auf malignes Zellwachstum nutzen, indem das humane IFN-beta Gen in einem adenoviralen Expressionsvektor geklont und in hMSCs transfiziert wurde [317].

Trotz der vielversprechenden therapeutischen Ansätze, müssen auch die Vor- und Nachteile der Gentherapie berücksichtigt werden. Neben dem Sicherheitsrisiko, Patienten mit viraler DNA zu therapieren, die sich in das Genom integriert, besteht das Problem, dass bei adenoviralen und auch adenoassoziierten Vektoren, die transgene Expression nur für kurze Zeit aufrecht erhalten werden kann. Bei adenoassoziierten Vektoren liegt die Expressionsdauer bei 2-3 Monaten, während sie bei adenoviralen Vektoren nur ca. 7-10 Tage beträgt [55]. Zusätzlich besteht eine starke Immunabwehr gegen Adenoviren, so dass eine wiederholte Gabe von adenoviral transfizierten Zellen nicht möglich ist. Die Immunabwehr gegen Adenoassoziierte Viren ist nicht so stark, allerdings besteht hier das Problem, dass die Vektorerstellung aufwendig ist, eine Virushelferfunktion benötigt wird und die Transfektionsraten weit unter denen des adenoviralen Systems liegen. Insgesamt erweist sich die Transfektion von Plasmid-DNA in primäre MSCs als schwierig. Mit traditionellen Transfektionsmethoden, wie Kalzium-Phosphat-Präzipitation, Lipofektion oder Elektroporation gelang eine Transfektionseffizienz von weniger als 1% mit hoher Zellmortalität [56]. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Transfektionsraten von AAV-Vektoren durch DNA-Synthese Inhibitoren (Hydroxyurea, Etoposid) und UV-Licht Bestrahlung erhöhen lassen [57,58]. Kommerziell erhältlich sind die Systeme NucleofectionTM und die auf Vibration basierende Transfektion mit SymphonizerTM. NucleofectionTM (Amaxa, Biosystems), kombiniert Elektroporation und eine spezifische Transfektionslösung. Es konnte gezeigt werden, dass hiermit eine Transfektionseffizienz von 80% in primären MSC möglich ist, mit einer Zellmortalität von 50%. Selbst nach drei Wochen war noch eine 10%ige Genexpression nachweisbar, was auf eine transiente Inkooperation des Plasmids in den Zellkern vermuten lässt [59]. Die Transfektion hatte ebenfalls keine Auswirkung auf das Differenzierungspotential der MSC, da transfizierte und untransfizierte Zellen sich gleichermaßen chondrogen differenzieren ließen.

Song und Tuan [60] konnten kürzlich nachweisen, dass eine Transfektion von MSC mit NucleofectionTM, unter Nutzung eines GFP-Plasmids mit Osteocalzin-Promotor, den Zellen einen osteoblastären Phänotyp verlieh, sogar unter Beibehaltung der Differenzierungskapazität. Diese Methode könnte somit geeignet sein effektiv funktionierende Gene in primäre MSC zu transfizieren, um diese dann für gentherapeutische oder regenerative Therapien zu nutzen.

Eine andere nicht-virale Transfektionsmethode, die auf der Nutzung elektrischer Felder induzierender molekularer Vibration, beruht (Gene SymphonizerTM (Molennium Inc., Japan)), zeigte, dass eine DNA Transfektion in Zelllinien, wie murine C3H10T1/2 Zellen und primäre Zellen (Chondrozyten, EMS, MSC) mit hoher Effizienz (20-80%) und geringer Zellmortalität, möglich ist [56]. Auch hier konnte keine Beeinträchtigung der normalen Zelldifferenzierungsaktivität in hMSC nachgewiesen werden. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass nicht nur Zellen *in vitro* mit exogener DNA transfiziert werden können, sondern dass auch ein direkter DNA-Transfer in das Zielgewebe/-organ *in vivo* möglich ist.

5.5.4 Tissue engineering

Für das Tissue Engineering werden immer wieder neue Materialien, natürliche und synthetische, getestet. Diese Materialien sollen die Zellen optimal in ihrer Funktion unterstützen, keine zytotoxischen Eigenschaften aufweisen und eine effektive Matrix für das Zellwachstum bieten. Fibrin bietet hMSC eine Oberfläche, auf der sie adhären können und die ihre Proliferationsmöglichkeiten nicht einschränkt. Zudem hat es den Vorteil, dass es degradierbar ist und somit keinen permanenten inflammatorischen Reiz im Gewebe darstellt [318]. Chitosan ermöglicht neben guten Adhärenz- und Proliferationsraten zusätzlich *in vivo* eine Anregung zur chondrogenen Differenzierung [319] und Kalzium-Metaphosphat ist für hMSC biokompatibel und leitet eine osteogene Differenzierung ein [320]. Neben diesen natürlichen Materialien werden auch synthetische in Kombination mit mesenchymalen Stammzellen untersucht. Hierzu gehören das PHBHHx (poly 3-hydroxybutyrat-co-3-hydroxyhexanoat) [321] und das Polyurethan [322]. Die Zahl der zur Verfügung stehenden Materialien ist groß und sie dienen nicht nur als Matrix für die Zellen, sondern können modifiziert werden, dass sie als Träger für Medikamente (drug delivery) dienen [323]. Durch Koppelung der Trägermaterialien an einen Mikrochip ist es möglich die Freisetzung der Pharmaka zu steuern [324] oder bei degradierbaren Materialien die Zusammensetzung so festzulegen, dass die Degradierungszeit vorherbestimmt werden kann [325].

Es werden immer aufwendigere Materialien hergestellt, die eine verbesserte Biokompatibilität und vorteilhafte Eigenschaften und Empfindlichkeiten versprechen (smart biomaterials) [326].

Tissue engierte mesenchymale Stammzellen werden in verschiedenen Tiermodellen angewendet. Ohne fundiertes Wissen über die Funktionen und Mechanismen von MSCs *in vivo*

bleibt es allerdings fraglich, ob die erzielten positiven Effekte nicht auch durch die Vordifferenzierung und lokale Gabe mesenchymaler Stammzellen möglich gewesen wäre.

Insgesamt lässt sich zur Stammzelltherapie sagen, dass es noch viele offene Fragen gibt, die es zu klären gilt. Solange nicht die molekularen und in vivo funktionellen Mechanismen mesenchymaler Stammzellen geklärt sind, sollte davon Abstand genommen werden die Zellen für therapeutische Zwecke einzusetzen.

6 Zusammenfassung

Mesenchymale Stammzellen sind durch ihre Eigenschaften der uneingeschränkten Selbsterneuerung und der Fähigkeit in verschiedene Zelllinien zu differenzieren, eine vielversprechende Quelle für die regenerative Medizin. Es besteht ein steigendes Interesse an ihrer Isolierung, Charakterisierung und ihrer Funktion *in vivo*. Es werden permanent neue Gewebe gesucht, aus denen die Isolierung mesenchymaler Stammzellen möglich ist, da sie nur in geringer Anzahl im Gewebe vorliegen und somit große Mengen an Spendergewebe benötigt wird, um ausreichend Zellen zu erhalten.

Zusätzlich gibt es bestimmte pathologische Zustände, bei denen es den Speicheldrüsen nicht mehr möglich ist zu regenerieren. Es kann nicht mehr genügend Speichel gebildet werden und eine Xerostomie entwickelt sich, die die Lebensqualität der betroffenen Patienten massiv einschränkt.

Ziel dieser Arbeit war es zu zeigen, dass die Speicheldrüsen eine Quelle für mesenchymale Stammzellen darstellen und außerdem ein klinisch leicht zugängliches Gewebe sind. Sowohl die Glandula parotidea, als auch die Glandula submandibularis erwiesen sich als geeignetes Gewebe für die Isolierung mesenchymaler Stammzellen. Das in dieser Arbeit etablierte Isolierungsprotokoll ermöglichte es zuverlässig größere Mengen MSCs zu erhalten, die in ihrer Morphologie ein homogenes Erscheinungsbild aufwiesen. In der FACS-Analyse der Zellen konnten Marker mesenchymaler Stammzellen detektiert und ein Fehlen hämatopoetischer Marker nachgewiesen werden. Die Zellen scheinen zusätzlich ein gewebespezifisches Expressionsprofil auszuweisen.

Die Differenzierung der Zellen in die osteogene, adipogene und chondrogene Zelllinie war für jede Probe möglich, wobei geringfügige Unterschiede bei den Zellen aus den unterschiedlichen Ursprungsgeweben nachzuweisen waren.

Die immunophänotypischen Charakteristika humaner primärer mesenchymaler Stammzellen aus der Glandula submandibularis konnten auch für die primären mesenchymalen Stammzellen aus murinem Submandibularisgewebe nachgewiesen werden. Dies waren grundlegende Voraussetzungen für die Etablierung eines radiogen induzierten Xerostomie-Mausmodels.

7 Summary

Cell-based strategies for regeneration of salivary glands

Mesenchymal stem cells are a promising cell source for biomedical applications such as tissue engineering or regenerative medicine, while their specific characteristics involve an unlimited capacity of self-renewal and the ability to differentiate into multiple cell lineages. There is a continuously growing interest in the isolation, characterisation and biology of stem cells. In this context, the isolation of stem cells from novel sources is important as the currently defined donor tissues have specific disadvantages like large donor site morbidity as well as the presence of stem cells in very small amounts requiring large amounts of donor tissue to be harvested.

The regeneration of salivary glands is disabled under certain pathological conditions e.g. as a result of radiation therapy for head and neck cancers. In this case saliva production is severely impaired and xerostomia results which massively restricts the quality of life of these patients.

Taking into account that salivary glands are a possible valuable and clinically applicable source of stem cells the aim of this study was the isolation, characterisation and differentiation of stem cells from normal adult human parotid and submandibular glands.

In this study we established a protocol that makes it possible to isolate a sufficient amount of mesenchymal stem cells from salivary gland tissue. The isolated cells were morphologically homogeneous and the fluorescence activated cell sorting-assays demonstrated mesenchymal stem cell marker and the absence of any hematopoietic marker at all. Additionally the mesenchymal stem cells seem to express a tissue specific marker profile.

Differentiation into the osteogenic, adipogenic and chondrogenic cell line was always possible.

These were the profound principles for the establishing of a mouse model for xerostomia.

8 Literaturverzeichnis

1. Parkin D.M., Pisani P., Ferlay J.; Global Cancer Statistics. *Ca. Cancer J. Clin.* 1999;49:33-64
2. Pisani P., Parkin D.M., Bray F., Ferlay J.; Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int. J. Cancer* 1999;83:18-29
3. Hoffman H.T., Hynds Karnell L., Funk G., Robinson R.A., Menck H.R.; The National Cancer Data Base Report on Cancer of the Head and Neck. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 1998;124:951-962
4. Steinberg J., Schwertner C., de Villiers E. M., Mir-Salim P., Kiesslich R., Stoelzel U., Scherübi H.; Coincidental Squamous cell cancer of the esophagus and head and neck: Risk and surveillance *Gastroenterol.* 2007; 45:710-714
5. Schlesinger-Raab A., Lang S., Steuer-Vogt M.K., Hölzel D.; Zur Epidemiologie der Kopf-Hals Malignome Tumorzentrum München und W. Zuckschwerdt Verlag München 2003
6. Anaya-Saavedra G., Ramirez-Amador V., Irigoyen-Camacho M. E., Garcia-Cuellar C. M., Guido-Jimenez M., Mendez-Martinez R., Garcia-Carranca A.; High association of human papillomavirus with oral cancer: a case-control study *Arch. Med. Res.* 2008; 39(2):189-97
7. Gillison M. L., D'Souza G., Westra W., Sugar E., Xiao W., Begum S., Viscidi R.; Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. *JNCI* 2008; 100(6):407-420
8. Applebaum K. M., Furniss C., Zeka A., Posner M. R., Smith J. F., Bryan J., Eisen E. A., Peters E. S., McLean M. D., Kelsey K.T.; Lack of association of alcohol and tobacco with HPV16-associated head and neck cancer. *JNCI* 2007; 99:1801-10
9. Krebs in Deutschland – Häufigkeiten und Trends. Herausgeber: Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. in Zusammenarbeit mit dem Robert Koch-Institut. 5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe 2006
10. Copper M.P., Jovanovic A., Nauta J.J.; Role of genetic factors in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 1995;121:157-160
11. Simon C., Plinkert P. K.; Multimodale Therapiestrategien bei der Behandlung von Kopf- und Halskarzinomen *HNO* 2008;56(6):575-584

12. Robbins K. T., Medina J. E., Wolfe G. T., Levine P. A., Sessions R. B., Pruet C. W.; Standardizing neck dissection terminology. Official report of the Academy's Committee for Head and Neck Surgery and Oncology *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 1991;117(6):601-5
13. Schäfer U., Schüller P., Micke O., Willich N.; Simultaneous radiochemotherapy versus concomitant boost radiation for advanced inoperable head and neck cancer *Acta. Oncol.* 2000;39(4):532-8
14. Schäfer U., Schmilowski G. M., Micke O., Mohring R., Willich N. A method of brachytherapeutic treatment of tracheal stroma recurrence in head and neck cancer *Br. J. Radiol.* 1996;69(820):348-50
15. Grimard L., Esche B., Lamothe A., Cygler J., Spaans J.; Interstitial low-dose-rate brachytherapy in the treatment of recurrent head and neck malignancies *Head Neck.* 2006;28(10):888-95
16. Lapeyre M., Bollet M. A., Racadot S., Geoffrois S., Kaminsky M. C., Dolivet G., Toussaint B., Luporsi E., Peiffert D.; Postoperative brachytherapy and combined postoperative radiotherapy and brachytherapy boost for squamous cell carcinoma of oral cavity, with positive or close margins *Head and Neck* 2004;26(3):216-23
17. Goodwin W.J. Jr.; Salvage Surgery for Patients With Recurrent Squamous Cell Carcinoma of the Upper Aerodigestive Tract: When Do the Ends Justify the Means? *The Laryngoscope* 2000;110:1-18
18. Forastiere A., Koch W., Trotti A., Sidransky D.; Head and Neck Cancer. *N. Engl. J. Med.* 2001;345:1890-1900
19. Braakhuis B.J.M., Leemans C.R., Brakenhoff R.H.; Expanding fields in genetically altered cells in head and neck squamous carcinogenesis *Seminars in Cancer Biology* 2005;15:113-120
20. Sagowski C., Wenzel S., Riehle I., Tesche S., Jenicke L., Zywiets F., Roeserand K., Metternich F.U.; Histomorphologic and salivary gland scintigraphic findings in radiation-induced fluorescence due to fractionated irradiation of the head and neck region of rats. A model for evaluating potentially radioprotective substances *HNO;* 52:25-32
21. Dirix P., Nuyts S., Van den Bogaert W.; Radiation-induced xerostomia in patients with head and neck cancer: a literature review *Cancer* 2006;107: 2525–2534

22. Dirix P., Nuyts S., Vander Poorten V.; The influence of xerostomia after radiotherapy on quality of life: Results of a questionnaire in head and neck cancer *Support Care Cancer* 2008 Feb;16(2):171-9
23. Fox P.C., Speight P.M.; Current concepts of autoimmune exocrinopathy: immunologic mechanisms in the salivary pathology of Sjogren's syndrome *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.* 1996;7:144-158
24. Fox R. I., Kang H., I.; Pathogenesis of Sjögren's Syndrome *Rheum. Dis. Clin. North. Am.* 1992;18: 517-538
25. Fox R. I., Michaelson P., Approaches to the treatment of Sjögren's Syndrome *J. Rheumatol. Suppl.* 2000; 61:15-21
26. Antonadou D., Pepelassi M., Synodinou M.; Prophylactic use of amifostine to prevent radiochemotherapy-induced mucositis and xerostomia in head-and-neck cancer *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2002;52:739-747
27. Buntzel J., Glatzel M., Mucke R.; Influence of amifostine on lateradiation-toxicity in head and neck cancer-a follow-up study *Anticancer Res.* 2007;27:1953-1956
28. Kouvaris J.R., Kouloulis V.E., Vlahos L.J.; Amifostine: the first selective-target and broad-spectrum radioprotector *Oncologist* 2007;12:738-747
29. Law A., Kennedy T., Pellitteri P.; Efficacy and safety of subcutaneous amifostine in minimizing radiation-induced toxicities in patients receiving combined-modality treatment for squamous cell carcinoma of the head and neck *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2007;69:534-540
30. Baum B.J., Wang S., Cukierman E.; Re-engineering the functions of a terminally differentiated epithelial cell in vivo *Ann. N Y Acad. Sci.* 1999;875:294-300
31. Seikaly H., Jha N., Harris J.R.; Long-term outcomes of submandibular gland transfer for prevention of postradiation xerostomia *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2004;130:956-961
32. Davies A.N., Shorthose K.; Parasympathomimetic drugs for the treatment of salivary gland dysfunction due to radiotherapy *Cochrane Database Syst Rev* 2007:Jul 18;(3):CD003782. Review.
33. Gregoire V., De Neve W., Eisbruch A.; Intensity-modulated radiation therapy for head and neck carcinoma *Oncologist* 2007;12:555-564
34. Al-Qahtani K., Hier M.P., Sultanum K., Black M.J.; The role of submandibular salivary gland transfer in preventing xerostomia in the chemoradiotherapy patient *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 2006;101:753-756

35. Jha N., Seikaly H., Harris J.; Prevention of radiation induced xerostomia by surgical transfer of submandibular salivary gland into the submental space *Radiother Oncol* 2003;66:283–289
36. Rieger J., Seikaly H., Jha N.; Submandibular gland transfer for prevention of xerostomia after radiation therapy: swallowing outcomes *Arch. Otolaryngol. Head. Neck Surg.* 2005;.31:140–145
37. Jacobsen N., Brennhovd I., Jonsen J.; Human submandibular gland tissue in culture 2. Nickel affinity to secretory proteins *J. Biol. Buccale* 1977;5:169–175
38. Jacobsen N., Brennhovd I., Jonsen J.; Human submandibular gland tissue in culture I. Sulphate incorporation and tissue culture technique *J. Biol. Buccale* 1977;5:159–167
39. Kurth B.E., Hazen-Martin D.J., Sens M.A., Sens D.A.; Ultrastructural and immunohistochemical characterization of submandibular duct cells in culture and modification of outgrowth differentiation by manipulation of calcium ion concentration *In Vitro Cell Dev. Biol.* 1988;24:593–600
40. Sens D.A., Hintz D.S., Rudisill M.T.; Explant culture of human submandibular gland epithelial cells: evidence for ductal origin *Lab. Invest.* 1985;52:559–567
41. Dardick I., Dardick A.M., MacKay A.J.; Pathobiology of salivary glands. IV. Histogenetic concepts and cycling cells in human parotid and submandibular glands cultured in floating collagen gels *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 1993;76:307–318
42. Chopra D.P., Xue-Hu I.C.; Secretion of alpha-amylase in human parotid gland fluorescent cell culture *J. Cell Physiol.* 1993;155:223–233
43. Sabatini L.M., Allen-Hoffmann B.L., Warner T.F., Azen E.A.; Serial cultivation of epithelial cells from human and macaque salivary glands *In Vitro Cell Dev. Biol.* 1991;27A:939–948
44. Bücheler M.; Entwicklung biotechnologischer Therapieverfahren für die kausale Behandlung der radiogenen Xerostomie *Laryngorhinootologie* 2001;80:637–638
45. Bücheler M., Bootz F.; Biotechnologisch hergestellte Speicheldrüsen-Organoiden German patent 1998, 1038495. Veröffentlichungsdatum: 02.03.2000
46. Bücheler M., Wirz C., Schütz A., Bootz F.; Tissue engineering of human salivary gland organoids *Acta. Otolaryngol.* 2002;122:541–545

47. Aframian D.J., Cukierman E., Nikolovski J.; The growth and morphological fluorescence of salivary epithelial cells on matrix protein-coated biodegradable substrata *Tissue Eng.* 2000;6:209–216
48. Shirasuna K., Sato M., Miyazaki T.; A neoplastic epithelial duct cell line established from an irradiated human salivary gland *Cancer* 1981;48:745–752
49. Mandel I.D.; The function of saliva *J. Dent. Res.* 1987;66:623-627
50. O’Connell A.C.; Natural history and prevention of radiation injury *Adv. Dent. Res.* 2000;14:57-61
51. Guggenheimer J., Moore P.A.; Xerostomia etiology, recognition and treatment *JADA* 2003;134:61-69
52. Gupta A., Epstein J.B., Sroussi H.; Hyposalivation in elderly patients *JCDA* 2006;72(9):841-846
53. Vissink A., Jansma J., Spijkervet F.K.L., Burlage F.R., Coppes R.P.; Oral sequelae of head and neck radiotherapy *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 2003;14(3):199-212
54. Chamberlain J.R., Schwarze U., Wang P.R., Hirata R.K., Hankenson K.D., Pace J.M., Underwood R.A., Song K.M., Sussman M., Byers P.H., Russell D.W.; Gene targeting in stem cells from individuals with osteogenesis imperfecta *Science* 2004;303:1198-1201
55. Vitolo J.M., Baum B.J.; The use of gene transfer for the protection and repair of Salivary glands *Oral Diseases* 2002;8:183-191
56. Song L., Chau L., Sakamoto Y., Nakashima J., Koide M., Tuan R.S.; Electric field-induced molecular vibration for noninvasive, high-efficiency DNA transfection *Mol. Ther.*, 2004;9:6007-616
57. Ju X., Lou S., Wang W., Peng J, Tian H.; Effect of fluorescence and etoposide on transduction of human bone marrow mesenchymal stem and progenitor cell by adeno-associated virus vectors *Acta. Pharmacol. Sin.* 2004;25(2):196-202
58. Ito H., Goater J.J., Tiyapatanaputi P., Rubery P.T., O’Keefe R.J., Schwarz E.M.; Light-activated gene transduction of recombinant adeno-associated virus in human mesenchymal stem *Gene Therapy* 2004;11:34-41
59. Simonsen J.L., Rosada Simonsen J.L., Rosada C., Serakinci N., Justesen J., Stenderup K., Rattan S.I., Jensen T.G., Kassem M.; Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells *Nat. Biotechnol.*, 2002;20:592-596

60. Song L., Tuan R.S; Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow *FASEB J.*2004;18:980-982
61. Blanpain C., Lowry W.E., Geoghegan A., Polak L., Fuchs E.; Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche *Cell.* 2004;118(5):635-648
62. Yamashita Y.M., Jones D.L., Fuller M.T.; Orientation of asymmetric stem cell division by the APC tumor suppressor and centrosome *Science* 2003;301(5639):1547-1550.
63. Wagers A., Weissman I.; Plasticity of adult stem cells *Cell* 2004;116:639-648
64. Evans M., Kaufman M.; Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos *Nature* 1981;9:154-156
65. Martin G.; Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1981;78:7634-7638
66. Thomson J.A., Kalishman J., Golos T.G.; Isolation of a primate embryonic stem cell line *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1995;92(17):7844-7848
67. Shambloott M.J., Axelman J., Wang S.; Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1998;95(23):13726-13731
68. Rathjen P.D., Lake J., Whyatt L.M., Bettess M.D., Rathjen J.; Properties and uses of embryonic stem cells: prospects for application to human biology and gene therapy *Reprod. Fertil. Dev.* 1998;10(1):31-47
69. Wobus A.M., Holzhausen H., Jakel P., Schoneich J.; Characterization of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo *Exp. Cell Res.* 1984;152(1):212-219.
70. Stevens LC.; The development of transplantable teratocarcinomas from intratesticular grafts of pre- and postimplantation mouse embryos *Dev. Biol.* 1970;21:364-82
71. Smith A.G., Heath J.K., Donaldson D.D., Wong G.G., Moreau J., Stahl M., Rogers D.; Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides *Nature* 1988;336:688-90
72. Wiles M.V.; Embryonic stem cell differentiation in vitro *Methods Enzymol.* 1993;225:900-18
73. Gearing D.P.; Comparison of factors which induce differentiation of the murine myeloid leukaemic cellline M1 *Haematol. Blood Transfus.* 1989;32:208-13

74. Williams R.L., Hilton D.J., Pease S., Willson T.A., Stewart C.L., Gearing D.P., Wagner E.F., Metcalf D., Nicola N.A., Gough N.M.; Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells *Nature* 1988;336:684-7
75. Andrews P.W.; Teratocarcinomas and human embryology: pluripotent human EC cell lines. Review article. *Apmis.* 1998;106(1):158-167
76. Kleinsmith L.J., Pierce G.B.; Multipotentiality of single embryonal carcinoma cells *Cancer Res.* 1964;24:1544-1551
77. da Silva Meirelles L., Chagastelles P.C., Nardi N.B.; Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues *J. Cell Sc.* 2006;119:2204-2213
78. Fuchs E., Tumber T., Guasch G.; Socializing with the neighbors: stem cells and their niche *Cell* 2004;116(6):769-778
79. Tumber T., Guasch G., Greco V., Blanpain C., Lowry W.L., Rendl M., Fuchs E.; Defining the epithelial stem cell niche in skin *Science* 2004 Jan 16;303(5656):359-63
80. Bjercknes M., Cheng H.; The stem-cell zone of the small intestinal epithelium. II. Evidence from paneth cells in the newborn mouse *Am. J. Anat.* 1981;160:65-75
81. Alonso L., Fuchs E.; Stem cells of the skin epithelium *Proc.Natl.Acad.Sci.U S A.* 2003;100 Suppl 1:11830-11835.
82. Alison M.; Hepatic stem cells *Transplant Proc.* 2002;34:2702-2705
83. Goh E., Ma D., Ming G., Song H.; Adult neural stem cells and repair of the adult central nervous system *J. Hematother. Stem Cell Res.* 2003;12:671-679
84. Alison M. R., Poulson R., Otto W.R.; Recipes for adult stem cell plasticity: fusion cuisine or readymade? *J. Clin. Pathol.* 2004;57:113-120
85. De Bari C., Dell'Accio F., Vandenabeele F.; Skeletal muscle repair by adult human mesenchymal stem cells from synovial membrane *J. Cell Biol.* 2003;17;160(6):909-18
86. McKinney-Freeman S.L., Jackson K.A., Camargo F.D.; Muscle-derived hematopoietic stem cells are hematopoietic in origin *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2002;99, 1341-1346
87. Terada N., Hamazaki T., Oka M.; Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion *Nature* 2002;416, 542-545
88. Ying Q.L., Nichols J., Evans E.P., Smith A.G.; Changing potency by spontaneous fusion *Nature* 2002;416,545-548

89. Spees J.L., Olson S.D., Ylostalo J.; Differentiation, cell fusion, and nuclear fusion during ex vivo repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2002;100:2397-2402
90. Lombaert I.M., Wierenga P.K., Kok T., Kampinga H.H., deHaan G., Coppes R.P.; Mobilization of bone marrow stem cells by granulocyte colony-stimulating factor ameliorates radiation-induced damage to salivary glands *Clin. Cancer Res.* 2006;12:1804-1812
91. Lombaert I.M., Brunsting J.F., Wierenga P.K., Faber H., Stokman M.A., Kok T., Visser H.H., Kampinga H.H., deHaan G., Coppes R.P.; Rescue of salivary gland function after stem cell transplantation in irradiated glands *PloS ONE* 2008;3(4):2063-2076
92. Denny P.C., Denny P.A.; Dynamics of parenchymal cell division, differentiation, and apoptosis in the young adult female mouse submandibular gland *Anat. Rec.* 1999;254:408-417
93. Man Y.G., Ball W.D., Marchetti L., Hand A.R.; Contributions of intercalated duct cells to the normal parenchyma of submandibular glands of adult rats *Anat. Rec.* 2001;263:202-214
94. Baum B.J.; Prospects for re-engineering salivary glands *Adv. Dent. Res.* 2000;14: 84-88
95. Baum B.J., O'Connell B.C.; In vivo gene transfer to salivary glands *Crit. Rev. Ora. Biol. Med.* 1999;10: 276-283
96. Delporte C., Miller G., Kagami H.; Safety of salivary gland-administered replication-deficient recombinant adenovirus in rats *J. Oral Pathol. Med.* 1998; 27: 34-38
97. Delporte C., O'Connell B.C., He X.; Adenovirus-mediated expression of Aquaporin-5 in epithelial cells *J. Biol. Chem.* 1996;271: 22070-22075
98. Agre P., Preston G.M., Smith B.L.; Aquaporin CHIP: the archetypal molecular water channel *Am. J. Physiol.* 1993;265: F463-F476
99. Agre P., Smith B.L., Baumgarten R.; Human red cell Aquaporin CHIP II. Expression during normal fetal development and in a novel form of congenital dyserythropoietic anemia *J. Clin. Invest.* 1994;94: 1050-1058
100. Wu A., Till J., Siminovich L., McCulloch E.; A cytological study of the capacity for differentiation of normal hemopoietic colony-forming cells *J. Cell Physiol.* 1967;69:177-184.

101. Wu A., Siminovitch L., Till J., McCulloch E.; Evidence for a relationship between mouse hemopoietic stem cells and cells forming colonies in culture *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1968;59:1209-1215
102. Till J., McCulloch E.; A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells; *Radiat. Res.* 1961;14:213-222
103. Siminovitch L., McCulloch E., Till J.; The distribution of colony-forming cells among spleen colonies *J. Cell Physiol.* 1963;62:327-336
104. Hart C., Drewel D., Mueller G., Grassinger J., Zaiss M., Kunz-Shughart L., Andreesen R., Reichle A., Holler E., Hennemann B.; Expression and function of homin-essential molecules and enhanced in vivo homing ability of human peripheral blood-derived hematopoietic progenitor cell after stimulation with stem cell factor *Stem cell* 2004;22:580-589
105. Ford C.E., Hamerton J.L., Barnes D.W., Loutit J.F.; Cytological identification of radiation-chimaeras *Nature* 1956;177(4506):452-454
106. Nowell P.C, Cole L.J., Habermeyer J.G., Roan P.L.; Growth and continued function of rat marrow cells in x-radiated mice *Cancer Res.* 1956;16(3):258-261.
107. Lewis J.P., Trobaugh F.E.J.; Hematopoietic stem cells *Nature* 1964;204:589-590
108. Curry J.L., Trentin J.J., Wolf N.; Hemopoietic spleen colony studies II Erythropoiesis *J. Exp. Med.* 1967;125(4):703-720
109. Krause D.S., Ito T., Fackler M.J.; Characterization of murine CD34, a marker for hematopoietic progenitor and stem cells *Blood* 1994;84(3):691-701
110. Spangrude G.J., Heimfeld S., Weissman I.L.; Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells *Science* 1988;241(4861):58-62
111. Bonnet D.; Haematopoietic stemcells *J. Pathol.* 2002;197:430-440
112. Civin C., Strauss L., Brovall C., Fackler M., Schwartz J., Shaper J.; Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells *J. Immunol.* 1984;133:157-165
113. Andrews R., Singer J., Bernstein I.; Precursors of colony-forming cells in humans can be distinguished from colony-forming cells by expression of the CD33 and CD34 antigens and light scatter properties *J. Exp. Med.* 1989;169:1721-1731
114. Healy L., May G., Gale K., Grosveld F., Greaves M., Enver T.; The stem cell antigen CD34 functions as a regulator of hemopoietic cell adhesion *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995;92:12240-12244

115. Fackler M., Krause D., Smith O., Civin C., May W.; Full-length but not truncated CD34 inhibits hematopoietic cell differentiation of M1 cells *Blood* 1995;85:3040-3047
116. Krause D., Fackler M., Civin C., May W.; CD34: structure, biology, and clinical utility *Blood* 1996;87:1-13
117. Fina L., Molgaard H., Robertson D.; Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells *Blood* 1990;75:2417-2426
118. Brown J., Greaves M., Molgaard H.; The gene encoding the stem cell antigen, CD34, is conserved in mouse and expressed in haemopoietic progenitor cell lines, brain, and embryonic fibroblasts *Int. Immunol.* 1991;3:175-184
119. Suzuki A., Andrew D., Gonzalo J. CD34-deficient mice have reduced eosinophil accumulation after allergen exposure and show a novel crossreactive 90-kD protein *Blood* 1996;87:3550-3562
120. Linneken D.; Early signalling pathways activated by c-kit in hematopoietic cells *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2000;31(10):1053-74
121. Machalinski B., Paczkowska E., Halasa M., Pabisiak K., Walczak M., Sienko J., Kozik W., Ostrowski M., Syrenicz A., Sulikowski T., Machalinska A.; Expression of stem cell markers on mononuclear cells derived from fluorescence cadaveric organ donors before and after disconnection the respirator *Transplant. Proc.* 2006;38:16-19
122. Shmelkov S.V., Butler JM., Hooper A.T., Hormigo A., Kushner J., Milde T., St. Clair R., Baljevic M., White I., Jin D.K., Chadburn A., Murphy A.J., Valenzuela D.M., Gale N.W., Thurston G., Yancopoulos G.D., D'Angelica M., Kemeny N., Lyden D., Rafii S.; CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors *J. Clin. Invest.* 2008 Jun;118(6):2021-4.
123. Song W., Li H., Tao K., Li R., Song Z., Zhang Q., Dou K.; Expression and clinical significance of stem cell marker CD133 in hepatocellular carcinoma *Int. J. Clin. Pract.* 2008 Aug;62(8):1212-8
124. Caplan A.; Mesenchymal stem cells *J. Orthop. Res.* 1991;9:641-650
125. Conget P., Minguell J.; Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells *J. Cell Physiol.* 1999;181:67-73.
126. Prockop D.; Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues *Science* 1997;276:71-74

127. Gronthos S., Zannettino A., Hay S.; Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow *J. Cell Sci.* 2003;116:1827-1835
128. Lazarus H., Haynesworth S., Gerson S., Rosenthal N., Caplan A.; Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use *Bone Marrow Transplant.* 1995;16:557-564
129. Friedenstein A.J., Gorskaja J.F., Kulagina N.N.; Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs *Exp. Hematol.* 1976;4:267-274
130. Pittenger M., Mackay A., Beck S.; Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells *Science* 1999;284:143-147
131. Woodbury D., Schwarz E., Prockop D., Black I.; Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons *J. Neurosci. Res.* 2000;61:364-370
132. Makino S., Fukuda K., Miyoshi S.; Cardiomyocytes can be generated from marrowstromal cells in vitro *J. Clin. Invest.* 1999;103:697-705
133. Wakitani S., Saito T., Caplan A.; Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine *Muscle Nerve* 1995;18:1417-1426.
134. Brazelton T.R., Rossi F.M., Keshet G.I., Blau H.M.; From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice *Science* 2000;290:1775–1779
135. Hermann A., Gastl R., Liebau S., Popa M.O., Fiedler J.; Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells *J. Cell Sci.* 2004;117:4411–4422
136. Woodbury D., Schwarz E.J., Prockop D.J., Black I.B.; Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons *J. Neurosci. Res.* 2000;61:364–370
137. Hu Y., Liao L., Wang Q.; Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human fetal pancreas *J. Lab. Clin. Med.* 2003;141, 342-349
138. Igura K., Zhang X., Takahashi K.; Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta *Cytotherapy* 2004;6, 543-553
139. Tsai M.S., Lee J.L., Chang Y.J., Hwang S.M.; Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol *Hum. Reprod.* 2004;19:1450-1456

140. Bieback K., Kern S., Kluter H., Eichler H.; Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood *Stem Cells* 2004;22:625-634
141. Djouad F., Bony C., Haupl T.; Transcriptional profiles discriminate bone marrow-derived and synovium-derived mesenchymal stem cells *Arthritis Res. Ther.* 2005;7:R1304-1315
142. De Bari C., Dell'Accio F., Tylzanowski P., Luyten F.P.; Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum.* 2001;44:1928-1942
143. Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H.; Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies *Tissue Eng.* 2001;7:211-228
144. Noth U., Osyczka A.M., Tuli R.; Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells *J. Orthop. Res.* 2002;20:1060-1069
145. Nakahara H., Dennis J.E., Bruder S.P., Haynesworth S.E., Lennon D.P., Caplan A.I.; In vitro differentiation of bone and hypertrophic cartilage from periosteal-derived cells *Exp. Cell. Res.* 1991;195:492-503
146. Fukuchi Y., Nakajima H., Sugiyama D., Hirose I., Kitamura T., Tsuji K.; Human placenta derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential *Stem Cells.*2004;22:649-658.
147. Lee O., Kuo T., Chen W., Lee K., Hsieh S., Chen T.; Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood *Blood* 2004;103:1669-1675
148. Mareschi K., Biasin E., Piacibello W., Aglietta M., Madon E., Fagioli F.; Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood *Haematologica.* 2001;86:1099-1100
149. Owen M., Friedenstein A.J.; Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors *Ciba. Found. Symp.* 1988;136:42-60
150. DiGirolamo C.M., Strokes D., Colter D., Phinney D.G., Class R., Prockop D.J.; Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with greatest potential to propagate and differentiate *Br. J. Haematol.* 1999;107:275-281
151. Colter D.C., Class R., Dgirolamo C.M., Prockop D.J.; Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000;97:3213-3218

152. Javason E.H., Colter D.C., Schwarz E.J., Prockop D.J.; Rat marrow stromal cells are more sensitive to plating density and expand more rapidly from single-cell-derived colonies than human marrow stromal cells *Stem cell* 2001;19:219-225
153. Peister A., Mellad J.A., Larson B.L., Hall B.M., Gibson L.F., Prockop D.J.; Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential *Blood* 2004;103:1662-1668
154. Martin D.R., Cox N.R., Hathcock T.L., Niemeyer G.P., Baker H.J.; Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow *Exp. Hematol.* 2002;30:879-886
155. in 't Anker P.S., Scherjon S.A., Kleijburg-van der Keur C.; Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation *Blood* 2003;102:1548-1549
156. Sun S., Guo Z., Xiao X.; Isolation of mouse marrow mesenchymal progenitors by a novel and reliable method *Stem cell* 2003;21:527-535
157. Haynesworth S.E., Baber M.A., Caplan A.I.; Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies *Bone* 1992;13:69-80
158. Kobune M., Kawano Y., Ito Y.; Telomerized human multipotent mesenchymal cells can differentiate into hematopoietic and cobblestone area-supporting cells *Exp. Hematol.* 2003;31:715-722
159. Rombout W.J., Ploemacher R.E.; Primary murine MSC show highly efficient homing ability following culture *Leukemia* 2003;17:160-170
160. Kolf C.M., Cho E., Tuan R.S.; Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation on niche, self-renewal and differentiation *Arthritis. Res. Ther.* 2007;9(1):204. Review.
161. Devine S.M., Bartholomew A.M., Mahmud N.; Mesenchymal stem cells are capable of homing to the bone marrow of non-human primates following systemic infusion *Exp. Hematol.* 2001;29:244-255
162. Devine S.M., Cobbs C., Jennings M., Bartholomew A., Hoffman R.; Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates *Blood* 2003;101:2999-3001
163. Chen J., Sanberg P.R., Li Y.; Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces \square luorescence deficits after stroke in rats *Stroke* 2001;32:2682-2688

164. Laflamme M.A., Murry C.E.; Regenerating the heart *Nat. Biotechnol.* 2005;23:845-856
165. Barbash I.M., Chouraqui P., Baron J., Feinberg M.S., Etzion S., Tessone A., Miller L., Guetta E., Zipori D., Kedes L.H., Kloner R.A., Leor J.; Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution *Circulation* 2003;108:863-868
166. Jiang W.H., Ma A.Q., Zhang Y.M., Han K., Liu Y., Zhang Z.T., Wang T.Z., Huang X., Zheng X.P.; Migration of intravenously grafted mesenchymal stem cells to injured heart in rats *Sheng Li Xue Bao* 2005;57:566-572.
167. Mina-Osorio P., Winnicka B., O'Connor C., Grant C.L., Vogel L.K., Rodriguez-Pinto D., Holmes K.V., Ortega E., Shapiro L.; CD13 is a novel mediator of monocyte/endothelial cell adhesion *J. Leukoc. Biol.* 2008 Aug;84(2):448-59
168. Campos L.S., Leone D.P., Relvas J.B., Brakebusch C., Fässler R., Suter U., ffrench-Constant C.; Beta-1 integrin activate a MAPK signalling pathway in neural stem cells that contribute to their maintenance *Development* 2004;131(14):3433-44
169. Nelson A.D., Grandis J.R.; The Role of CD44 in HNSCC *Cancer Biology & Therapy* 2007;6:125-126
170. Choi C.H., Roh C.R., Kim T.J., Choi Y.L., Lee J.W., Kim B.G., Lee J.H., Bae D.S.; Expression of CD44 adhesion molecules on human placenta *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2006;128:243-247
171. Yang L., Froio R.M., Sciuto T.E., Dvorak A.M., Alon R., Luscinskas F.W.; ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF-alpha vascular endothelium under flow *Blood* 2005;106(2):584-592
172. Resta R., Thompson L.F.; T cell signalling through CD73 *Cell Signal.* 1997;9(2):131-139
173. Rege T.A., Hagwood J.S.; Thy-1 as regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis *FASEB* 2006;20:1045-1054
174. Fronsatti E., Maio M.; Highlights on Endoglin (CD105): from basic findings towards clinical application in human cancer *Journal of translational Medicine* 2004;2(1):18
175. Barry F., Boynton R., Haynesworth S., Murphy J., Zaia J.; The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on Endoglin (CD105) *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;265:134-139

176. Melendez N.D., Smoller R., Morgan M.D.; VCAM (CD-106) and ICAM (CD-54) adhesion molecules distinguish keratoacanthomas from cutaneous squamous cell carcinomas *Mod Pathol* 2003;16(1):8-13
177. Steer E.J., Cross N.C.P.; Myeloproliferative disorders with translocations of chromosome 5q31-35: role of the platelet-derived growth factor receptor beta *Acta. Haematol.* 2002;107:113-122
178. van Kempen L.C., Nelissen J.M., Degen W.G., Torensma R., Weidle U.H., Bloemers H.P., Figdor C.G., Swart G.W.; Molecular Basis for the Homophilic Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule (ALCAM)-ALCAM Interaction *J Biol Chem.* 2001 Jul 13;276(28):25783-90
179. Muraglia A., Cancedda R., Quarto R.; Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiates *in vitro* according to a hierarchical model *J. Cell Sci.* 2000;113(7):1161-1166
180. Baksh D., Song L., Tuan R.S.; Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J. Cell Mol. Med.* 2004;8:301-316
181. Bensidhoum M., Chapel A., Francois S., Demarquay C.; Mazurier C., Fouillard L., Bouchet S., Bertho J.M., Gourmelon P., Aigueperse J., Charbord P., Gorin N.C., Thierry D., Lopez M.; Homing of *in vitro* expanded Stro-1- or Stro-1+ human mesenchymal stem cells into the NOD/SCID mouse and their role in supporting human CD34 cell engraftment *Blood* 2004;103(9):3313-3319
182. Bruder S.P., Ricalton N.S., Boynton R.E., Connolly T.J., Jaiswal N., Zaia J., Barry F.P.; Mesenchymal stem cell surface antigen SB-10 corresponds to activated leukocyte cell adhesion molecule and is involved in osteogenic differentiation *J. Bone Miner. Res.* 1998;13:655-663
183. Tocci A., Forte L.; Mesenchymal stem cell: use and perspectives *The Hematology Journal* 2003;4:92-96
184. Rosen E.D., Spiegelman B.M.; Molecular regulation of adipogenesis *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 2000;16:145-171
185. Green H., Kehinde O.; An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion *Cell* 1975;5:19-27
186. Mandrup S., Lane M.D.; Regulating adipogenesis *J. Biol. Chem.* 1997;272:5367-5370

187. Rosen E.D.; The molecular control of adipogenesis, with special reference to lymphatic pathology *Ann. N Y Acad. Sci.* 2002;979:143-158; discussion 188-196
188. Rosen E.D.; The transcriptional basis of adipocyte development. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 2005;73:1-34
189. Fu Y., Luo N., Klein R.L., Garvey W.T.; Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation. *J. Lipid. Res.* 2005;46:1369-1379
190. Lehninger A.L.; Prinzipien der Biochemie, 2 nd Edition 1994 (Heidelberg, Spektrum akademischer Verlag), 751-754, 861, 862, 867
191. Schoonjans K., Auwerx J.; Thiazolidinediones: an update *Lancet* 2000;355:1008-1010
192. Hamm J.K., Jack A.K., Pilch P.F., Farmer S.R.; Role of PPAR gamma in regulating adipocyte differentiation and insulin-responsive glucose uptake. *Ann. N Y Acad. Sci.* 1999;892:134-145
193. Laneuville O., Breuer D.K., Dewitt D.L.; Differential inhibition of human prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 by nonsteroidal anti-inflammatory drugs *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1994;271:927-934
194. Tuan R.S., Boland G., Tuli R.; Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering *Arthritis Research and Therapy* 2002;5(1):32-45
195. Kirn-Safran C.B., Gomes R.R., Brown A.J., Carson D.D.; Heparan sulfate proteoglycans: coordinators of multiple signaling pathways during chondrogenesis *Birth Defects Res. C. Embryo Today* 2004;72(1):69-88
196. Buckwalter J.A., Mankin H.J.; Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions *Instr. Course Lect.* 1998;47:477-486
197. Tuan R.S.; Biology of developmental and regenerative skeletogenesis *Clin. Orthop. Relat. Res.* 2004;427:105-117
198. Hall B.K., Miyake T.; All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development *Bioessays* 2000;22:138-147
199. Healy C., Uwanogho D., Sharpe P.T.; Regulation and role of Sox9 in cartilage formation *Dev. Dyn.* 1999;215:69-78
200. Goldring M.B., Tsuchimochi K., Ijiri K.; The control of chondrogenesis *J Cell Biochem* 2006;97:33-44
201. Kim I.S., Otto F., Zabel B., Mundlos S.; Regulation of chondrocyte differentiation by Cbfa1 *Mech. Dev.* 1999;80:159-170

202. Provot S., Schipani E.; Molecular mechanisms of endochondral bone development *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005;328:658-665
203. Archer C.W., Dowthwaite G.P., Francis-West P.; Development of synovial joints *Birth Defects Res. C. Embryo Today* 2003;69:144-155
204. Girkontaite I., Frischholz S., Lammi P.; Immunolocalization of type X collagen in normal fetal and adult osteoarthritic cartilage with monoclonal antibodies *Matrix Biol.* 1996;15:231-238
205. Johnstone B., Hering T.M., Caplan A.I., Goldberg V.M., Yoo J.U.; In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells *Exp. Cell Res.* 1998;238:265-272
206. Sekiya I., Vuoristo J.T., Larson B.L., Prockop D.J.; In vitro cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2002;99:4397-4402
207. Barry F., Boynton R.E., Liu B., Murphy J.M.; Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components *Exp. Cell Res.* 2001;268:189-200
208. Hall B.K., Miyake T.; Divide, accumulate, differentiate: cell condensation in skeletal development revisited *Int. J. Dev. Biol.* 1995;39:881-893
209. Aubin J.E.; Regulation of osteoblast formation and function *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 2001;2:81-94
210. Caplan A.I.; Mesenchymal stem cells *J. Orthop. Res.* 1991;9:641-650
211. Bruder S.P., Horowitz M.C., Mosca J.D., Haynesworth S.E.; Monoclonal antibodies reactive with human osteogenic cell surface antigens *Bone* 1997;21:225-235
212. Manolagas S.C.; Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis *Endocr. Rev.* 2000;21:115-137
213. Aubin J.E., Liu F., Malaval L., Gupta A.K.; Osteoblast and chondroblast differentiation *Bone* 1995;17(2):77S-83S
214. Otto F., Thornell A.P., Crompton T.; Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development *Cell* 1997;89:765-771

215. Komori T., Yagi H., Nomura S.; Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts *Cell* 1997;89:755-764
216. Liu W., Toyosawa S., Furuichi T.; Overexpression of *Cbfa1* in osteoblasts inhibits osteoblast maturation and causes osteopenia with multiple fractures *J. Cell Biol.* 2001;155:157-166
217. Ducky P., Starbuck M., Priemel M.A.; *Cbfa1*-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development *Genes Dev.* 1999;13:1025-1036
218. Kobayashi, T., Kronenberg H.M Minireview: transcriptional regulation in development of bone *Endocrinology* 2005;146:1012-1017
219. Ducky P.; *Cbfa1*: a molecular switch in osteoblast biology *Dev. Dyn.* 2001;219:461-471
220. Zelzer E., Glotzer D.J., Hartmann C.; Tissue specific regulation of VEGF expression during bone development requires *Cbfa1/Runx2* *Mech. Dev.* 2001;106:97-106
221. Hong J.H., Hwang E.S., McManus M.T.; TAZ, a transcriptional modulator of mesenchymal stem cell differentiation *Science* 2005;309:1074-1078
222. Nakashima K., Zhou X., Kunkel G.; The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation *Cell* 2002;108:17-29
223. Gong Y., Slee, R.B., Fukai N.; LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development *Cell* 2001;107:513-523
224. Hu H., Hilton M.J., Tu X.; Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast developmen. *Development* 2005;132:49-60
225. Jaiswal N., Haynesworth S.E., Caplan A.I.;Bruder S.P.; Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro *J. Cell Biochem.* 1997;64:295-312
226. Bellows C.G., Heersche J.N., Aubin J.E.; Determination of the capacity for proliferation and differentiation of osteoprogenitor cells in the presence and absence of dexamethasone *Dev. Biol.* 1986;140:132-138
227. Beresford J.N., Graves S.E., Smoothy C.A.; Formation of mineralized nodules by bone derived cells in vitro: a model of bone formation? *Am. J. Med. Genet.* 1993;45:163-178

228. Barry F., Boynton R., Murphy M., Zaia J.; The SH-3 and SH-4 antibodies recognize distinct epitopes on CD73 from human mesenchymal stem cells *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001;289:519-524
229. Koide Y., Morikawa S., Mabuchi Y., Muguruma Y., Hiratsu E., Hasegawa K., Kobayashi M., Ando K., Kinjo K., Okano H., Matsuzaki Y.; Two distinct stem cell lineages in murine bone marrow *Stem Cell* 2007;25:1213-1221
230. Haynesworth S.E., Goshima J., Goldberg V.M.C., Caplan A.I.; Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow *Bone* 1992;13:81-88
231. Rodriguez A.M., Elabd C., Delteil F., Astier J., Vernochet C., Saint-Marc P.; Adipocyte differentiation of multipotent cells established from human adipose tissue *Biochem. Res. Commun.* 2004 315:255-263
232. Lee O.K., Kuo T.K., Chen W.M., Lee K.D., Hsieh S.L., Chen T.H.; Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood *Blood* 2004;103:1669-1675
233. Kramer J., Böhrnsen F., Lindner U., Behrens P., Schlenke P., Rohwedel J.; In vivo matrix-guided mesenchymal stem cells *Cell. Mol. Life Sci.* 2006 63:616-626
234. Takeda I., Kizu Y., Yoshitaka O., Saito I., Yamane G.; Possible role of nitric oxide in radiation-induced salivary gland dysfunction *Radiation Research* 2003;159(4):465-470
235. Muhvic-Urek M., Bralic M., Pezelj-Ribaric S., Borcic J., Tomac J.; Imbalance between apoptosis and proliferation causes late radiation damage in salivary gland in mouse *Physiol. Res.* 2006;55:89-95
236. Vissink A., 's-Gravenmade E.J., Ligeon E.E., Konins A.W.; Effects of split-dose X irradiation on rat salivary gland function *Radiat. Res.* 1991;127(1):52-57
237. Hakim S.G., Lauer I., Nadrowitz R., Berndt A., Kosmehl H., Sieg P.; Redistribution of tenascin-C in the parotid acinar cells. An early marker of radiation-induced damage of salivary glands? *AnticancerRes.* 2004;24(5A):2841-2846
238. Muhvic-Urek M., Bralic M., Borcic J., Tomac J., Uhac I., Glazer I., Antonica R., Ferreria S.; Early and late effects of x-irradiation on submandibular gland: a morphologic study in mice *Medical Res.* 2005;36:339-343
239. Tatsumi K., Otani H., Sato D., Enoki C., Iwasaka T., Imamura H., Taniuchi S., Kaneko K., Adachi Y., Ikehara S.; Granulocyte-colony stimulating factor increases Donor mesenchymal stem cells in bone marrow and their mobilization into periph-

- eral circulation but does not repair dystrophic heart after bone marrow transplantation *Circ. J.* 2008;72:1351-1358
240. Arai F., Hirao A., Ohmura M., Sato H., Matsuoka S., Takubo K., Ito K., Koh G.Y., Suda T.; Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche *Cell* 2004;118: 149-161
241. Brittan M, Wright NA The gastrointestinal stem cell *Cell Prolif.* 2004;37(1):35-53
Review
242. Brittan M, Wright NA Gastrointestinal stem cells. *J. Pathol.* 2002;197(4):492-509
243. Leri A., Kajstura J. Anversa P.; Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration *Physiol. Rev.* 2005;85:1373-1416
244. Kim C.F., Jackson E.L., Woolfenden A.E., Lawrence S., Babar I., Vogel S., Crowley D., Bronson R.T., Jacks R.; Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer *Cell* 2005;121:823-835
245. Lavker R.M., Tseng S.C., Sun T.T.; Corneal epithelial stem cells at the limbus: looking at some old problems from a new angle *Exp. Eye. Res.* 2004;78:433-446
246. Tumber T., Guasch G., Greco V., Blanpain C., Lowry W.E., Rendl M., Fuchs E.; Defining the epithelial stem cell niche in skin *Science* 2004;303:359-363
247. Seaberg R.M., Smukler S.R., Kieffer T.J., Enikolopov E., Asghar Z., Wheeler M.B., Korbitt G., van der Kooy D.; Clonal identification of multipotent precursors from adult mouse pancreas that generate neural and pancreatic lineages *Nat. Biotechnol.* 2004;22:1115-1124
248. Seeberger K.L., Dufour J.M., Shapiro A.M., Lakey J.R., Rajotte R.C., Korbitt G.S.; Expansion of mesenchymal stem cells from human pancreatic ductal epithelium *Lab. Invest.* 2006;86:141-153
249. Kruse C., Kajahn J., Petschnik A.E., Maass A., Klink E., Rapoport D.H., Wedel T.; Adult pancreatic stem/progenitor cells spontaneously differentiate in vitro into multiple cell lineages and form teratoma-like structures *Ann. Anat.* 2006;188:503-517
250. Golding M., Sarraf C.E., Lalani E.N., Anilkumar T.V., Edwards R.J., Nagy P., Thorgeirsson S.S., Alison M.R.; Oval cell differentiation into hepatocytes in the acetylaminofluorene-treated regenerating rat liver *Hepatology* 1995;22:1243-1253
251. Shackleton M., Vaillant F., Simpson K.J., Stingl J., Smyth G.K., Asselin-Labat M.L., Wu L., Lindeman G.J., Visvader J.E.; Generation of a functional mammary gland from a single stem cell *Nature* 2006;439:84-88

252. Okumura K., Nakamura K., Hisatomi Y., Nagano K., Tanaka Y., Terada K., Sugiyama T., Umeyama K., Matsumoto K., Yamamoto T., Endo F.; Salivary gland progenitor cells induced by duct ligation differentiate into hepatic and pancreatic lineages *Hepatology* 2003;38: 104-113
253. Hisatomi Y., Okumura K., Nakamura K., Matsumoto S., Satoh A., Nagano K., Yamamoto T., Endo F.; Flow cytometric isolation of endodermal progenitors from mouse salivary gland differentiate into hepatic and pancreatic lineages *Hepatology* 2004;39:667-675
254. Kishi T., Takao T., Fujita K., Taniguchi H.; Clonal proliferation of multipotent stem/progenitor cells in the neonatal and adult salivary glands *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006;340:544-552
255. da Silva Meirelles L., Caplan A.I., Nardi N.B.; In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells *Stem Cell* 2008;26(9):2287-99
256. Javason E.H., Beggs K.J., Flake A.W.; Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging *Experimental Hematology* 2004;32(5):414-25, Review
257. Bobis S., Jarocha D., Majka M.; Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications *Folia Histochemica et Cytobiologica* 2006;44(4):215-230
258. Le Blanc K., Ringden O.; Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience *J Intern Med.* 2007 Nov;262(5):509-25, Review
259. Caplan A.I., Bruder S.P.; Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century *Trends in molecular Medicine* 2001;7(6):259-264
260. Caplan A.I., Dennis J.E.; Mesenchymal stem cells as trophic mediators *Journal of cellular Biochemistry* 2006;98:1076-1084
261. Caplan A.I.; Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine *J. Cell Physiol.* 2007 Nov;213(2):341-7, Review
262. Alhadlaq A., Mao J.J.; Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics *Stem Cells and Development* 2004;13:436-448
263. Kassem M., Abdallah B.M.; Human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells: biological characteristics and potential role in therapy of degenerative diseases *Cell Tissue Res.* 2008;331:157-163
264. Bruder S.P., Jaiswal N., Haynesworth S.E.; Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation *J. Cell Biochem.* 1997;64:278-294

265. Colter D.C., Sekiya I., Prockop D.J.; Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2001;98:7841-7845
266. Dennis J.E., Merriam A., Awadallah A., Yoo J.U., Johnstone B., Caplan A.I.; A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse *J. Bone Miner. Res.* 1999;14(5):700-9
267. Jaiswal N.; Differentiation of human mesenchymal stem cells by transforming growth factor β superfamily: expression of osteoblast phenotype by BMP-2 and BMP-4 *J. Bone Miner. Res.* 2000;14:240
268. Stenderup K., Justesen J., Clausen C., Kassem M.; Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells *Bone* 2003;33:919-926
269. Mckee J.A., Banik S.S., Boyer M.J., Hamad N.M., Lawson J.H., Niklason L.E., Counter C.M.; Human arteries engineered in vitro *EMBO* 2003;4:633-638
270. McBride C., Gaupp D., Phinney D.G.; Quantifying levels of transplanted murine and human mesenchymal stem cells *In vivo* by real-time PCR *Cytotherapy* 2003;5:7-18
271. Friedenstein A.J., Chailakhjan R.K., Lalykina K.S.; The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells *Cell Tissue Kinet* 1970;3(4):393-403
272. Buhning H.J., Battula V.L., Tremel S., Schewe B., Kanz L., Vogel W.; Novel markers for the prospective isolation of human MSC *Ann. N Y Acad. Sci.* 2007;1106:262-271
273. Alsalameh S., Amin R., Gemba T., Lotz M.; Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage *Arthritis Rheum.* 2004;50:1522-1532
274. Honczarenko M., Lee Y., Skierkowski M., Ghiran I., Glodek A.M., Silberstein L.E.; Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors *Stem Cells* 2006;24:1030-1041
275. Ogbureke K.U., Fisher L.W.; SIBLING expression patterns in duct epithelia reflect the degree of metabolic activity *J. Histochem. Cytochem.* 2007;55:403-409
276. Ogbureke K.U., Fisher L.W.; Expression of SIBLINGs and their partner MMPs in salivary glands *J. Dent. Res.* 2004;83(9):664-670

277. Asaka M., Ohta K., Muramatsu T., Kurokawa M., Kizaki H., Hashimoto S., Shimono M.; The expression and localization of Osteopontin in the mouse major salivary glands *Arch. Histol. Cytol.* 2006;69(3):181-188
278. Brown L.F., Berse B., Van de Water L., Papadopoulos-Sergiou A., Perruzzi C.A., Manseau E.J., Dvorak H.F., Senger D.R.; Expression and distribution of Osteopontin in human tissues:widespread association with luminal epithelial surfaces *Molecular Biology of the cell* 1992;3:1169-1180
279. Kusafuka K., Yamaguchi A., Kayano T., Takemura T.; Expression of bone matrix proteins, osteonectin, and osteopontin, in salivary pleomorphic adenoma *Pathol. Res. Pract.* 1999;195(11):733-739
280. Verfaillie C.M.; Anatomy and physiology of hematopoiesis, Hematology – basic principles and practice, 3rd ed. Philadelphia: Churchill-Livingstone; 2000:139-154.
281. Braun K.M., Niemann C., Jensen U.B.; Manipulation of stem cell proliferation and lineage commitment: visualisation of label-retaining cells in wholemounts of mouse epidermis *Development* 2003;130:5241-5255
282. Gould E., Reeves A.J., Graziano M.S.A.; Neurogenesis in the neocortex of adult primates *Science* 1999;286:548-552
283. Rochefort G.Y., Delorme B., Lopez A.; Multipotential mesenchymal stem cells are mobilized into peripheral blood by hypoxia. *Stem Cells* 2006;24:2202-2208
284. Rosova I., Dao M., Cappocia B., Link D., Nolte J.A.; Hypoxic preconditioning results in increased mobility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells *Stem Cells* 2008 Aug;26(8):2173-82
285. He Q., Wan C., Li G.; Concise Review: multipotent mesenchymal stromal stem cells in blood *Stem Cells* 2007;25(1):69-77
286. Devine S.M., Hoffman R.; Role of mesenchymal stem cell in hematopoietic stem cell transplantation *Curr. Opin. Hematol.* 2000;7:358-363
287. Boiret N., Rapatel C., Veyrat-Masson R., Guillouard L., Guérin J.-J., Pigeon P., Descamps S., Boisgard S., Berger M.G.; Characterization of nonexpanded mesenchymal progenitor cells from normal adult human bone marrow *Exp. Hematol.* 2005;33:219-225
288. Dazzi F., Ramasamy R., Glennie S., Jones S.P., Roberts I.; The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis *Blood* 2006;Rev 20:161-171

289. Katz A.J., Tholpady A., Tholpady S.S., Shang H., Ogle R.C.; Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells *Stem Cells* 2005;23:412-423
290. Muguruma Y., Yahata T., Miyatake H., Sato T., Uno T., Itoh J., Kato S., Ito M., Hotta T., Ando K.; Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow compartment *Blood* 2006;107:1878-87
291. Penna C., Raimondo S., Ronchi G., Rastaldo R., Mancardi D., Capello S., Losano G., Geuna S., Pagliaro P.; Early homing of adult mesenchymal stem cells in normal and infarcted isolated beating hearts *J. Cell. Mol. Me.* 2008;2:507-521
292. Fibbe W.E., Noort W.A.; Mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells transplantation *Ann. NY Acad. Sci.* 2003;996:235-244
293. Koc O.N., Gerson S.L., Cooper B.W., Dyhouse S.M., Haynesworth S.E., Caplan A.I., Lazarus H.M.; Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy *J. Clin. Oncol.* 2000;18:307-316
294. Krampera M., Pasini A., Rigo A., Scupoli M.T., Tecchio C., Malpeli G., Scarpa A., Dazzi F., Pizzolo G., Vinante F.; HB-EGF/HER-1 signaling in bone marrow mesenchymal stem cells: inducing cell expansion and preventing reversibly multilineage differentiation *Blood* 2005;106:59-66
295. Pak H.-N., Qayyum M., Kim D.T., Hamab E.A., Miyauchi Y., Lill M.C., Frantzen M., Takizawa K., Chen L.S., Fishbein M.C., Sharifi B.G., Chen P.-S., Makkar R.; Mesenchymal stem cell injection induces cardiac nerve sprouting and increased tenascin expression in a swine model of myocardial infarction *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 2003;14:841-848
296. Rasmusson I., Ringden O., Sundberg B.; Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells *Transplantation* 2003;76:1208-1213
297. Spaggiari G.M., Capobianco A., Becchetti S.; Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK cell proliferation *Blood* 2006;107:1484-1490

298. Le Blanc K., Tammik L., Zetterberg E., Ringde'n O.; HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells *Exp. Haematol.* 2003;31:890–6
299. Lazarus H.M.; Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use *Bone Marrow Transplant.* 1995;16:557–564
300. Lieberman J.R.; Regional gene therapy with a BMP-2-producing murine stromal cell line induces heterotopic and orthotopic bone formation in rodents *J. Orthop.Res.* 1998;16:330–339
301. Richardson S.M., Walker R.V., Parker S., Rohdes N.P., Hunt J.H., Freemont A.J., Hoyland J.A.; Intervertebral disc cell-mediated mesenchymal stem cell differentiation *Stem Cells* 2006;24:707-716
302. Sakai D., Mochida J., Iwashina T., Watanabe T., Makai T., Ando K., Hotta T.; Differentiation of mesenchymal stem cell therapy in disc regeneration *Spine* 2005;30:2379-87
303. Murphy J.M., Fink D.J., Hunziker E.B., Barry F.P.; Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis *Arthritis Rheum.* 2003;48:3464-3474
304. Lee K.H., Kim S.H., Choi J.S., Jeun S.S., Kim J.E., Kim S.S., Yoon D.H., Lee B.W.; Human mesenchymal stem cell transplantation promotes functional recovery following acute spinal cord injury in rats *Acta. Neurobiol. Exp.* 2007;67:13-22
305. Wu Y., Chen L., Scott P.G., Tredget E.E.; Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis *Stem Cells* 2007 Oct;25(10):2648-59
306. Chen L., Tredget E.E., Wu P.Y.G., Wu Y.; Paracrine factors of mesenchymal stem cell recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing *PLoS ONE* 2008 Apr 2;3(4):e1886
307. Lee S.T., Jang J.H., Cheong J.W.; Treatment of high-risk acute myelogenous leukaemia by myeloablative chemoradiotherapy followed by co-infusion of T cell-depleted haematopoietic stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells from a related donor with one fully mismatched human leucocyte antigen haplotype *Br. J. Haematol.* 2002;118:1128–31
308. Le Blanc K., Samuelsson H., Gustafsson B., Remberger M., Sundberg B, Arvidson J, Ljungman P, Lönnies H, Nava S, Ringdén O.; Transplantation of mesenchymal

- stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells *Leukemia* 2007 Aug;21(8):1733-8
309. Le Blanc K., Rasmusson I., Sundberg B., Gotherstrom C., Hassan M., Unznel M., Ringden O.; Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells *Lancet* 2004;363:1439-1441
310. Park S.K., Won J.H., Kim H.J., Bae S.B., Kim C.K., Lee K.T., Lee N.S., Lee Y.K., Jeong D.C., Chung N.G., Kim H.S., Hong D.S., Park H.S.; Co-transplantation of human mesenchymal stem cells promotes human CD34-positive cells engraftment in dose-dependant fashion in NOD/SCID mice *J. Korean Med. Sci.* 2007;22:412-9
311. Polchert D., Sobinsky J., Douglu G.W., Kidd M., Moadsiri A., Reina E., Genrich K.; IFN-gamma activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft-versus-host disease *Eur J Immunol.* 2008 Jun;38(6):1745-55
312. Horwitz E.M., Prockop D.J., Fitzpatrick L.A.; Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta *Nat. Med.* 1999; 5:309-13
313. Horwitz E.M., Prockop D.J., Gordon P.L.; Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta *Blood* 2001;97:1227-31
314. Horwitz E., Gordon P., Koo W.; Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2002;99:8932-7
315. Doering B.D.; Retroviral modification of mesenchymal stem cells for gene therapy of hemophilia A *Methods in Molecular Biology* 2008;433(1):203-212
316. Komarova S., Kawakami Y., Stoff-Khalili M.A., Curiel D.T., Pereboeva L.; Mesenchymal progenitor cells as cellular vehicles for delivery of oncolytic adenoviruses *Mol. Cancer. Ther.* 2006;5(3):755-766
317. Studeny M., Marini F.C., Dembinski J.L., Zompetta C., Cabreira-Hansen M., Bek-ele B.N., Champlin R.E., Andreeff M.; Mesenchymal stem cells:potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents *Journal of National Cancer Institute* 2004;96(21):1593-1603
318. Bensaid W., Triffitt J.T., Blanchat C., Oudina K., Sedel L., Petite H.; A biodegradable fibrin scaffold for mesenchymal stem cell transplantation *Biomaterials* 2003;24(14):2497-2502

319. Cho J.H., Kim S.H., Park K.D.; Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells using a thermosensitive poly(N-isopropylacrylamide) and water-soluble chitosan copolymer *Biomaterials* 2004;25(26):5743-5751
320. Park E.K., Lee Y.E., Choi J.Y.; Cellular biocompatibility and stimulatory effects of calcium metaphosphate on osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived stromal cells *Biomaterials* 2004;25(17):3403-3411
321. Yang M., Zhu S., Chen Y.; Studies on bone marrow stromal cells affinity of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) *Biomaterials* 2004;25(7-8):1365-1373
322. Ganta S.R., Piesco N.P., Long P.; Vascularization and tissue infiltration of a biodegradable polyurethane matrix *J. Biomed. Mater. Res.* 2003;64A(2):242-248
323. Langer R.; Drug delivery Drugs on target *Science* 2001;293(5527):58-59
324. Richards Grayson A.C., Choi I.S., Tyler B.M.; Multi-pulse drug delivery from a resorbable polymeric microchip device *Nat. Mater.* 2003;2(11):767-772
325. West J.L.; Drug delivery: pulsed polymers *Nat. Mater.* 2003;2(11):709-710
326. Anderson D.G., Burdick J.A., Langer R.; Materials science. Smart biomaterials *Science* 2004;305(5692):1923-1924

9 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------|---|
| Abb | Abbildung |
| aP2 | FABP fatty acid-binding protein |
| APC | antigen presenting cell |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| BSP | bone sialoprotein |
| BM | bone marrow |
| CB | cord blood |
| CD | cluster of differentiation |
| C/EBP | CCAAT enhancer-binding protein |
| CFU-F | colony-forming unit-fibroblasts |
| DAPI | 4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid |
| DC | dendritic cell |
| DMEM | □luoresc's modified eagle medium |
| DMSO | dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTPs | Didesoxynukleotide |
| DTT | Dithiothreitol |
| ECC | embryonic carcinoma cell |
| ECM | Extrazelluläre Matrix |
| EDTA | Ethylenedinitrilotetraacetat |
| ES | embryonale Stammzelle |
| FACS | fluorescence activated cell sorting |
| FCS | fetal calf serum |
| FITC | Fluoreszeinisothiocyant |
| FKS | Fötales Kälberserum |
| FSC | forward scatter |
| GVHD | graft versus host disease |
| HNSCC | head and neck squamous cell carcinoma |
| HRP | Meerrettichperoxidase |
| HSC | hematopoetic stem cells |
| HSCT | hematopoetic stem cell transplantation |

| | |
|-----------|--|
| hTERT | human telomerase reverse transcriptase gene |
| IBMX | 3-isobutyl-1-methylxanthine |
| ICAM | intercellular adhesion molecule |
| ICM | inner cell mass |
| IFN | Interferon |
| IgG | Immunglobulin G |
| IDO | Indolamin 2,3-Dioxygenase |
| IL | Interleukin |
| Lin | lineage marker |
| mRNA | messenger Ribonucleic Acid |
| MMB | micro mass body |
| MMP | matrix Metalloproteinase |
| MSC | mesenchymale Stammzelle |
| NK-Zellen | natural killer cells |
| NSAID | nicht-steroidale entzündungshemmende Stoffe |
| NSB | Nabelschnurblut |
| NOD | nonobese diabetic |
| OC | Osteocalzin |
| OI | Osteogenesis imperfekta |
| Oligo dt | Primer für RT-PCR |
| OPN | Osteopontin |
| PBMC | peripheral blood mononuclear cells |
| PBS | phosphate buffered saline |
| PCI | Pittsburgh Cancer Institut |
| PE | Phycoerythrin |
| PECAM | platelet endothelial cell adhesion molecule |
| PLGA | polylactide-glycoli acid |
| pTNM | postoperative TNM-Klassifikation |
| rhBMP-2 | recombinant human Bone Morphogenic Protein-2 |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RT | reverse Transkription |
| SCF | stem cell factor |
| SCFR | stem cell factor receptor |
| SCID | severe-combined immunodeficient |

| | |
|----------------|---|
| SDF | stem-cell derived factor-1 |
| SH2/SH3 | signalübertragendes Protein |
| SIBLING | small integrin binding ligand n-linked glycoprotein |
| SRY | sex determining region Y |
| SSC | sideward scatter |
| T75 | Gewebekulturflasche 75cm |
| T175 | Gewebekulturflasche 175 cm |
| Tab. | Tabelle |
| Taq Polymerase | Polymerase aus dem Bakterium <i>Thermus aquaticus</i> |
| TGF | Transformierender Wachstumsfaktor |
| TNF | Tumor Nekrose Faktor |
| TNM | Tumor, Nodus, Metastase |
| VCAM | vascular cell adhesion molecule 1 |
| VEGF | vascular endothelial growth factor |
| wnt | wingless/int |
| ZNS | Zentrales Nervensystem |

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung möglicher Bereiche der Tumorlokalisierung im Kopf-Hals-Bereich

Abbildung 2: Lage der großen Mundspeicheldrüsen

Abbildung 3: Hierarchisches System der Hämatopoese.

Abbildung 4: Modell zur Differenzierung mesenchymaler Stammzellen

Abbildung 5: Purinmetabolismus in humanen Lymphozyten

Abbildung 6: *In vitro* Modell zur Regulation der MSC-Differenzierung

Abbildung 7: Hydrodynamische Fokussierung erzeugt einen Einzelstrom von Partikeln, in dem die Zellen durch eine Mantelflüssigkeit vereinzelt und zentriert werden, um einen Laserstrahl nacheinander zu passieren

Abbildung 8: Schematische Darstellung von Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht

Abbildung 9: Schema des optischen Detektionssystems eines Durchflusszytometers

Abbildung 10: Auswahl in der Durchflusszytometrie eingesetzter Fluorochrome

Abbildung 11: Absorptions- und Emissionsspektren gängiger, in der Durchflusszytometrie eingesetzter Fluorochrome

Abbildung 12: Assay für die Bestimmung der ungefähren Zellgröße von suspendierten mesenchymalen Stammzellen

Abbildung 13: Anregungs-(Excitation) und Emissions-Wellenlängen-Spektrum von Allophycocyanin (APC)

Abbildung 14: Primärzellkultur aus humanen Speicheldrüsen

Abbildung 15: Humane MSCs aus der Speicheldrüse in der 3. Passage

Abbildung 16: Durchflusszytometrische Untersuchung von isolierten Stammzellen aus der Speicheldrüse

Abbildung 17: FACS-Analyse einer Parotisprobe in der dritten Passage mit prozentualer Angabe der positiven Zellen für den jeweils angegebenen Oberflächenmarker

Abbildung 18: FACS-Analyse einer Submandibularisprobe in der dritten Passage mit prozentualer Angabe der positiven Zellen für den jeweils angegebenen Oberflächenmarker

Abbildung 19: Repräsentative Darstellung der Stro-1-Expression in der ersten Passage

Abbildung 20: Repräsentative FACS-Analyse muriner MSCs aus der Submandibularis in der dritten Passage (negative Marker)

Abbildung 21: Repräsentative FACS-Analyse muriner MSCs aus der Submandibularis in der dritten Passage (positive Marker)

Abbildung 22: Kryoschnitte von humanem Parotisgewebe

Abbildung 23: Micro mass bodies der chondrogenen Differenzierung hMSC aus der Glandula parotidea

Abbildung 24: MMBs der chondrogenen Differenzierung hMSC aus der Glandula Submandibularis

Abbildung 25: Adipogene und osteogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen aus der Glandula parotidea

Abbildung 26: Adipogene und osteogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen aus der Glandula submandibularis

Abbildung 27: PCR-Analyse der Differenzierten Parotisproben

Abbildung 28: PCR-Analyse der Differenzierten Submandibularisproben

Abbildung 29: HE-Färbung einer murinen Glandula submandibularis 3 Tage nach Bestrahlung mit 12 Gy

Abbildung 30: HE-Färbung von murinen Parotisproben 3 Tage nach Bestrahlung mit 12 Gy

Abbildung 31: HE-Färbung von murinen Gewebeproben Tag 60 nach Bestrahlung mit 12 Gy

Abbildung 32: HE-Färbung gesunder muriner Speicheldrüsen

Abbildung 33: Schema von Anregung und Wirkung mesenchymaler Stammzellen im Organismus

Abbildung 34: Die verschiedenen Effekte mesenchymaler Stammzellen auf Immunzellen

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Prätherapeutische klinische Tumor-Klassifikation (TNM)

Tabelle 2: Gängige Medikamente, die vor allem bei älteren Menschen eine Xerostomie auslösen können

Tabelle 3: Antikörper für die Immunhistochemie.

| Antikörper | Spezies | Verdünnung | Bezugsquelle |
|---------------------------------------|---------------------|-------------------|---|
| Bone Sialoprotein 2 (WVID1(9C5)-s) | Maus-Anti-Ratte | 1:20 | Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa USA |
| CollagenII (II-II6B3-s) | Maus-Anti-Huhn | 1:50 | Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa USA |
| CollagenX (X-AC-9) | Maus-Anti-Huhn | 1:50 | Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa USA |
| Osteopontin (MPIII-B10) | Maus-Anti-Human | 1:20 | Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa USA |
| FITC | Kaninchen-Anti-Maus | 1:200 | Dako Cytomation, Dänemark |
| DAPI | | 1:1000 | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland |
| HRP | | | Envision G2, DAKO |
| Anti-SV-40 | | 1:40 | Calbiochem |

Tabelle 4: Antikörper für die Durchflusszytometrie

| Antikörper | Spezies | Verdünnung | Bezugsquelle |
|-------------------|----------------------------|-------------------|---|
| CD13-PE | Maus-Anti-Human | | BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland |
| CD29-PE | Maus-Anti-Human | | BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland |
| CD34-PE | Maus-Anti-Human | | BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland |
| CD44-PE | Maus-Anti-Human | | BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland |
| CD45-FITC | Maus-Anti-Human | | BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland |
| CD54-PE | Maus-Anti-Human | | BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland |
| CD73-PE | Maus-Anti-Human | | BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland |
| CD90-PE | Maus-Anti-Human | | BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland |
| CD105-PE | Maus-Anti-Human | | BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland |
| CD106-PE | Maus-Anti-Human | | BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland |
| CD140b-PE | Maus-Anti-Human | | BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland |
| CD166-PE | Maus-Anti-Human | | BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland |
| CD271 | Maus-Anti-Human | | BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland |
| Stro-1-FITC | Maus-Anti-Human | | R&D Systems, Abingdon, UK |
| CD29-FITC | Armenian hamster-Anti-Maus | | BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland |
| CD34-PE | Ratte-Anti-Maus | | BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland |

| | | | |
|-------------|----------------------------|--|---|
| CD44-PE | Ratte-Anti-Maus | | BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland |
| CD45-APC | Ratte-Anti-Maus | | BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland |
| CD49d-PE | Ratte-Anti-Maus | | BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland |
| CD54PE | Armenian hamster-Anti-Maus | | BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland |
| CD73-PE | Ratte-Anti-Maus | | BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland |
| CD81-PE | Armenian hamster-Anti-Maus | | BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland |
| CD105-PE | Ratte-Anti-Maus | | R&D Systems, Abingdon, UK |
| CD106-FITC | Ratte-Anti-Maus | | BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland |
| CD140b-FITC | Ratte-Anti-Maus | | eBioscience |
| CD166-PE | Ratte-Anti-Maus | | R&D Systems, Abingdon, UK |

Tabelle 5: Primer

| Gen | Forward Primer (5'-3') | Reverse Primer (5'-3') | Size (bp) | Annealing | Accession No. | Quelle |
|----------------|------------------------|---------------------------|-----------|-----------|---------------|-----------------------------|
| aP2 | GCTTTGCCACCAGGAAAGTG | ATGACGCATTCCACCACCAG | 279 | 60 °C/35 | J02874 | Rodriguez et al. 2004 [231] |
| PPAR γ | AAACTCTGGGAGATTCTCCT | TCTTGTAATGGAATGTCTT | 247 | 56 °C/35 | NM_13871 | Rodriguez et al. 2004 [231] |
| C/EBP α | AGAAAGGGGTGGAACATAGG | GAAAGCTGAGGGCAAAGG | 685 | 58°C/35 | NM_004364 | Rodriguez et al. 2004 [231] |
| Osteopontin | ACTGATTTTCCACGGACCT | CATTCAACTCCTCGCTTTCC | 199 | 58°C/35 | X13694 | Lee et al. 2004 [232] |
| Osteocalcin | CTCACACTCCTCGCCCTATT | CGCCTGGGTCTTCACTAC | 143 | 58°C/35 | NM_199173 | Lee et al. 2004 [232] |
| Collagen II | AGGCTCCAGAACATCACCT | ACAGTCTTGCCCCACTTACC | 193 | 58°C/35 | | Kramer et al. 2006 [233] |
| Aggrecan | GCAGAGACGCATCTAGAAATTG | GGTAATTGCAGGGAACATCATT | 441 | 58°C/35 | | Kramer et al. 2006 [233] |
| GAPDH | CCGCATCTTCTTTTGCCTCGC | GCAACTGTGAGGAGGGGAGATTCAG | 1110 | 58°C/35 | | Kramer et al. 2006 [233] |

12 Publikationsverzeichnis

Joachim RA, Hildebrandt M, Oder J, Klapp BF, Arck PC
Murine stress-triggered abortion is mediated by increase of CD8+ TNF-alpha+ decidual cells
via substance P
Am. J. Reprod. Immunol. 2001 May;45(5):303-9.

Rotter N, Wirz C, Oder J, Brandau S, Lang S, Bücheler M
Zellbasierte Strategien für die Speicheldrüsenregeneration
Springer Medizin Verlag 2007

Rotter N, Oder J, Schlenke P, Lindner U, Böhrnsen F, Kramer J, Rohwedel J, Huss R,
Brandau S, Wollenberg B, Lang S.
Isolation and Characterization of Adult Stem Cells from
Human Salivary Glands
Stem Cells Dev. 2008 Jun;17(3):509-18

13 Danksagung

Ich danke Frau Prof. Dr. med. vet. Anja Sterner-Kock für die Genehmigung dieser Arbeit am Institut für Veterinärpathologie an der Freien Universität Berlin.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hartmut Merz, der die Betreuung dieser Arbeit übernahm, für seine Unterstützung und seine Diskussionsbereitschaft. Ohne ihn wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Danke!

Herzlichen Dank auch an Kirstin Schirmacher und Holger Lux, die immer da waren, wenn ich eine Frage hatte, und diese geduldig beantwortet haben.

Ich bedanke mich bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Tierhaltung der Universität zu Lübeck für ihre freundliche Unterstützung, insbesondere danke ich Herrn Dr. med. vet. Ralf Noel, der immer ein offenes Ohr für mich hatte.

Vielen Dank auch an die Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohren-Heilkunde der Universität zu Lübeck für die Bereitstellung der humanen Gewebeproben, des Instituts für Pathologie der Universität zu Lübeck für die Aufarbeitung der murinen Gewebeproben und des Instituts für Strahlentherapie, ohne die das Xerostomie-Mausmodell nicht möglich gewesen wäre.

Mein besonders herzlicher Dank gilt meiner Mutter Bärbel Oder. Ohne Sie hätte ich nie die Kraft für das Studium und diese Doktorarbeit gefunden.

14 Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Berlin, den 04.02.2009

Jessica Oder