

Aus der Klinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Norbert R. K bler

**Evaluierung des Proliferations- und
Differenzierungsverhaltens von humanen
Nabelschnurblutstammzellen nach Aussprossen aus
dreidimensionalen Kulturen unterschiedlicher Größe**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Madeline Zapp
2023

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Rita Depprich

Zweitgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolas H. Stoecklein

Zusammenfassung

Die Wiederherstellung verloren gegangenen Knochens beziehungsweise die Überbrückung von knöchernen Defekten, die sowohl durch Traumata, aber auch Fehlbildungen, Neoplasien oder atrophische Prozesse verursacht sein können, stellt nach wie vor eine therapeutische Herausforderung in der klinischen Medizin dar. Auf der Suche nach Verfahren, mit denen Knochenersatzmaterialien sowohl in unbegrenzter Menge als auch ohne sekundäre Eingriffe beim Patienten hergestellt werden können, wurde das *Bone Tissue Engineering* (BTE) als Forschungsgebiet etabliert. Hier kann anhand gezielter Modulation von Stammzellen durch Variation von Differenzierungsfaktoren und der Extrazellulären Matrix (EZM) ein Gewebekonstrukt mit knochenähnlichen Eigenschaften *in vitro* nachgebildet werden. Das hohe Proliferationspotenzial von USSC (*Unrestricted Somatic Stem Cell*)– Linien, das ohne spontane Differenzierung oder Verlust der Plastizität *in vitro* nachgewiesen wurde, bietet besonders günstige Voraussetzungen für deren Einsatz. Für das BTE können so *in vitro* dreidimensionale, kugelige Gewebekonstrukte, sog. USSC-Mikromassen, hergestellt und verwendet werden, die durch das Aussprossen der Zellen eine flächenhafte Deckung und Heilung von Knochendefekten ermöglichen sollen.

In dieser Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob die vorteilhaften Eigenschaften der USSC-Linie auch nach Mikromassen-Formation erhalten bleiben. Zunächst wurde das Aussprossverhalten von USSC aus Mikromassen mit Zellzahlen von 45.000 (45Mm) und 90.000 (90Mm) mittels einer fluoreszierenden Kernfärbung (DAPI, 4',6-Diamidino-2-phenylindol) untersucht. Während eines Zeitraums von 16 Tagen entwickelte sich ein flächendeckender Zellrasen aus vitalen USSC mit einem Radius von 8,97mm (SD 1,59mm) um die 90Mm. Ausläufer der 45Mm erreichten einen Radius von 7,4mm (SD 2,49mm) über den gleichen Zeitraum. Die Proliferationsaktivität ausgesprossener USSC der 45Mm bzw. 90Mm wurde mittels eines Proliferationsassays im Vergleich zu monolayerkultivierten USSC (ML-USSC) ermittelt. Die jeweiligen Versuchsgruppen wurden entweder mit dem Kulturmedium (DMEM) oder mit dem osteoblastären Differenzierungs-Medium (DAG: Dexamethason, Ascorbinsäure, β -Glyzerolphosphat) für weitere 11 Tage kultiviert. Trotz der weiterhin bestehenden Fähigkeit zur Proliferation stellte sich eine signifikant geringere Proliferationsaktivität bei ausgesprossenen USSC beider Mikromassengrößen im Vergleich zu ML-USSC heraus. Zudem wurde der Mineralisierungsgehalt der extrazellulären Matrix (EZM) im Rahmen der osteoblastären Differenzierung von USSC bestimmt. Ausgesprossene USSC aus 45Mm wiesen den signifikant höchsten EZM-Mineralisierungsgehalt sowohl spontan unter DMEM als auch nach DAG-Stimulation auf. Weiterhin wurden in ML-USSC, USSC aus 45Mm als auch ausgesprossenen USSC aus 45Mm und 90Mm spezifische Marker, die als charakteristisch für Stammzellnischen-Eigenschaften gelten, mittels einer quantitativen Polymerase Kettenreaktion (PCR) untersucht. In der Expressionsanalyse dieser Marker fiel eine signifikant geringe Expression von Vinkulin und MT1-MMP in USSC aus 45Mm auf. Das erhaltene Expressionsprofil aller untersuchten Marker deutet jedoch auf den Erhalt der Stammzellnischen-Eigenschaften auch in ausgesprossenen USSC beider Mikromassengrößen hin. In der Zusammenschau der Ergebnisse erweist sich die USSC-Mikromassen Technologie als vielversprechende Methode für das BTE. Eine Evaluation der Ergebnisse unter *in vivo* Bedingungen bleibt weiterhin offen.

Summary

Bridging of osseous defects, that may occur after trauma but also as a consequence of malformation, neoplasia or atrophic processes, still represents a challenge for therapy in clinical medicine. In search of alternative concepts for treatment that may provide bone replacement material in sufficient amounts and as a consequence avoid secondary surgery Bone Tissue Engineering (BTE) was identified as a new field of research. By the use of targeted modulation of stem cells through variation of differentiation factors as well as the extracellular matrix (EZM) the formation of tissue constructs with bone-like properties becomes available *in vitro*. Their high potential of proliferation which has been proven *in vitro* to occur without spontaneous differentiation or loss of plasticity makes USSC-lines (unrestricted somatic stem cell-lines) particularly favorable for the use in BTE. Three-dimensional, globular tissue constructs termed as USSC micromasses can be fabricated for the use in covering bone defects with outgrowing cells and thus leading to the promotion of healing.

In this thesis an evaluation of USSC cell lines regarding their potential to maintain their typical properties after having gone through a period of micromass formation has been performed. In a first approach differences in cell migration from micromasses consisting of 45,000 (45Mm) and 90,000 cells (90Mm) were measured by applying a fluorescent nuclear stain (DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole). Confluent cell layers of live USSC with an average radius of 8,97mm (SD 1,59mm) were detected in the 90Mm. In contrast, to these findings migrated cells from 45Mm were detectable at distances of 7,4mm (SD 2,49mm) in the same period of time. Proliferation activity of USSC migrating from 45Mm and 90 Mm was determined in a proliferation assay and compared to values obtained from monolayers of USSC (ML-USSC). Each test group was cultivated in growth medium (DMEM) or in an osteogenic differentiation medium including dexamethasone, ascorbic acid and β -glycerophosphate (DAG) for the duration of 11 more days. Although the proliferative potential of USSC which had migrated from micromasses of both sizes had been maintained, a significantly decreased proliferation activity in these groups was detected when compared to values obtained from ML-USSC. In order to evaluate the mineralization potential of migrated USSC from micromasses the mineral content of extracellular matrix of cells originating from 45Mm and from 90Mm was measured after 11 days of culture in DMEM or DMEM supplemented with DAG. As a result, significantly increased mineralization was detected in the extracellular matrix of sprouting 45 Mm subsequently to stimulation with DAG but also without any inductive supplements. The characteristic properties of the stem cell niche were investigated by determining the expression levels of specific markers in quantitative polymerase chain reaction (qPCR) experiments. No significant differences in ML-USSC as well as in sprouted USSC of all micromass sizes were observed. Interestingly, significant suppression of vinculin and MT1-MMP-expression levels in 45Mm was detected in these cells. Taking into account that the expression profile of USSC which have sprouted from micromasses reaches original levels these cells seem to have the potential to maintain features of the stem cell niche.

As an overall result of the findings in this work USSC micromass technology showed promising results for its application in bone tissue engineering (BTE). Comparative measurements under *in vivo* conditions would be of special interest in future studies.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AKT	Proteinkinase B
AML	Aktue myeloische Leukämie
Aqua dest.	destilliertes Wasser
b-FGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
BMSC	<i>Bone Marrow-derived Stem Cell</i>
BTE	<i>Bone Tissue Engineering</i>
°C	Grad Celsius
Ca ₅ [OH](PO ₄) ₃	Chemische Formel Hydroxylapatit
Cbf-a	<i>Core-binding factor alpha</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cm	Zentimeter
Ct	<i>Cycle threshold</i>
CXCR4	CXC-Motif Chemokinrezeptor-4
DAG	Dexamethason Ascorbinsäure β- Glyzerolphosphat
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DDL	<i>Delta-like ligand</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTP	<i>deoxyribose Nucleotide Triphosphate</i>
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>
ERK	<i>Extracellular-signal Regulated Kinase</i>
ESC	<i>Embryonal Stem Cell</i>
ECM	<i>Extra Cellular Matrix</i>
FAK	<i>Focal Adhesion Kinase</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
GAPDH	Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
h	<i>hours</i>
HES	<i>Hairy Enhancer of Split</i>
HEY	<i>Hairy Enhancer of split-related YRPW motif</i>
HIF	Hypoxie Induzierter Transkriptionsfaktor
HLA	<i>Human Leukocyte Antigene</i>

HSC	<i>Hematopoietic stem cell</i>
IFN γ	Interferon gamma
iPSC	<i>induced Pluripotent Stem Cell</i>
K19	Keratin 19
LT-HSC	<i>Long-term repopulating hematopoietic stem cells</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
ML-USSC	Monolayerkultivierte USSC
Mm	Mikromassen
MMP	Matrix Metalloproteinasen
mRNA	<i>messenger Ribonucleic Acid</i>
MSC	<i>Mesenchymal-derived Stem Cell</i>
MT1-MMP	<i>Membrane Type 1 Metallo-Proteinase</i>
MW	Mittelwert
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromol
μ m	Mikrometer
μ g	Mikrogramm
ml	Milliliter
mg	Milligramm
M	molar
min.	Minute
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mol	Einheit für mol
n	<i>number</i>
OCT-4	<i>Octamerbinding Transcriptionfactor-4</i>
o.g.	oben genannten
PAK	<i>p21 Activated Protein Kinases</i>
PC	<i>Proprotein Convertase</i>
PDGF(-BB)	<i>Platelet Derived Growth Factor</i> (Typ BB)
PHD	Prolyl-Hydroxylase
Pi	<i>inorganic</i> Phosphate
PI3K	Phosphoinositid 3-Kinase
Rcf	<i>Relative centrifugal force</i>
RFU	<i>Relative Fluorescence Units</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ribonukleinsäure)
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i>

RUNX2	<i>Runt-Related Transcription Factor 2</i>
SDF-1	<i>Stromalcell Derived Factor-1</i>
sog.	sogenannt
SOX2	<i>Sex Determiningregion-Y -box 2</i>
SOX9	<i>Sex Determiningregion-Y -box 9</i>
STABW	Standardabweichung
T-ALL	T-Zell akute lymphatische Leukämie
TAZ	<i>Transcriptional co-Activator with PDZ-binding motif</i>
TE	<i>Tissue Engineering</i>
TNF α	Tumor Nekrose Faktor alpha
USSC	<i>Unrestricted Somatic Stem Cell</i>
u.U.	unter Umständen
VAR	Varianz
VCAM	<i>Vascular cell adhesion molecule</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelia Growth Factor</i>
YAP1	<i>Yes associated Protein1</i>
z. B.	zum Beispiel
45Mm	Mikromasse aus 45.000 Zellen
90Mm	Mikromasse aus 90.000 Zellen
5-FU	5-Fluorouracil

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Knochen	1
1.1.1	Die Osteogenese und die Ossifikation	1
1.1.2	Das Knochenmark und die Stammzellnische	2
1.1.3	Der Knochenersatz	3
1.1.4	Alternativen zum konventionellen Knochenersatz: Zellbasierte Verfahren und <i>Bone Tissue Engineering</i>	3
1.2	Stammzellen	4
1.2.1.1	Embryonale Stammzellen und induzierte pluripotente Stammzellen	6
1.2.1.2	Die unrestringierte somatische Stammzelle	6
1.3	Die osteoblastäre Differenzierung von Stammzellen	7
1.4	Mikromassen	9
1.5	Charakteristische genetische Marker der Stammzellen	10
1.5.1.1	Vinkulin	10
1.5.1.2	MT1-MMP	10
1.5.1.3	HIF-1	11
1.5.1.4	Notch3	11
1.6	Ziel der Arbeit	13
2	Material und Methoden	14
2.1	Material	14
2.1.1.1	<i>Unrestricted Somatic Stem Cell</i>	14
2.1.1.2	Verwendete Medien	14
2.1.1.3	Mikromassen-Herstellung	16
2.1.1.4	Kernfärbung	16
2.1.1.5	Assay Kits	17
2.1.1.6	EDV-Programme zur Vermessung und Auswertung	17
2.1.1.7	Geräte und Laborhilfsmittel	18
2.2	Zellbiologische Methoden	20
2.2.1.1	Kryokonservierung	20
2.2.1.2	Auftauen	20
2.2.1.3	Kultivieren und Passagieren der Monolayerkultur	21
2.2.1.4	Zellzählung (Neubauer-Kammer)	21
2.3	Die Herstellung von Mikromassen und Versuche mit ausgesprosten Zellen	22
2.3.1	Die Herstellung von Mikromassen	23
2.3.2	Die Ernte von ausgesprosten Zellen	24

2.3.3	Dotierung von Chamber-Slides mit Mikromassen	25
2.3.4	Kernfärbung und Messung der Aussprossdistanz	25
2.3.5	RNA-Isolierung	26
2.3.6	cDNA-Synthese	27
2.3.7	<i>Reverse Transcriptase</i> Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)	27
2.3.8	Sequenzen der verwendeten Primer und Sonden	29
2.3.9	Formel zu Auswertung der quantitativen PCR-Ergebnisse	30
2.3.10	Die Mineralisierung der USSC	31
2.3.11	Mineralisierungsassay: OsteoImage™	32
2.3.12	Proliferationsassay CyQuant®	34
2.4	Statistische Auswertung	37
3	Ergebnisse	38
3.1	Aussprossversuch	38
3.1.1	Aussprossdistanz von USSC aus 45Mm	38
3.1.2	Aussprossdistanz von USSC aus 90Mm	40
3.1.3	Vergleich der Aussprossdistanzen von USSC aus 45Mm und 90Mm	42
3.1.4	Proliferation ausgesprossster USSC	44
3.1.5	Proliferative Aktivität mit DMEM	44
3.1.6	Proliferative Aktivität mit DAG	46
3.1.7	Vergleich der Proliferation unter DMEM oder DAG	48
3.2	Mineralisationsverhalten	50
3.2.1	Die Mineralisation mit DMEM	50
3.2.2	Die Mineralisation mit DAG	52
3.2.3	Vergleich der Mineralisierung mit DMEM oder DAG	54
3.2.4	Die relative Mineralisierung	56
3.2.5	Translationsanalyse des Genexpressionsprofils mittels RT-PCR	57
3.2.6	Vinkulin	58
3.2.7	MT1-MMP	59
3.2.8	HIF-1	60
3.2.9	Notch3	61
4	Diskussion	62
4.1	USSC als Zellquelle des Mikromassen-Modells	62
4.2	Die zellreiche Mikromasse	63
4.3	Ausgesprossste USSC aus den Mikromassen	65
4.4	Die MT1-MMP vermittelte Zellmigration	67
4.5	Vinkulin	68
4.6	Notch3	70
4.7	HIF-1	71

4.8 Ausblick	72
5 Literaturverzeichnis	74
6 Anhang	82
6.1 Tabellenverzeichnis	82
6.2 Abbildungsverzeichnis	86
6.3 Danksagung	

1 Einleitung

1.1 Knochen

1.1.1 Die Osteogenese und die Ossifikation

Knochengewebe verleiht dem menschlichen Skelett durch seinen besonderen Aufbau die notwendige mechanische Widerstandsfähigkeit gegen Zug- und Druckbelastungen. Die extrazelluläre Matrix, die aus verschiedenen Kollagenen und Proteoglykanen besteht, ist mit Hydroxylapatit-Kristallen ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) verstärkt und kombiniert die Materialeigenschaften zu einem Verbundwerkstoff von enormer Belastbarkeit.

Bei der Entstehung von Knochen wird die noch unmineralisierte Matrix, das Osteoid, durch die knochenbildenden Osteoblasten im Endost an der inneren Knochenoberfläche produziert. Die fortschreitende Einmauerung der Osteoblasten lässt diese zu Osteozyten differenzieren, die weiterhin miteinander in Verbindung stehen. Die Matrix wird im Laufe ihrer Entstehung durch die Einlagerung von Hydroxylapatit mineralisiert, wobei die dafür nötigen Calciumphosphate in Vesikeln von den Osteoblasten abgegeben werden. Eine weitere Zellart im Endost sind die mehrkernigen Osteoklasten. Sie sind knochenresorbierend aktiv und wirken zusammen mit den Osteoblasten für den stetigen Umbau, das sog. *Remodeling* des Knochens.

Der zunächst als Geflechtknochen (primärer Knochen) angelegte unreife Knochen kann entweder direkt aus mesenchymalem Bindegewebe (desmale Ossifikation) oder über knorpelige Zwischenstufen (chondrale Ossifikation) entstehen. Im Verlauf des Reifungsprozesses wird, mit wenigen Ausnahmen wie dem Felsenbein, der unreife Geflechtknochen zum reiferen Lamellenknochen (sekundären Knochen) umgebaut. In der äußeren dichten Rindenschicht des Lamellenknochens, der Substantia compacta, liegen die Kollagenfibrillen in lamellenartigen Schichten konzentrisch um einen Havers-Kanal mit Blutgefäßen und Nerven. Im Inneren, der Substantia spongiosa, befindet sich ein schwammartiges Geflecht aus dünnen Knochenbälkchen (Trabekeln), welche sich entlang der größten Druck- und Zugbelastung ausrichten (Lüllmann-Rauch 2003, Aumüller 2006).

1.1.2 Das Knochenmark und die Stammzellnische

In den Trabekeln der Substantia spongiosa von langen Röhrenknochen sowie platten Knochen befindet sich das Knochenmark. Je nach Fettgewebe-Anteil, wird es als gelbes und fettreiches oder rotes Knochenmark bezeichnet. Es wird zwischen dem extravasalen Hämatopoese-Kompartiment, das Stammzellen, Progenitorzellen und Stromazellen beinhaltet und dem intravasalen Blut-Kompartiment, den sog. Sinusoiden aus weitlumigen Kapillaren mit fenestriertem Endothel unterschieden. Neben dem Abbau gealterter Erythrozyten und der Reifung von B-Lymphozyten ist die Hämatopoese eine Hauptaufgabe des Knochenmarks (Lüllmann-Rauch 2003).

Das Knochenmark beherbergt in seiner extrazellulären Matrix ein komplexes Mikromilieu aus verschiedenen Zellarten. Hämatopoetische Stammzellen befinden sich in enger Nachbarschaft zu Mesenchymzellen, Osteoblasten sowie Endothelzellen und Makrophagen.

Das bereits von Schofield postulierte Konzept der Stammzellnische beschreibt die Abschirmung der Stammzellen durch benachbarte Nicht-Stammzellen, sodass ihre Identität und ihr Selbsterneuerungspotenzial erhalten bleiben (Schofield 1978). Diese Umgebung, die seitdem auch als Stammzellnische bezeichnet wird, sorgt mittels intrazellulärer Signale und extrazellulären Einflüssen für die Aufrechterhaltung der hämatopoetischen Stammzellpopulation (Lin, Sohn et al. 2019). Die Nicht-Stammzellen stellen Gradienten löslicher Faktoren bereit, präsentieren Oberflächenmoleküle wie Cadherine und Integrine, und sorgen mit Zell-Zell-Interaktionen sowie Zell-Matrix-Interaktionen für die notwendigen Voraussetzungen zum Erhalt der Stammzellnische (Chhabra and Booth 2021). Die räumliche Beziehung der Stammzellen zu Nicht-Stammzellen entscheidet über die asymmetrische Teilung entlang sich weiter differenzierende Vorläuferzellen.

In einem Organismus gibt es mehrere Nischen mit unterschiedlichen Funktionen. Eine im Kontext dieser Arbeit relevante Nische ist die Knochenmarksnische, die sich in eine osteoblastische Nische in der Nähe des Endosts sowie in eine vaskuläre Nische entlang der Sinusoide einteilen lässt (Lin, Sohn et al. 2019). Eine Deregulation der Stammzellnische kann zum Verschwinden von Stammzellen und letztlich zur Knochenmarksdegeneration, zum Altern und zur Tumorgenese führen. Daher ist eine intakte Stammzellnische zur Unterstützung der Gewebesynthese, -reparatur und zum Gewebeerhalt notwendig (Lane, Williams et al. 2014, Pignolo, Law et al. 2021).

1.1.3 Der Knochenersatz

Umfangreiche Knochendefekte entstehen häufig als Folge von kongenitalen Fehlbildungen, Neoplasien oder Traumata. Im kraniofazialen Bereich reichen die physischen und psychischen Belastungen von der erschwerten Nahrungsaufnahme über Schwierigkeiten beim Sprechen bis hin zu ästhetischen Beeinträchtigungen. Nicht selten bedeutet dies eine starke Minderung der Lebensqualität für die Patienten. Auch altersbedingte Knochenatrophie kann dazu führen, dass für eine funktionale prothetische Versorgung das notwendige Knochenangebot fehlt. Zur Wiederherstellung von Knochengewebe werden autogene Knochentransplantate und allogene, xenogene oder alloplastische Ersatzmaterialien genutzt (Schwenzer N. 2010). Beim allogenen Knochenersatzmaterial gehören Spender und Empfänger zur gleichen Spezies. Trotz aufwendiger Aufbereitungsverfahren bleibt bei der Implantation das (Rest-)Risiko einer möglichen Infektion für den Empfänger bestehen (Lei, Hu et al. 2019). Xenogene Knochenersatzmaterialien, die häufig aus bovinen, porcinen oder equinen Quellen stammen, wirken ähnlich wie alloplastische Knochenersatzmaterialien, vor allem osteokonduktiv, indem sie als Leitschiene für die osteogenen Zellen dienen. Die Nutzung von autologem (körpereigenem) Knochen gilt nach wie vor als „Goldstandard“ des Knochenersatzes, was jedoch durch die begrenzte Verfügbarkeit und die mögliche Entnahmemorbidität an der Donorstelle limitiert ist (Schwenzer N. 2010).

1.1.4 Alternativen zum konventionellen Knochenersatz: Zellbasierte Verfahren und *Bone Tissue Engineering*

Neben der Anwendung von Knochenersatzmaterialien haben sich auch weitere Verfahren, wie die Induktion von ortsständigem Knochen sowie das *Bone Tissue Engineering* (BTE) etabliert. Bei der Osteoinduktion werden durch biochemische Stimulation mit Zytokinen ortsständige pluripotente Stammzelle in knochenbildende Vorläuferzellen differenziert (Kubler, Reuther et al. 1998, Meyer and Wiesmann 2005).

Für das *Bone Tissue Engineering* werden *in vitro* knochenbildende Vorläuferzellen oder Stammzellen vermehrt. Mithilfe von gezielter Stimulation wird *in vitro* die osteoblastäre Differenzierung aktiviert, sodass durch Kombination mit einer Gerüstmatrix ein Knochen-ähnliches Gewebekonstrukt nachgebildet wird (Perez, Kouroupis et al. 2018). Das Ziel der heutzutage verwendeten Konstrukte ist die Nachahmung des biologischen Knochen-Milieus auf Mikroebene, welches nach Implantation zur Regeneration und Heilung

stimulieren soll. Mittlerweile gibt es zahlreiche Ansätze, *in vitro* hergestellte, dreidimensionale Konstrukte hinsichtlich ihrer Beschaffenheit, Vaskularisation, Immunogenität und Regenerationspotenzials dem physiologischen Knochen anzupassen. Zu unterteilen sind diese in zellreiche, offene und geschlossene Hybridsysteme. Zellreiche Systeme beinhalten gerüstfreie Modelle wie das Mikromassenmodell oder Zellfliese. Offene Hybridsysteme, wie zellbeladene porenreiche Trägergerüste, erlauben direkte zelluläre Interaktionen am Implantationsort, wobei in geschlossenen Hybrid-Systemen Zellen durch eine Hydrogel-Ummantelung isoliert sind (Oliveira, Leeuwenburgh et al. 2021).

1.2 Stammzellen

Für das *Bone Tissue Engineering* kommen nur bestimmte Zell-Linien zur Anwendung. Diese sollten *in vitro* proliferierend und expandierbar sowie *in vivo* möglichst immunverträglich sein. Autologe Knochentransplante besitzen die höchste Immunverträglichkeit. Die gewonnen Zellen sind allerdings häufig nur in einer kleinen Anzahl verfügbar. Ferner ist eine Expansion *in vitro* nur begrenzt ohne Verlust des Phänotyps möglich (Wu, He et al. 2015, Ferreira, Mancini et al. 2022). Deshalb werden bevorzugt nicht differenzierte Vorläuferzellen oder Stammzellen für das *Bone Tissue Engineering* eingesetzt. Schließlich sind sie ähnlich immunverträglich und können darüber hinaus *in vitro* expandiert werden. Durch das für sie charakteristische Selbsterneuerungspotenzial, ihre Plastizität und die Fähigkeit zur Sekretion von Wachstumsfaktoren, tragen sie wesentlich zur körpereigenen Regeneration und damit zur Heilung von Gewebeläsionen bei (Lin, Sohn et al. 2019). Die Potenz zur Differenzierung entlang verschiedener Zelllinien, die sog. *Zell-Plastizität*, ist abhängig vom Ursprung der Stammzelle, wie in Abbildung 1 dargestellt ist. Totipotente Stammzellen können sich, ähnlich wie die Zygote, zu einem vollständigen lebensfähigen Organismus entwickeln. Pluripotente Zellen bilden die innere Zellmasse der Blastozyste, die sich in alle drei Keimblätter, jedoch nicht in extraembryonales Gewebe differenzieren kann. Multipotente und oligopotente Zellen, wie die adulte Stammzellen, differenzieren sich in viele bzw. nur wenige Abkömmlinge eines bestimmten Keimblatts (Baker and Pera 2018).

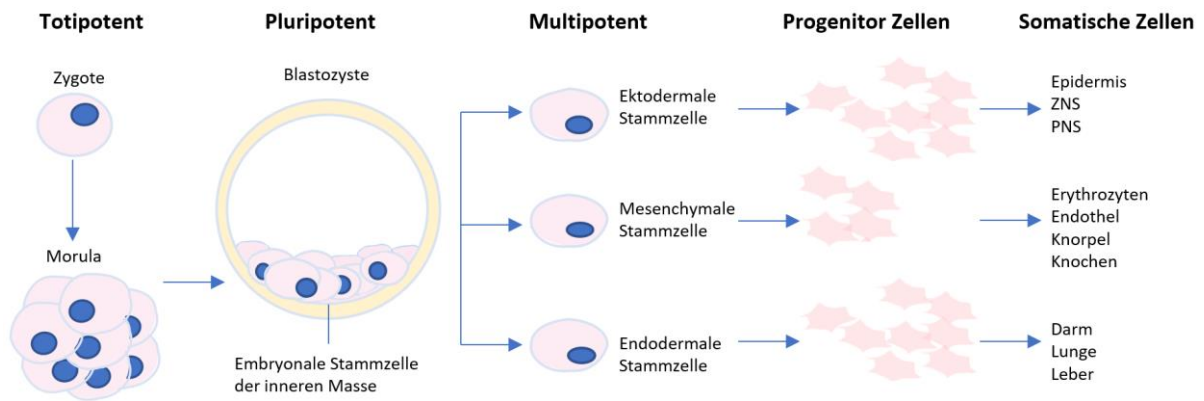


Abb.1.: Differenzierungspotenzial von Stammzellen. USSC gelten als pluripotente Stammzell-Linie. Modifiziert nach Berdasco et. al (Berdasco and Esteller 2011).

Für das BTE werden vor allem *Mesenchymal-derived Stem Cells* (MSC) oder *Bone Marrow-Derived Stem Cells* (BMSC) aus dem Knochenmark eingesetzt. Die multipotenten MSC aus Muskeln, Synovialhaut und Fettgewebe besitzen ein breites Differenzierungspotenzial, welches sie *in vitro* als auch *in vivo* zur Differenzierung in osteogenes Gewebe, Knorpel, Fett und Bindegewebe befähigt, ohne maligne zu entarten (Perez, Kouroupis et al. 2018). Unter standardisierten Kulturbedingungen bilden sie adhärente, koloniebildende Kulturen in fibroblastenähnlicher Morphologie. *In vivo* tragen sie zur Erhaltung und Wiederherstellung von Bindegewebe bei, indem sie entlang von chemischen Gradienten bevorzugt in Gewebeläsionen migrieren, um bei deren Reparatur mitzuwirken. Angesichts des regenerativen Potenzials und der osteoblastären Differenzierungsneigung werden vor allem BMSC für das *Bone Tissue Engineering* verwendet (Perez, Kouroupis et al. 2018). Allerdings konnte auch durch autologe MSC-Transplantation in eine medikamenten-assoziierte Osteonekrose am Unterkiefer eine effektive Defektheilung selbst unter septischen Bedingungen erzielt werden (Voss, Matsumoto et al. 2019). Wie auch beim autologen Knochenersatz, geht die BMSC-Gewinnung mit einer invasiven Knochenmarkspunktion für den Spender einher. MSC-Linien können hingegen aus unterschiedlichen Geweben wie bspw. Fettgewebe, Nabelschnur, Placenta, Zahnwurzel und der Synovialmembran entnommen werden (Arthur and Gronthos 2020). Mit steigendem Spenderalter nimmt jedoch die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und die Proliferationskapazität ab (Lin, Sohn et al. 2019).

1.2.1 Embryonale Stammzellen und induzierte pluripotente Stammzellen

Durch den Erhalt ihrer Pluripotenz über vielfache Expansionen können auch embryonale Stammzellen (ESC) und induzierte pluripotente Stammzellen (iPSC) als Zellquelle für das *Bone Tissue Engineering* verwendet werden. Die ESC stammen aus dem Blastozysten-Stadium und können durch gezielte Stimulation *in vitro* Expansion zur Differenzierung entlang der drei Keimblätter angeregt werden (Hur, Feng et al. 2021). Zahlreiche Studien belegen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* ein ausgeprägtes Differenzierungspotenzial entlang der osteoblastären Linie (Perez, Kouroupis et al. 2018). Aufgrund ethischer Bedenken sind die Gewinnung und Forschung an ESC rechtlich begrenzt gestattet. Zudem besteht *in vivo* eine teratogene Neigung sowie die Tendenz zu Imprinting-assoziierten Entwicklungsstörungen (Sapienza 2002, Godini, Karami et al. 2019).

Induced pluripotent stem cells (iPSC) sind definiert als reprogrammierte adulte Stammzellen, die beispielsweise durch Induktion von Fibroblasten der Haut gewonnen werden können. 2006 entwickelten Takahashi und Yamanaka durch die Induktion von bestimmten Pluripotenz-Genen und Transkriptionsfaktoren wie c-Myc, Oct 3/4, Sox2 und Klf4 pluripotente Zellen mit ESC-ähnlichen Potenzial (Takahashi and Yamanaka 2006). Angesichts ihres autologen Ursprungs induzieren sie keinerlei Immunantwort im Organismus. iPSC können sich sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in osteoblastäre Vorläuferzellen differenzieren (Branco, Cotovio et al. 2019). Bei unzureichendem *Gen-Silencing* besteht das Risiko von Mutationen und einer fehlerbehafteten Epigenese, die zur Entstehung von tumorinduzierenden Zellen beitragen (Yamanaka 2020).

1.2.2 Die unrestringierte somatische Stammzelle

2004 beschrieben Kögler et al. die unrestringierte, somatische Stammzelle (USSC, *unrestricted somatic stem cell*) aus dem humanen Nabelschnurblut als Zellquelle für das *Bone Tissue Engineering*. Die intrinsisch pluripotente Zelllinie ist im Gegensatz zu BMSC geringer ausgereift und zeichnet sich angesichts langer Telomere durch eine lange Lebensdauer und hohes proliferatives Potenzial bei gleichzeitigem Erhalt der Pluripotenz aus (Hsieh, Fu et al. 2010, Herten, Zilkens et al. 2019). *In vitro* wachsen die USSC als adhärenzte Zellkultur in fibroblastenähnlicher Morphologie ohne spontane Differenzierung. Trotz des ähnlichen Gen-Expressionsprofils wie ESC, konnte bei den USSC keinerlei teratogenes oder karzinogenes Entartungspotenzial *in vivo* nachgewiesen werden (Kögler,

Sensken et al. 2004). Sie weisen eine breite Differenzierungskapazität in die gerichtete Entwicklung von Knorpel-, hämatopoetischen und neuronalen Zellen, sowie Zellen des Leberparenchyms und des Herzmuskelgewebes auf (Kogler, Sensken et al. 2004). Extrazelluläre Mineralisierungsmuster sowie die Expression von Osteokalzin und Vitamin D nach Kultivierung mit Dexamethason, Ascorbinsäure und beta-Gyzerolphosphat, legen ein hohes osteoblastäres Differenzierungspotenzial *in vitro* nahe (Lammers, Naujoks et al. 2012, Lommen, Sus et al. 2022). In einem Ratten-Modell verhalfen osteoblastär differenzierte USSC zur sichtlichen Defektüberbrückung einer ausgedehnten Femurläsion. In Anbetracht epigenetischer Unterschiede der Pluripotenz-assoziierten Transkriptionsfaktoren OCT4 und NANOG kann es jedoch zu einer interlinearen Variabilität des Differenzierungspotenzials kommen (Santourlidis, Wernet et al. 2011). Die CD45 und HLA-Klasse II negativen USSC besitzen eine variable, jedoch schwache HLA-Klasse I Expression und wirken *in vivo* immunmodulierend (Kogler, Sensken et al. 2006, Akhavan Rahnama, Soufi Zomorrod et al. 2021). Winter et al. zufolge nehmen die USSC unter proinflammatorischen Bedingungen, wie hohe IFN γ und TNF α Gradienten, eine immunregulatorische Rolle ein. Insbesondere an Stellen der Geweberekonstruktion könnte durch die Inhibition von Immun-Effektorzellen ein günstiges Milieu für die Differenzierung der USSC geschaffen werden, die mit den autokrin sezernierten Zytokinen aus den USSC aufrechterhalten wird (Winter, Wang et al. 2009). Auch in infarziertem Myokard von Ratten induzierten USSC durch parakrine Stimulation einen T-Zell gesteuerten endogenen Heilungsprozess der Kardiomyozyten (Ding, Tan et al. 2022).

1.3 Die osteoblastäre Differenzierung von Stammzellen

Die Differenzierung der Stammzellen in osteoblastäre Zellen und die Bildung einer mineralisierten Matrix kann mithilfe eines osteoblastären Differenzierungsmediums angeregt werden. Dexamethason, Ascorbinsäure und Beta-Glyzerolphosphat initiieren über einen Zeitraum von 3 Wochen eine Kaskade verschiedener regulatorischer Prozesse zur osteogenen Differenzierung von Stammzellen. Zunächst werden die Transkriptionsfaktoren FHL2/beta-catenin über die Aktivierung von RUNX2 aktiviert. Durch Hochregulation von TAZ und MKP1 wird die Transkription von RUNX2 gefördert. Beide Signalwege werden durch Dexamethason induziert bzw. weiter verstärkt (Langenbach and Handschel 2013). Durch die Regulation des osteoblastären Zellzyklus wirkt RUNX2 als Schlüsselfaktor der osteoblastären Differenzierung (Vimalraj, Arumugam et al. 2015). Ascorbinsäure führt zur vermehrten Sekretion von Kollagen Typ 1 (Col1), wodurch der Col1/ α 2 β 1-Integrin-vermittelte MAPK-Signalweg initiiert wird. Der gleiche Signalweg wird auch durch das

Phosphat des beta-Glyzerolphosphats aktiviert. Die Phosphorylierung von ERK1/2 im MAPK-Signalweg führt zu Transkription von osteogenen Genen wie Osteopontin und BMP-2 sowie zur Stimulation der RUNX2 Expression (Fatherazi, Matsa-Dunn et al. 2009, Tada, Nemoto et al. 2011).

1.4 Mikromassen

In der pharmazeutischen Tumorzellforschung finden dreidimensionale Kultursysteme aufgrund der *in vivo* ähnlichen Zellanordnung häufig Verwendung zum besseren Verständnis von Tumorgenese und Interaktion von Signalwegen, bei gleichzeitig kontrolliertem extrazellulärem und möglichst physiologischem Milieu (Guo, Chen et al. 2019). Für das *Bone Tissue Engineering* haben sich dreidimensionale Kultursysteme auch als zelluläre Aggregate oder mithilfe von zellbeladenen organischen oder anorganischen Gerüsten etabliert. Sowohl zum Transfer von dreidimensionalen Kultursystemen als auch zur Ortsstabilität, sind Gerüste für das BTE hilfreich. Im Rahmen der Implantation soll das Trägermaterial schließlich durch langsame Resorption und mithilfe von *Remodeling* in das Knochengewebe integriert werden (Wiesmann, Joos et al. 2004). Zur komplikationslosen Integration ins Knochengewebe müssen die Trägermaterialien hohen Anforderungen entsprechen, wie eine hinreichende Stabilität, Biokompatibilität und Immunkompatibilität. Sie dürfen keinen Einfluss auf zelluläre Prozesse wie Adhäsion, Migration, Proliferation und Differenzierung der Zellen ausüben (He, Chen et al. 2020). Trotz intensiver Forschung ist es bisher nicht gelungen ein optimales Trägergerüstmaterial zu entwickeln, das allen Anforderungen gerecht wird.

Gerüstfreie dreidimensionale Zellkulturen bieten eine materialunabhängige Alternative. Sie werden bereits in der Tumorzellforschung zur Untersuchung der Diffusion von Nährstoffen verwendet und gehören zum „Goldstandard“ bei der *in vitro* Herstellung von Knorpel-Gewebe. Dabei wird mithilfe von chondrogenen Differenzierungsfaktoren die gerichtete Differenzierung von mesenchymalen Stammzellagglomeraten erzielt. Das Zellagglomerat wird hierbei durch das Zentrifugieren einer definierten Zellmenge zu einem Zellpellet hergestellt (Estes, Diekman et al. 2010, Grigull, Redeker et al. 2020). In der Tumorzellforschung werden sich kontinuierlich drehende Zellkulturfalschen zur Ansammlung eines Zellagglomerats benutzt. Neben weiteren Methoden hat sich bei USSC die Kultivierung auf einer nicht-adhärennten 96-Well Platte mit konkav geformten Agarose-Betten durchgesetzt (Langenbach, Berr et al. 2011). Die kugelförmigen Zellagglomerate aus 60.000-120.000 Zellen, sog. Mikromassen, bieten eine gerüstfreie Alternative, bei der *in vitro* Herstellung von osteoblastär differenzierten, dreidimensionalen Kulturen im

Rahmen des BTE. Neben dem Transfer von großen Zellvolumina, ist eine gezielte Platzierung in eine Läsion sowie Defektdeckung durch aussprossende Zellen aus der Mikromasse möglich (Langenbach, Naujoks et al. 2012) .

Analog dem physiologischen Milieu *in vivo*, bilden die in der Mikromasse befindlichen Zellen eine gut ausgebildete EZM mit intensiver interzellulärer Kommunikation und Zell-Interaktionen mit EZM-Proteinen wie Kollagen Typ I (Langenbach, Berr et al. 2011). Die Hochregulation von osteoblastären Differenzierungsmarkern wie RUNX2, Osteonectin und intrazellulärer alkalischer Phosphatase, legt günstige Voraussetzungen für die osteoblastäre Differenzierung nahe (Handschele, Depprich et al. 2007). *In vivo* wirken sich die vermehrte Expression der EZM-Moleküle und Zellkontakte positiv auf Differenzierung, Proliferation als auch die zelluläre Funktionsfähigkeit aus (Bartosh and Ylostalo 2019).

Aufgrund des Erhalts von epigenetischen Stammzellmarkern wie OCT4, NANOG und SOX2, die zur Steuerung von Selbsterneuerung und Pluripotenz dienen, treten spontane Differenzierungen und epigenetische Veränderungen seltener bei dreidimensionalen Stammzell-Kulturen als in Monolayerkulturen auf (Han, Chen et al. 2013, Guo, Zhou et al. 2014). Dreidimensionale MSC-Kulturen wirken sich anti-inflammatorisch und immunsuppressiv auf ihr Umfeld aus. Es lassen sich höhere Level an Zytokinen wie VEGF, b-FGF, Angiogenin, und BMP2 nachweisen (Bartosh and Ylostalo 2019).

Mikromassen aus humanen Nabelschnurblutstammzellen, den USSC, bieten sich zur Knochenüberbrückung für das BTE an. Bereits nach 3-tägiger Kultur mit dem osteoblastären Differenzierungsmedium aus Dexamethason, Ascorbinsäure und beta-Glycerolphosphat zeigten sich durch *Alizarin Red S*- und von Kossa-Färbung Anzeichen der EZM-Mineralisierung. Im Zentrum gelegene Zellen der nicht osteoblastär stimulierten USSC-Mikromasse wiesen ebenfalls Mineralisierung der EZM auf (Langenbach, Naujoks et al. 2012). Trotz mineralisierter EZM behielten USSC-Mikromassen ihre Fähigkeit zum Auswachsen aus der Mikromasse bei, was bei ESC-Mikromassen nach osteoblastärer Stimulierung nicht beobachtet werden konnte (Langenbach, Naujoks et al. 2010).

1.5 Charakteristische genetische Marker der Stammzellen

1.5.1 Vinkulin

Vinkulin ist ein Molekül aus der Gruppe der zytoskelettalen Proteine, welches das Strukturprotein Aktin bindet. Es ist in fokale Adhäsionen zwischen Matrix und Zellen und in Cadherin vermittelte Zell-Zell Kontakte involviert. Vinkulin befindet sich in einer autoinhibierten Form im Zytoplasma. Durch Rekrutierung in einen Komplex wird Vinkulin aktiviert. Die Wechselwirkung seiner Kopf-Schwanz Einheit führt zur Bindung und zum Austausch der Adhäsionsproteine (Bays and DeMali 2017). Durch die mechanische Verbindung zwischen Aktinfasern und Integrin Rezeptoren ist Vinkulin an der gerichteten Kraftübertragung und Kontraktilität der Zelle beteiligt (Johnson and Craig 2000). Infolge von mechanischen Stimuli reguliert die Kopf-Schwanz Einheit die EZM-Mechanosensorik und trägt zur spatiotemporalen Koordination, Stärkung und Stabilisierung der fokalen Adhäsionen bei (Bays and DeMali 2017, Wang, Melero et al. 2021). Durch seine Rolle als Modulator der E-Cadherin vermittelten Zell-Migration und des EZM-*Remodelings* wirkt Vinkulin als wichtige Komponente der Stammzellnische (Zhang, Lin et al. 2018, Wang, Melero et al. 2021).

1.5.2 MT1-MMP

Matrix-Metalloproteinasen sind Peptidasen, die in der Regulation der extrazellulären Gewebe-Allostase beteiligt sind. Sie sind bei neutralem pH-Wert aktiv und tragen zum Austausch extrazellulärer Matrixmoleküle bei. MT1-MMP ist eine von sechs Untergruppen der Membrangebundenen Matrix-Metalloproteinasen der Zelloberfläche. Im Gegensatz zu den löslichen MMP besteht MT1-MMP (MMP14) aus einer transmembranen sowie einer kurzen zytoplasmatischen Domäne. Zur Aktivierung werden sie von Proprotein-Konvertasen (PC) wie Furin aus einer Sequenz aus basischen Aminosäuren gespalten (Gifford and Itoh 2019). Als aktives Zelloberflächenenzym besitzt MT1-MMP die breiteste Substrat-Spezifität, besonders gegenüber EZM-Molekülen. Neben Kollagen Typ I degradiert es Typ II und III, und trägt so zum Abbau der perizellulären Matrix bei. Es ist die einzige perizelluläre Kollagenase, welche die zelluläre Invasion in die dreidimensionale Kollagen-Matrix fördert (Wan, Liu et al. 2019). Dabei ist es an verschiedenen Prozessen,

wie der zellulären Migration, dem Zellwachstum, der Angiogenese, der epithelialen und der skelettalen Morphogenese beteiligt (Gifford and Itoh 2019).

1.5.3 HIF-1

Hypoxie-induzierte Faktoren gehören zu den Transkriptionsfaktoren, die durch die Sensibilisierung bei Hypoxie zur Sauerstoffversorgung der Zelle beitragen. HIF ist ein Heterodimer aus einer hypoxieregulierten alpha- und einer sauerstoffsensitiven beta-Untereinheit (Semenza 1999). HIF-alpha wird kontinuierlich innerhalb der Zelle exprimiert. Bei Normoxie werden Prolyl-Asparaginyln-Reste der alpha-Untereinheit von spezifischen Prolyl-Hydroxylasen (PHD) hydroxyliert. Dies führt zur Poly-Ubiquitinierung durch den Von-Hippel Lindau (VHL) Ubiquitin E3 Ligase Komplex. Unter Hypoxie wird die Hydroxylierung inhibiert und HIF (HIF-1alpha und HIF-2alpha) stabilisiert. Als Transkriptionsfaktor zahlreicher Gene zur Proliferation, Angiogenese, Erythropoese und metabolischen Adaption, ist es für das Überleben der hypoxischen Zellen notwendig (Lv, Wang et al. 2021). Im Kontext der Knochenmarksnische trägt HIF-1alpha zum Erhalt der Stammzeleigenschaften der HSC bei (Szade, Gulati et al. 2018). Unter hypoxischen Bedingungen bindet HIF-1alpha direkt an Notch um über dessen regulierte Gene unter anderem das Potenzial zur Selbsterneuerung in Stammzellen zu erhalten (Hubbi and Semenza 2015, Zhang, Chan et al. 2022).

1.5.4 Notch3

Stammzellnischen-Gene, wie z. B. Notch3, sind als hoch-konservierte Gengruppe in der Regulation von Zell-Schicksal, Organogenese, Vaskularisation und der Stammzellhomöostase im embryonalen und adulten Gewebe involviert (Aburjania, Jang et al. 2018).

Das Notch-Gen ist für die Transkription von einem der vier Notch Rezeptoren (Notch1-4) verantwortlich. Der intrazelluläre Rezeptor wird durch Bindung seiner zwei membrangebundenen Ligandenfamilien *Jagged* (*Jagged1,2*) und *Delta-like ligand* (DLL-1, -3, -4) aktiviert. Durch deren Bindung wird der Notch-Rezeptor aktiviert und die intrazelluläre Domäne zum Nukleus freigesetzt. Dort führt es zur Transkription bestimmter Ziel-Gene wie

HES (*Hairy Enhancer of Split*) und HEY (*Hes-related with YRPW motif*), die als DNA-bindende Repressoren den undifferenzierten Zustand von Stammzellen konservieren (Pagella, de Vargas Roditi et al. 2021). Notch Rezeptoren werden in verschiedenen Geweben wie beispielsweise in den glatten Muskelzellen des Endothels und im Knochenmark exprimiert (Blache, Vallmajo-Martin et al. 2018). In der Knochenmarksnische wird durch Parathormon (PTH) die Hochregulation von *Jagged-1* in Osteoblasten stimuliert. Über Notch-Aktivierung führt dies zur Expansion und Selbsterneuerung der hämatopoetischen Stammzellen. In MSC-Kulturen zeigte sich bei der osteoblastären oder chondrogenen Differenzierung *in vitro* eine enge Assoziation zwischen Notch3 Expression und dem Erhalt der Stammzeleigenschaften. Bereits 7 Tage nach Beginn der Differenzierung verringerte sich die Notch3 Expression in den MSC-Kulturen signifikant (Pagella, de Vargas Roditi et al. 2021).

Osteoblasten exprimieren Notch1, Notch2 und Notch3-Rezeptoren. Hingegen finden sich Notch1- und Notch2-Rezeptoren in der myeloischen/osteoklastischen Linie. Notch3 inhibiert die Knochenresorption in der Substantia spongiosa. In der Kortikalis verursacht Notch3 eine erhöhte Porosität durch vermehrtes *Remodeling* (Canalis, Zanotti et al. 2021). Durch eine Überaktivierung von Stammzell-Signalwegen kann Notch zur Proliferation und Chemoresistenz von malignen Zellen führen. Insbesondere in Leukämien wie der T-ALL (T-Zell akuten lymphatischen Leukämie) und AML (akute myeloische Leukämie) sowie im Mamma-Ca, Bronchial-Ca und Gliomen, wird Notch verändert oder überexprimiert (Capaccione and Pine 2013).

1.6 Ziel der Arbeit

Der Einsatz von Mikromassen für das *Bone Tissue Engineering* könnte eine alternative Therapieoption zur autologen Knochentransplantation für die Überbrückung von Knochendefekten bieten. Im Rahmen dieser Arbeit soll, aufbauend auf den vorhandenen Vorkenntnissen zum Verfahren der Mikromassen Technologie, die Aussprossung von USSC aus Mikromassen *in vitro* analysiert werden. Hierzu soll zunächst die zeitabhängige Aussprossdistanz der USSC aus Mikromassen verschiedener Größen (45.000 Zellen und 90.000 Zellen) sowie die Vitalität des ausgesprossenen Zellrasens um die Mikromasse mittels einer Kernfärbung untersucht werden. Ferner soll die Proliferation und die osteoblastäre Differenzierungsfähigkeit ausgesprossener USSC im Vergleich zu monolayerkultivierten USSC geprüft werden. Es soll hierbei der Einfluss des osteoblastären Differenzierungsmediums (Dexamethason, Ascorbinsäure, beta-Glyzerolphosphat) sowie der Effekt der Mikromassen-Größe (45.000 oder 90.000 Zellen) evaluiert werden.

Eine intakte Stammzellnische ist von großer Bedeutung für die Defektheilung und Gewebesynthese *in vivo*. Es soll daher überprüft werden, ob die Fähigkeit zur Ausbildung und zum Erhalt der Stammzellnische in den USSC-Mikromassen sowie in den ausgesprossenen USSC vorhanden ist. Dafür soll die modifizierte Genexpression von Transkriptionsfaktoren bestimmter Stammzellnischen-Komponenten mittels einer RT-PCR ermittelt werden. Hierzu zählen das zytoskelettale Protein Vinkulin, die extrazelluläre MT1-MMP (Matrix-Metalloproteinasen), der Stammzellnischenmarker Notch3 und der Hypoxie-induzierte Faktor HIF-1.

2 Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 Unrestricted Somatic Stem Cells

Für die Untersuchungen wurden humane Nabelschnurblutstammzellen der Linie USSC 8/77 verwendet, welche aus dem Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf von der José-Carreras-Stammzellbank unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Gesine Kögler zur Verfügung gestellt wurden. Die Gewinnung der Zellen erfolgte mit dem Einverständnis der Mutter. Gewinnung und Kultivierung erfolgten standardisiert nach dem von Kögler et. al publizierten Protokoll (Kogler, Sensken et al. 2004). Verwendet wurden die Zellen von Passage 8 bis 13.

Nach dem Ethikvotum der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf wurde die Arbeit mit dem Zellmaterial unter der Studiennummer 5139 geführt.

2.1.2 Verwendete Medien

<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM) 1g Glukose, ohne L-Glutamin	Lonza	Verviers	Belgien
<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i> (DPBS)	Invitrogen GmbH	Karlsruhe	Deutschland
<i>Fetal calf serum</i> 42% (FCS) Sera ES	PAN Biotech GmbH	Aidenbach	Deutschland
L-Glutamin (200mM)	Biochrom	Berlin	Deutschland
Penicillin /Streptomycin (10.000U/1000µg/ml)	Biochrom	Berlin	Deutschland
Trypsin (2,5%)	Lonza	Verviers	Belgien

Tabelle 1.: Zellkulturmedium. Medium zur Kultivierung der ML-USSC.

<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM) 1g Glukose, ohne L-Glutamin	Lonza	Verviers	Belgien
<i>Fetal calf serum</i> (FCS) Sera ES	PAN Biotech GmbH	Aidenbach	Deutschland
Dimethyl Sulphoxide (DMSO) Hybrid-Max	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim	Deutschland

Tabelle 2.: Einfriermedium. Medium zum Einfrieren von USSC.

Dexamethason	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen	Deutschland
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen	Deutschland
β -Glyzerolphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen	Deutschland

Tabelle 3.: Osteoblastäres Differenzierungsmedium DAG. Dieses Medium wurde zur osteoblastären Differenzierung von ML-USSC und ausgesprosten USSC angewendet.

2.1.3 Mikromassen-Herstellung

<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM), 1g Glukose, ohne L-Glutamin	Lonza	Verviers	Belgien
<i>Fetal calf serum</i> (FCS) Sera ES	PAN Biotech GmbH	Aidenbach	Deutschland
L-Glutamin (200mM)	Biochrom	Berlin	Deutschland
Penicillin /Streptomycin (10000U/1000µg/ml)	Biochrom	Berlin	Deutschland

Tabelle 4.: Basismedium. Medium zur Kultur der Mikromassen.

Biozym Plaque Agarose	Biozym	Hess. Oldendorf	Deutschland
-----------------------	--------	--------------------	-------------

Tabelle 5.: Herstellung der Agarose Platten. Eine 96-Well Platte mit konkav geformter Agarose wurde zur Herstellung der Mikromassen verwendet.

2.1.4 Kernfärbung

Fluoroshield™ mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol)	Sigma-Aldrich	St. Louis	USA
<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i> (DPBS)	Invitrogen GmbH	Karlsruhe	Deutschland
4% Formaldehyd-Lösung	Merck KBaA	Darmstadt	Deutschland
Aqua destillata, DNase/RNase free	Gibco life technologies	Darmstadt	Deutschland

Tabelle 6.: Kernfärbung. DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) wurde zum Färben von ausgesprossenen USSC aus Mikromassen verwendet wurde.

2.1.5 Assay Kits

CyQuant®GR <i>reagent</i>	Invitrogen GmbH	Karlsruhe	Deutschland
<i>Cell-lysis buffer</i>	Invitrogen GmbH	Karlsruhe	Deutschland
λ -DNA standard 100 μ g/ml	Invitrogen GmbH	Karlsruhe	Deutschland
<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i> (DPBS)	Invitrogen GmbH	Karlsruhe	Deutschland

Tabelle 7.: CyQuant® Proliferationsassay Kit. Anhand des Proliferationsassays wurde die proliferative Aktivität von ML-USSC und ausgesprossenen USSC bestimmt.

2.1.6 EDV-Programme zur Vermessung und Auswertung

Microsoft Office 2011 (Excel, Word, OneNote)	Microsoft Corporation	Redmond	USA
BZII-Analyzer Keyence <i>Programs</i>	KEYENCE Deutschland GmbH	Neu-Isenburg	Deutschland

Tabelle 8.: Verwendete EDV-Programme zur Vermessung und Auswertung. Das BZII-Analyzer Keyence *Programs* wurde zur Ausmessung von ausgesprossenen USSC verwendet. Die restliche Datenanalyse erfolgte mit Microsoft Office.

2.1.7 Geräte und Laborhilfsmittel

Autoklav D-65	Systec GmbH	Wettenberg	Deutschland
Tecan Genios	Tecan	Männedorf	Schweiz
Tecan infinite M200	Tecan	Männedorf	Schweiz
BioPhotometer 6131	Eppendorf AG	Hamburg	Deutschland
Brutschrank Cytoperm 2 Heracell 240	Heraeus Holding GmbH	Hanau	Deutschland
<i>Chamber-Slides</i>	Nunc™ Lab-Tek™ Thermo Scientific™	Waltham	USA
Deckgläser für Mikroskopie, 24 x 50 mm	Engelbrecht Medizin- & Labortechnik GmbH	Edermünde	Deutschland
Gefrierschränke	Liebherr	Ochsenhausen	Deutschland
Küvetten UVetten	Eppendorf AG	Hamburg	Deutschland
Kühlschränke	Liebherr	Ochsenhausen	Deutschland
Mikroskop BZ-9000E KEYENCE	KEY-ENCE Deutschland GmbH	Neu-Isenburg	Deutschland
Multiwellzellkulturplatten (Briscoe and Small 2015)	Greiner bio-one GmbH	Frickenhausen	Deutschland
Neubauerzählkammer Improved	Assistant	Sondheim	Deutschland
Pipettenspitzen TipOne (0,1-10;1-100;200,101-1000µl)	Starlab GmbH	Ahrensburg	Deutschland
Pipettierhelfer accu-jet pro	Brand	Wertheim	Deutschland
Sterilbank HeraSafe	Heraeus Holding GmbH	Hanau	Deutschland
Stickstofftank Arpège 170	Air Liquide	Paris	Frankreich
Nitril-Handschuhe	Ansell	Brüssel	Belgien
Serum-Pipetten	Costar Corning	New York	USA

Vinitex Airflow Abzug nach DIN EN 14175	Vintex Labor-einrichtungen GmbH & CoKG	Coswig	Deutschland
Wasserbad	Kötter-mann System-labor	Uetze/ Hänigsen	Deutschland
Zellkulturflasche (25, 75 cm ²)	Greiner bio-one GmbH	Fricken- hausen	Deutschland
Zentrifuge Multifuge 1S-R	Heraeus Holding GmbH	Hanau	Deutschland
Zentrifugenröhrchen Falcon (15, 50 ml)	Becton Dickinson Labware	Franklin Lakes (NJ)	USA

Tabelle 9.: Geräte und Laborhilfsmittel. Diese Utensilien wurden in der experimentellen Phase der Arbeit verwendet.

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Kryokonservierung

Vor der Langzeitlagerung des Zellmaterials im flüssigen Stickstoff sollten die Zellen vital und frei von jeglichen Kontaminationen sein (Gstranthalder and Lindl 2013). Zuerst wurden die Zellen mit Trypsin aus den Kulturflaschen abgelöst. Die Trypsinwirkung wurde mit serumhaltigem Medium gestoppt und die Zellzahl mittels der Neubauer-Kammer bestimmt. Nach erneutem Zentrifugieren wurde die Zellzahl auf 1×10^6 Zellen pro Kryoröhrchen im Einfriermedium eingestellt und mit DMSO zu einer 1:5 Medium Lösung verdünnt. Zur Minderung der toxischen DMSO-Wirkung bei Raumtemperatur erfolgte ein schrittweises rasches Abkühlen der Zellsuspension:

- Abkühlen der Zellsuspension im Gefrierschrank auf 4°C
- Transfer in den Tiefkühlschrank auf -20°C (2-4h)
- Transfer in den Tiefkühlschrank auf -80°C (Lagerung über Nacht)
- Überführung in flüssigen Stickstoff bei -180°C

2.2.2 Auftauen

Der Auftauvorgang erfolgte möglichst kurzzeitig, um den toxischen Eigenschaften des DMSO entgegenzuwirken. Das Kryoröhrchen mit den gefrorenen Zellen wurde in einem 37°C warmen Wasserbad aufgewärmt, bis das Eis in der auftauenden Lösung auf Erbsengröße geschmolzen war. In 10ml serumhaltigem Medium wurde die vollständig aufgetaute Suspension zügig aufgenommen. Nach dem Zentrifugieren bei 550 rcf in 4°C für 7 min konnte das Zellsediment rückgelöst in frischem Medium zur Kultivierung aufgenommen werden. Das Medium wurde nach 24h komplett gewechselt.

2.2.3 Kultivieren und Passagieren der Monolayerkultur

Die USSC wurden zur zügigen Zellexpansion zunächst über drei bis vier Passagen als Monolayerkulturen angelegt. Bei einer Verdopplungszeit von ca. 45-53h wurden bei einer Konfluenz von 80% die USSC passagiert, um Differenzierungsprozesse zu vermeiden. Zur Vorbereitung auf die Trypsinierung wurde das Kulturmedium durch 10ml PBS ersetzt. Dadurch wurden Reste des Mediums sowie divalente Kationen ausgewaschen. Nach Entnahme des PBS wurde die Zellkultur mit 5ml einer 0,25% Trypsin-Lösung für 10 min im Brutschrank bei 37°C in 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit gelagert. Durch seine Proteaseaktivität an den zellulären Adhäsionsproteinen löst Trypsin die Zelloberflächenverbindungen. Leichtes „Klopfen“ an den vertikalen Seiten der Kulturflasche hilft mechanisch beim Ablösen der restlichen Zellen. Die Trypsin-Aktivität wurde durch Zugabe von 10ml serumhaltigem Medium gestoppt und die Suspension bei 550 rcf und 4°C für 7min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 5ml Medium rückgelöst. In einer 1:3 Verdünnung wurden die abgelösten Zellen in 15ml Medium auf neue Kulturflaschen aufgeteilt. Der reguläre Mediumwechsel erfolgte dann alle 3 Tage. Die ML-USSC hatten insgesamt eine Kulturdauer von 12 Tagen.

2.2.4 Zellzählung (Neubauer-Kammer)

Die Neubauer-Kammer dient zur Quantifizierung der Zellen in einer definierten Suspension. Zuvor wurden die Zellen von den Kulturflaschen mittels Trypsin gelöst. Mithilfe einer Neubauer-Kammer konnten unter dem Durchlichtmikroskop die Zellen gezählt werden. Hierzu wurde eine Zellsuspension 1:2 mit Trypanblau vermengt und zwischen Deckglas und Neubauer-Kammer pipettiert. Bei der Vitalfärbung Trypanblau zeichnen sich lebendige helle Zellen deutlich von den dunklen toten Zellen ab. Die Gittereinteilung der *Neubauer improved Kammer* ist so ausgelegt, dass einem Großquadrat ein Suspensionsvolumen von 0,1µl entspricht. Es werden die Zellen in vier Großquadraten gezählt.

In der unten angegebenen Formel werden sowohl der Durchschnittswert pro Quadrat, der Verdünnungsfaktor sowie die Zellzahl pro ml berücksichtigt. $\text{Gesamtzellzahl} = (\text{gezählte Zellzahl}) / 4 \times 2 \times 10^4 \times \text{ml}$. Der ermittelte Wert zeigt die Zellzahl pro ml. Nach Multiplikation mit dem Gesamtvolumen erhält man die Gesamtzellzahl der vorliegenden Suspension.

2.3 Die Herstellung von Mikromassen und Versuche mit ausgesprossenen Zellen

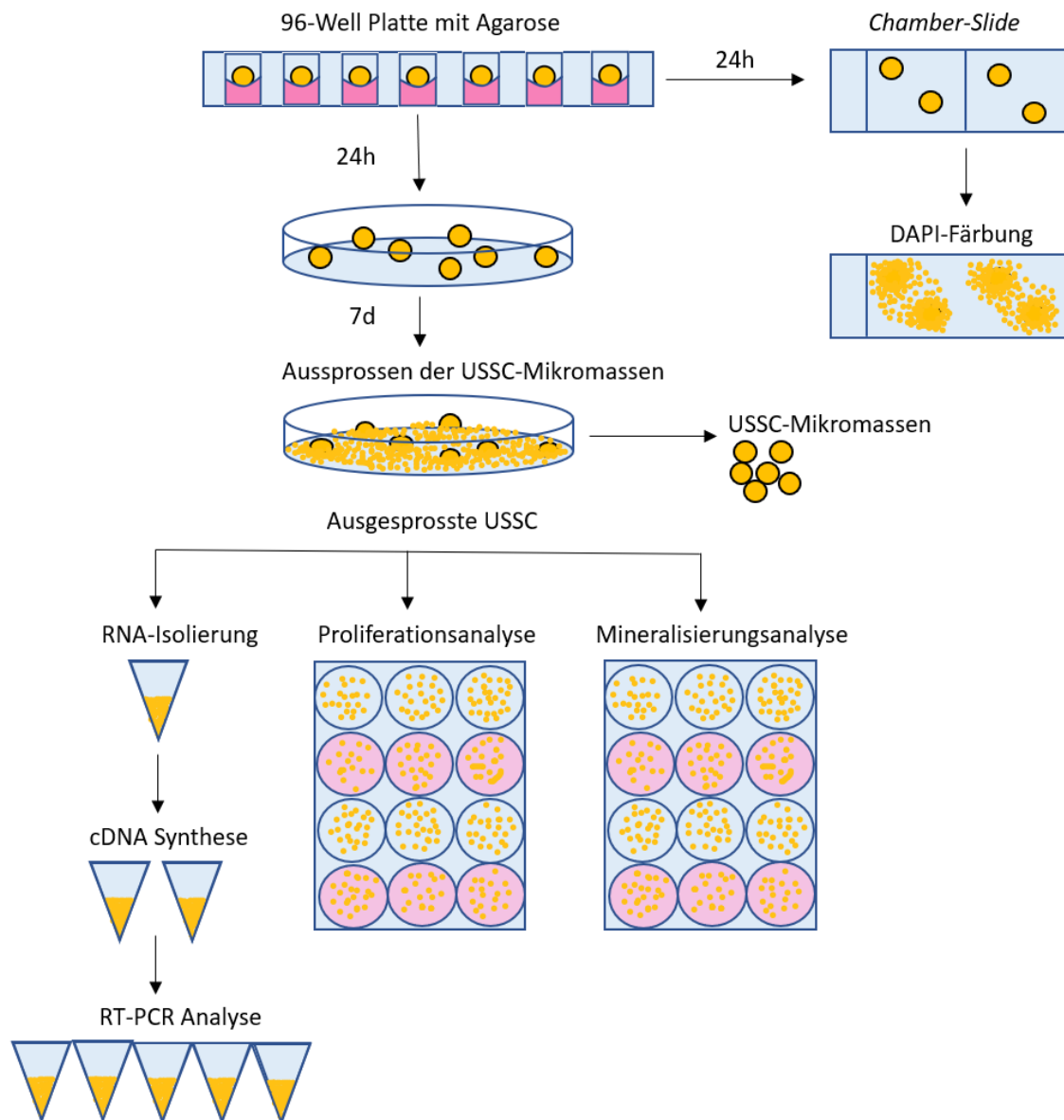


Abb.2: Versuchs-Schema. Anfertigung der Mikromassen in 96-Well Platten. Nach 24h erfolgte das Umsetzen auf *Chamber-Slides* für die DAPI-Färbung oder zum Aussprossen für 7 Tage in Petrischalen mit Medium. Nach Entfernung der Mikromassen erfolgte die RNA-Isolation zur cDNA-Synthese des ausgesprossenen Zellrasens. Die cDNA wurde zur RT-PCR Analyse (*Reverse Transcriptase* Polymerase Kettenreaktion) verwendet. Zellen des ausgesprossenen Zellrasens wurden für 10 Tage auf 24-Well Platten ausgesät zur Analyse der Proliferation mit dem CyQuant® Cell Proliferationsassay Kit® und der Mineralisation mit dem OsteoImage™ Mineralisierungsassay.

2.3.1 Die Herstellung von Mikromassen

Die dreidimensionalen Kultursysteme wurden aus ML-USSC gewonnen. Bei Erreichen einer Konfluenz von ca. 80% wurden die zweidimensional kultivierten USSC abgelöst. Mit 1×10^6 Zellen pro ml wurde die Zellsuspension entsprechend der zu erreichenden Mikromassengröße mit Medium verdünnt (siehe Tabelle unten). In Vorversuchen erwies sich die Mikromasse aus 45Mm (45.000) Zellen als effektive Transfereinheit, mit der die Handhabbarkeit zum Transfer aus der Agaroseplatte noch gewährleistet war. Die 90Mm (aus 90.0000 Zellen) erwies sich als die maximal mögliche Größe, mit der die Anwendbarkeit ohne Mikromanipulation erfolgen konnte. Mit zunehmender Mikromassengröße muss von einer zunehmenden Minderversorgung zentraler Zellen in der Mikromasse mit Nährstoffen und Sauerstoff gerechnet werden. Gleichzeitig sollen möglichst hohe Zellzahlen in Form der Mikromasse transferfähig sein, um eine suffiziente Defektüberbrückung einer ossären Läsion *in situ* zu ermöglichen.

Verdünnungsreihe der Zellsuspension zur Mikromassen Herstellung	
Verdünnung (Zell-Suspension: Medium)	Mikromassen-Größe (Zellzahl)
1:3	45.000
1:1	90.000

Tabelle 10.: Verdünnungsreihe der Zellsuspension zur Mikromassen Herstellung. Zur Herstellung der verschiedenen Mikromassengrößen- 45Mm (45.000 Zellen) und 90Mm (90.000 Zellen) wurden die entsprechenden Verdünnungen der Zellsuspension angewandt.

Zur parallelen und homogenen Herstellung der Mikromassen bietet die Kultivierung in einer nicht-adhäsiven 96-Well Platte eine effektive Methode (Hildebrandt, Buth et al. 2011). Es wurden 1,2g Biozym Agarose als Pulver mit 60ml serumfreien DMEM im Autoklaven bei 116°C erhitzt. Je 60µl der Agaroselösung (80°C) wurden pro Well einer 96-Well Platte zügig pipettiert. Nach 30min bei Raumtemperatur formte sich im abgekühlten Zustand eine konkave und für die Zellen nicht-adhärenente Gel-Oberfläche. Die aus den Kulturflaschen abgelösten Zellen wurden mit serumhaltigem Medium entsprechend der Mikromassengröße nach Protokoll (siehe oben) t. Pro Well wurden 180µl dieser Suspension pipettiert. Nach ca. 24h im Brutschrank bei 37°C in 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit bildete sich nach dem Absinken der Zellen aus der Suspension eine sphärische Zell-Formation entsprechender Größe. Die geformten Mikromassen wurden nach 24h mit einer 1000µl-Pipette geerntet (siehe Abbildung 2).

2.3.2 Die Ernte von ausgesprossenen Zellen

Die auf den Agarose-Platten geformten Mikromassen wurden mittels einer 1000µl-Pipette in eine sterile 90mm x 15mm Petrischale gesetzt (siehe Abbildung 3). Es wurden kumulativ 24 Mikromassen jeweils einer bestimmten Größe in 7ml Kulturmedium pro Petrischale kultiviert. Dabei wurde auf eine homogene Verteilung der Mikromassen innerhalb der Petrischale geachtet, um eine möglichst großflächige und ungehinderte Aussprossung zu gewährleisten. Die Petrischalen wurden im Brutschrank bei 37°C in 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit für 7 Tage inkubiert. Alle 3 Tage erfolgte ein Mediumwechsel.

Zur Vorbereitung auf die Trypsinierung wurde das Kulturmedium durch 10ml PBS ersetzt. Nach PBS-Entfernung wurden die Zellrasen mit 5ml einer 0,25% Trypsin-Lösung für 7min im Brutschrank bei 37°C in 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit gelagert. Die Mikromassen wurden durch vertikales Beklopfen der Petrischalen vom Untergrund gelöst und mithilfe einer 1000 µl-Pipette aufgenommen und verworfen. Die USSC des Zellrasens wurden nun mit einem Zellschaber vorsichtig vom Untergrund gelöst. Mit 10ml Kulturmedium wurde nach insgesamt 10min Einwirkzeit die Aktivität des Trypsins aufgehoben. Die erhaltene Suspension wurde bei 550rcf und 4°C für 7min zentrifugiert.

Der ausgesprossene Zellrasen wurde für die Analyse der Proliferation, Mineralisierung und zur RNA-Isolierung verwendet. Zur Untersuchung des Proliferations- und Mineralisierungsverhaltens wurden die Zellsuspension in 24-Well Platten mit Kulturmedium aufgenommen. Das andere Drittel der Zellsuspension wurde nach Protokoll der Kryokonservierung bei -80°C im flüssigen Stickstoff zur RNA-Isolierung gelagert.

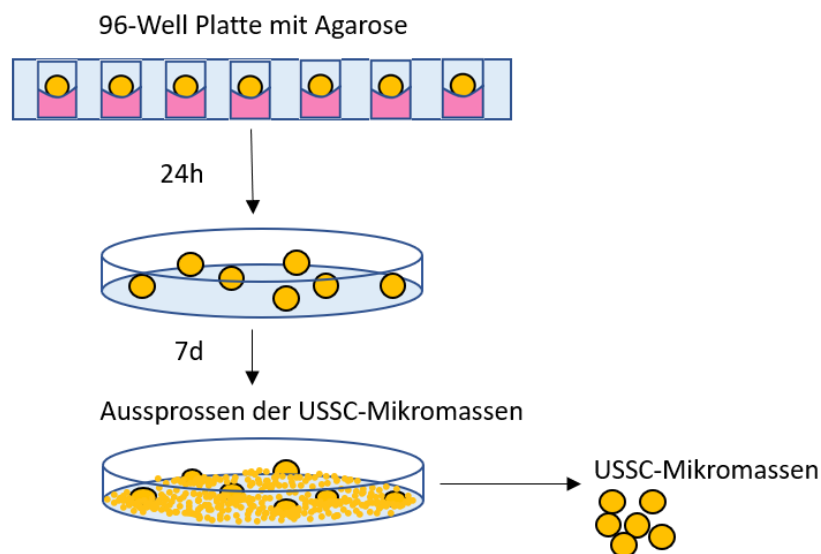


Abb.3: Versuchsschema der ausgesprossenen Zellen. USSC-Mikromassen werden in einer 96-Well Agarose-Platte innerhalb von 24h geformt. Danach erfolgt ein Umsetzen der fertigen

Mikromassen auf Petrischalen. Es erfolgt eine Kultivierung für 7 Tage mit DMEM. Die Ablösung der Mikromassen erfolgt durch Trypsin. Anschließend wird der Zellrasen gelöst. Die ausgesprosten Zellen werden zur Proliferations- und Mineralisierungs-Analyse sowie zur Kryokonservierung genutzt. Die kryokonservierten Zellen wurden weiter zur RNA-Isolation verwendet.

2.3.3 Dotierung von *Chamber-Slides* mit Mikromassen

Die Kultivierung von Mikromassen auf *Chamber-Slides* diene vor allem der Vermessung der Aussprossdistanz in Abhängigkeit zur Mikromassengröße und Kulturdauer. Dafür wurden *Chamber-Slides* der Firma Nunc verwendet. Sie bestehen aus einem Glasobjektträger und einer aufgeklebten Kulturkammer, welche nach der Beendigung der Kultur entfernt werden kann.

Die 45Mm und 90Mm wurden 24h nach Herstellung mit Hilfe einer 1000 µl Pipette auf 1,7 cm² und 4,2 cm² große *Chamber-Slides* umgesetzt. Es wurden pro Kammer 2 Mikromassen gleicher Sorte mit 1 ml Medium kultiviert. Die Mikromassen wurden mittig der Kammer und diagonal zueinander angeordnet, um eine möglichst ungehinderte Aussprossung zu ermöglichen. Das Medium wurde alle 3 Tage komplett erneuert. Zu den jeweiligen zeitlichen Abständen von 5, 6, 8, 9, 11, 12, 14 und 16 Tagen wurden 2 Glas-Objektträger mit je 4 Mikromassen (kumulativ 8 Mikromassen) je Sorte gestoppt.

2.3.4 Kernfärbung und Messung der Aussprossdistanz

DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) ist ein fluoreszierender Kernfarbstoff, der sich an AT-reiche Regionen der doppelsträngigen DNA anlagert. Er durchdringt die intakte Zellmembran und kann so lebende und fixierte Zellen markieren.

Der Versuchsaufbau erfolgte wie in Abbildung 4 dargelegt. In festgelegten zeitlichen Abständen von 5, 6, 8, 9, 11, 12, 14 und 16 Tagen wurden 2 Objektträger pro Versuchsgruppe bzw. insgesamt 4 Objektträger mit kumulativ 8 Mikromassen abgestoppt. Dazu wurde das Medium entfernt und das *Chamber-Slide* mit 1ml PBS gewaschen. Um den Zellrasen zu fixieren, wurde 1ml einer 4% Formaldehyd-Lösung für 15min auf die Kultur gegeben. Das Präparat wurde vor dem Eindecken mit 1ml bidestilliertem Wasser gewaschen und die vertikalen Wände der *Chamber-Slides* entfernt. Der ausgesproste Zellrasen konnte mit DAPI unter einem Deckglas eingedeckt werden. Der nun eingefärbte Objektträger wurde für 24h in einer dunklen Umgebung getrocknet. Mit einem BZ-9000E

KEYENCE-Mikroskop wurden die eingefärbten Präparate bei 40-facher Vergrößerung unter DAPI- Fluoreszenz fotografiert und anschließend mithilfe des BZII-Analyzer Keyence Programms vermessen.

Innerhalb des 90° Winkels wurden die Distanzen in fünf Winkelsegmenten, jeweils 18° gemessen. Die Messung der Aussprossdistanz erfolgte in µm und verlief vom Mikromassen Ursprung bis zu den äußersten 5 Zellen innerhalb des angegebenen Winkels. Für die Auswertung der Aussprossdistanzen wurden je Messpunkt (Tag 5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 16) 4 bis 11 Mikromassen vermessen.

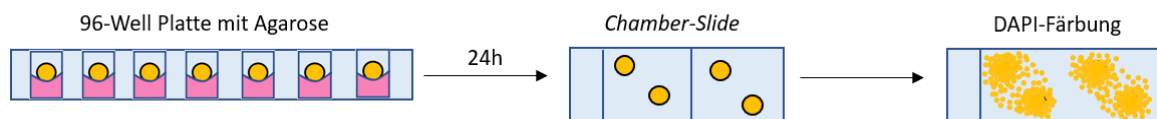


Abb.4.: Versuchsaufbau des Ausspross-Versuchs. Initial erfolgte die Herstellung der USSC-Mikromassen auf den Agarose-Well Platten. Es wurden Mikromassen der Größen 45Mm und 90Mm verwendet. Nach 24h konnten die Mikromassen geerntet und auf die Glas-Chamber-Slides umgesetzt werden. Nach einer definierten Kulturdauer von 5, 6, 8, 9, 11, 12, 14 und 16 Tagen erfolgte die DAPI-Färbung zur Darstellung des ausgesprossenen Zellrasens. Die Aussprossdistanz konnte mithilfe des BZ-9000E KEYENCE- Mikroskops bei 40-facher Vergrößerung fotografiert und mithilfe des BZII-Analyzer Keyence Programms vermessen werden.

2.3.5 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung erfolgte anhand des *easy-spin™ (DNA free) Total RNA Extraction Kit* von Intron Biotechnology. Durch Kombination der Säulen-Extraktion mit der löslichen Extraktionsmethode kann eine große Quantität an reiner RNA gewonnen werden ohne Alkohol Präzipitation. Die RNA ist frei von DNA-Kontaminationen und entspricht den Voraussetzungen für die cDNA-Synthese und RT-PCR.

Das zu verwendende Zell-Material wurde durch Trypsinieren, Zentrifugieren und anschließender Überstandsentsnahme auf die Isolierung vorbereitet. Die Proben wurden bei -80°C eingefroren und zur parallel erfolgenden Isolierung am Tag der Verarbeitung aufgetaut, um möglichst gleiche Versuchsbedingungen zu erreichen.

Nach Angaben des Herstellerprotokolls wurde zuerst die lösliche Extraktion mit Chloroform und *Lysis Puffer* durchgeführt. Anschließend erfolgte die Säulen-Extraktion mit Wasch-Puffern, die zur isolierten RNA in 40µl Elution Puffer führte. Mit dem Photometer konnte bei einer Wellenlänge von 260nm anhand der optischen Dichte in der RNA-Gehalt einer 1:20

Verdünnung gemessen werden. Die Quantifizierung der RNA erfolgte über das *Lambert-Beer'sche-Gesetz* und wurde mit einem spezifischen Extinktionskoeffizienten von 40 für einzelsträngige RNA bestimmt.

Lambert-Beer'sches Gesetz: $E_{\lambda} = c \times \varepsilon_{\lambda} \times l$

E: Extinktion

c: Die Konzentration der absorbierenden Substanz (Flüssigkeit), Einheit ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$)

ε : Extinktionskoeffizient (spektraler Absorptionskoeffizient) bei der Wellenlänge λ (= 260nm).

l: Schichtdicke der verwendeten Küvette

2.3.6 cDNA-Synthese

Die cDNA wurde mithilfe des *SuperScript™ II Reverse Transcriptase Kits* von Invitrogen synthetisiert. Laut der Hersteller Anweisung wurden zunächst 1µl Oligo(dT), 1µl dNTP Mix mit 1µg RNA gemischt und für 5min bei 65°C im Thermomixer (Eppendorf) erhitzt. Nach der Kühlung auf Eis wurden 5 x 4µl *First Strand Buffer*, 2µl 0,1M DTT (Dithiothreitol) sowie 1µl *RNaseOUT™* pro Reaktion hinzugegeben und für 2min bei 42°C erhitzt. Nach Zugabe von 1µl *SuperScript™ II RT* je Reaktion wurden die Proben für 50min bei 42°C und danach für weitere 15min bei 70°C im Thermomixer (Eppendorf) inkubiert. Die synthetisierte cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.3.7 Reverse Transcriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Die erzeugte cDNA von ML-USSC, 45Mm und ausgesprosten USSC aus 45Mm und 90Mm wurde zur vergleichenden Analyse der Translation des Genexpressionsprofils verwendet. Die Versuchsgruppe der 45Mm wurde am 2 Kulturtag zur RNA-Extrahierung geerntet. Diese Mikromassen-Größen wurden gewählt, um den Effekt der hohen Zelldichte auf den Zellmetabolismus und den Sauerstoffbedarf gegebenenfalls minimieren.

Die hier angewandte Methode der quantitativen *Reverse Transcriptase* Polymerase Kettenreaktion ist ein etabliertes und sensitives Verfahren zur Analyse des Genexpressionsprofils (Heid, Stevens et al. 1996). Dabei wird die relative Quantifizierung

der Genexpression anhand eines *Housekeeping*-Gens, der GAPDH (Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase) durchgeführt.

In dieser Arbeit wurden die Veränderungen des Genexpressionsprofils von bestimmten Leitmarkern der Stammzellnische analysiert: Vinkulin, Matrix-Metalloproteinasen (MT1-MMP), Notch3 und HIF-1. Pro Reaktion werden 25µl *Mastermix* aus 12,5µl *qPCR MasterMix No ROX* verwendet. Der *qPCR MasterMix No ROX* *Mastermix* beinhaltet: Reaktionspuffer, dNTPs (incl. dUTP), *HotGoldStar* DNA-Polymerase, MgCl₂, Uracil-N-Glycosylase und Stabilisatoren. Zusätzlich wurden 1µl *Forward-Primer*, 1µl *Reverse-Primer*, 0,5µl Sonde und 5µl *DNase/RNase* freies Wasser hinzugefügt. Es wurden je Reaktion 20µl pro Well in eine 96-Well PCR Platte pipettiert. Die cDNA wurde in einer 1:10 Verdünnung eingesetzt, um die Pipettierfehlerrate zu minimieren. Aus dieser Verdünnung wurden rein rechnerisch pro Reaktion 0,5µl cDNA mit 4,5 µl *DNase/RNase* freiem Wasser verdünnt. Es wurden also jeweils 5µl der Verdünnung eingesetzt. Die mit 8er Strips sukzessiv verschlossene 96-Well Platte wurde nach Anwahl des Programms in den *Thermocycler (iCycler®)* gegeben. Folgende Schritte wurden durchlaufen.

Thermocycler Programm der RT-PCR				
Zyklus Nummer	Anzahl der Zyklen	Steps der Zyklen	Temperatur (°C)	Zeit
1	1	1	50	2min
2	1	1	95	5min
	40	1	95	15s
3	40	2	60	45s
4	1	1	4	Hold

Tabelle 11.: Thermocycler Programm der RT-PCR. Das Temperatur-Zeit-Profil des Thermocyclerprogramms zur RT-PCR (*Reverse Transcriptase* Polymerase Kettenreaktion). Die Detektion der freigesetzten Fluoreszenz erfolgte jeweils nach Step 2 in Zyklus Nummer 3. Es wurden die Veränderungen der Expression von Vinkulin, MT1-MMP, HIF-1 und Notch3 untersucht.

2.3.8 Sequenzen der verwendeten *Primer* und Sonden der RT-PCR

Die Oligonukleotide (*Primer*: Tabelle 4, Sonden: Tabelle 5) wurden von der Firma Eurofins MWG Operon hergestellt und im lyophilisierten Zustand geliefert. Nach Hersteller Angaben erfolgte die Verdünnung mit *DNase/RNase* freiem Wasser auf 100µM zur Herstellung der Stammlösung. Vor Gebrauch wurde die Stammlösung auf 20µM verdünnt.

Primer-Sequenzen der verwendeten Gene	
Gen	Primer-Sequenz
GAPDH (<i>Housekeeping Gen</i>)	5' <i>Primer</i> GCT CTC TGC TCC TCC TGT TC 3' <i>Primer</i> ACG ACC AAA TCC GTT GAC TC
Vinkulin	5' <i>Primer</i> GCA AAT GGT CCA GCA AGG 3' <i>Primer</i> CCT CTT ACC AGC CGA GAC AT
MT1-MMP	5' <i>Primer</i> ACA AGA TGC TCT GCC ACG TAT 3' <i>Primer</i> TCA ATA CCG CTT TCC CGT AG
HIF-1	5' <i>Primer</i> TTT TCA AGC AGT AGG AAT TGG AA 3' <i>Primer</i> GTG ATG TAG TAG CTG CAT GAT CG
Notch3	5' <i>Primer</i> CAA TGC TGT GGA TGA GCT TG - 3 3' <i>Primer</i> AAG TGG CTT CCA CGT TGT TC

Tabelle 12.: Primer-Sequenzen der verwendeten Gene. Es wurden die Gene Vinkulin, MT1-MMP, HIF-1 und Notch3 zur Analyse des Erhalts der Stammzellnische untersucht.

Sonden der verwendeten Gene	
Gen	Sondennummer
GAPDH	60
Vinkulin	21
MT1-MMP	70
HIF-1	66
Notch3	26

Tabelle 13.: Sonden der verwendeten Gene. Die Sonden stammen aus der *Universal Probe Library*, Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim (D). Es wurden die Gene Vinkulin, MT1-MMP, HIF-1 und Notch3 zur Analyse des Erhalts der Stammzellnische untersucht.

2.3.9 Formel zu Auswertung der quantitativen PCR-Ergebnisse

Für den quantitativen Nachweis eines Zielgens ist eine exakte mRNA-Quantifizierung mit hoher Wiederholbarkeit voraussetzend (Bustin 2000). Das Gen-Expressionslevel wurde anhand des durch Pfaffl und Mitarbeiter publizierten Protokolls zur Analyse der *Reverse Transcriptase* PCR durch Normalisierung der Expressionsergebnisse ausgewertet. Durch diese Methode wird vor allem die Varianz der Expressionsergebnisse reduziert (Pfaffl 2001). Individuelle Probeneffekte wie Gewebe und Matrixeffekte, verschiedene RNA-Extraktionskoeffizienten und Fehler bei der reversen Transkription betreffen dadurch gleichermaßen Zielgen und *Housekeeping*-Gen. Durch die relative Quantifizierung heben sich diese Effekte auf (Pfaffl 2001). Bei der Normalisierung der Expressionsergebnisse wird die Expression des Zielgens in Relation zu einem *Housekeeping*-Gen als Referenzgen gemessen. Als *Housekeeping*-Gene bezeichnet man diejenigen Gene, die für die Beibehaltung der grundlegenden zellulären Funktionen benötigt werden und die von den Versuchsbedingungen unbeeinflusst dasselbe Expressionslevel beibehalten. Das hier verwendete *Housekeeping*-Gen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) katalysiert in der Glykolyse Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu 1,3-Bisphosphoglyzerat und ist ubiquitär in Zellen vorhanden. Die relative Expression des Zielgens wird auf die Expression des *Housekeeping*-Gens durch Berechnung der Ratio bezogen. Die Ratio wird berechnet anhand der Formel $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Der Ct -Wert (*Cycle threshold*) gibt die Anzahl der nötigen PCR-Zyklen für die Überschreitung eines konstant definierten Fluoreszenzniveaus an. Die Menge an neusynthetisierter DNA ist zu diesem Zeitpunkt in allen Reaktionsgefäßen gleich. Bei 100% Effizienz der PCR verdoppelt sich mit jedem Zyklus der DNA-Gehalt und das Fluoreszenzsignal. Zur Berechnung des $\Delta\Delta Ct$ wird der Ct des *Housekeeping*-Gens vom Ct des Zielgens subtrahiert. Danach erfolgt die Subtraktion vom ΔCt der Versuchsgruppe mit dem ΔCt der monolayerkultivierten USSC-Gruppe. Der relative Expressionsunterschied normalisiert zum *Housekeeping*-Gen und bezogen auf die ML-USSC Kultur als Standardprobe ergibt sich durch die arithmetische Formel $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen 2001). Als statistisch signifikant gelten Abweichungen ab einem Faktor von 2.

$$\Delta Ct = Ct_{\text{Zielgen}} - Ct_{\text{GAPDH}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Mikromassen assoziierte Gruppe}} - \Delta Ct_{\text{USSC Monolayerkultur Gruppe}}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$= \frac{(-1)}{2^{-\Delta\Delta Ct}}$$

2.3.10 Die Mineralisierung der USSC

Zur Bildung einer mineralisierten extrazellulären Matrix können die USSC mithilfe des osteoblastären Differenzierungsmedium, DAG (Dexamethason, Ascorbinsäure, Beta-Glyzerolphosphat), angeregt werden. Dies geschieht über die Initiierung einer Kaskade von verschiedenen regulatorischen Prozessen (siehe 1.3 Die osteoblastäre Differenzierung von Stammzellen). Es wurden ML-USSC als Kontrollgruppe und 7 Tage ausgesprossene USSC aus 45Mm und 90Mm auf die Fähigkeit zur Ausbildung einer mineralisierten Matrix untersucht. Die Kultivierung erfolgte auf 24-Well Platten mit einer Kulturfläche von 1,9 cm² je Well. Zum Vergleich des osteoblastären Mineralisierungspotenzials wurden beide Gruppen jeweils mit DAG oder mit dem Kulturmedium DMEM für weitere 11 Tage kultiviert. Die Analyse der gebildeten mineralisierten Matrix erfolgte durch das OsteoImage™ Mineralisationsassay. Hierbei wird ein hydroxylapatitspezifisch bindendes Peptid verwendet, das an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist.

2.3.11 Mineralisierungsassay: OsteoImage™

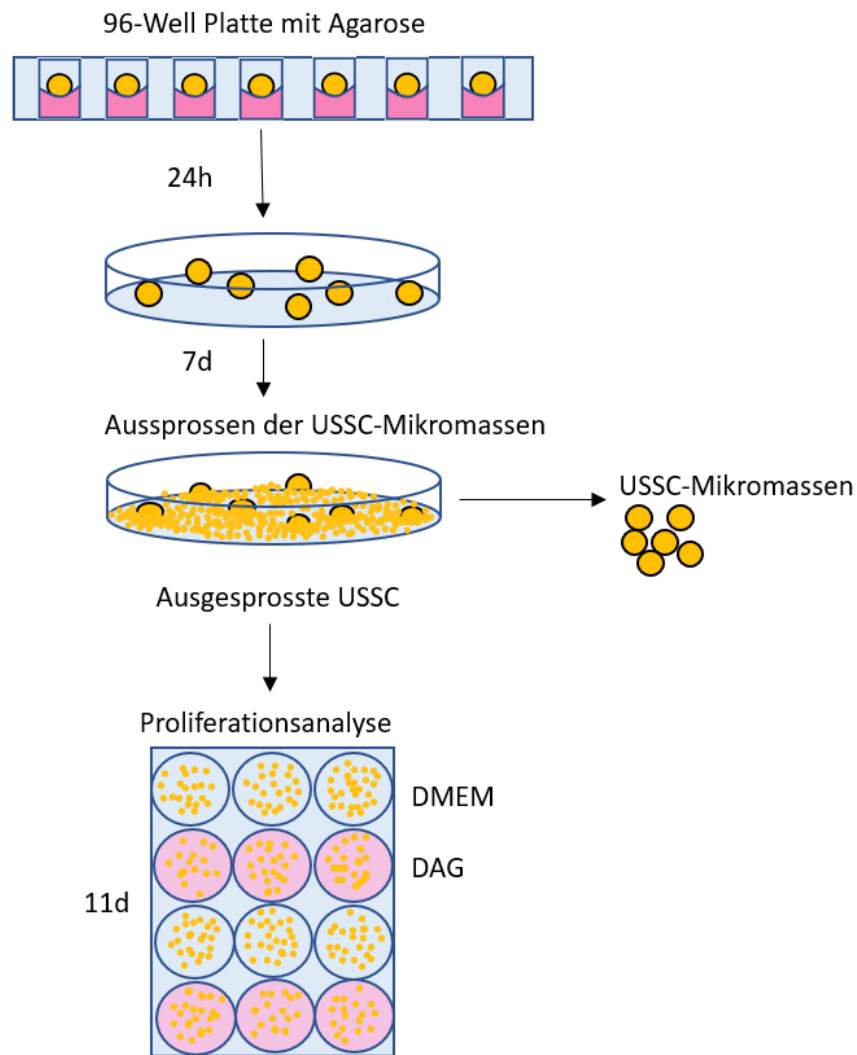


Abb.5.: Versuchsaufbau zur Untersuchung des osteoblastären Differenzierungspotenzials.

Es wurden ML-USSC, ausgesprossene USSC aus 45Mm und 90Mm auf die Bildung einer mineralisierten Matrix untersucht. Die jeweiligen Versuchsgruppen wurden mit osteoblastären Differenzierungsmedium (DAG) oder mit Kulturmedium (DMEM) für 11 Tage auf 24-Well Platten kultiviert. Die Analyse der mineralisierten Matrix erfolgte durch das OsteoImage™ Mineralisationsassay. Hier wird ein hydroxylapatitspezifisch bindendes Peptid verwendet, das an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Die Messung der Fluoreszenz der eingefärbten Hydroxylapatit-Kristalle wurde anhand des Fluorometers GENios mit einer Exzitationswellenlänge von 485nm und einer Emissionswellenlänge von 535nm über einen Integrationszeitraum von 30µs von der offenen Wellseite der Messplatte durchgeführt.

Mit dem Mineralisierungsassay OsteoImage™ lassen sich anhand eines Fluoreszenz-*in-vitro*-Assays Mineralisierungsereignisse der extrazellulären Matrix analysieren. Das Fluoreszenz-gekoppelte Färbereagens bindet dabei an die in der extrazellulären Matrix vorhandenen Hydroxylapatit-Kristalle, die in der EZM von osteoblastären Vorläuferzellen produziert wurden. Durch die Messung der Fluoreszenz-Werte mittels eines Fluorometers kann der Mineralisierungsgrad der extrazellulären Matrix festgestellt werden. Die oben genannten Versuchsgruppen wurden wie beschrieben mit DAG zur Ausbildung einer mineralisierten Matrix angeregt. Alle Versuchs-Gruppen wurden jeweils mit DAG oder mit dem Kulturmedium DMEM für weitere 11 Tage kultiviert (siehe Abbildung 5). Zur Analyse der Mineralisierung wurden zuerst der Wasch-Puffer 1:10 und anschließend das Färbereagens (*Staining Reagent*) 1:100 mit destilliertem Wasser verdünnt. Das Kulturmedium wurde in den 24-Well Platten durch PBS zum Entfernen von Rückständen ersetzt. Zur Fixierung erfolgte eine 20min Inkubation mit Ethanol. Nach Spülung mit Waschpuffer wurde 0,5ml des Färbereagens pro Well pipettiert und für 30min in dunkler Umgebung inkubiert. In dieser Zeit bindet der fluoreszierende Farbstoff an die Hydroxylapatit-Kristalle der mineralisierten Zellen und ein Ausbleichen der Fluoreszenz wird vermieden. Danach erfolgte dreimaliges Spülen mit dem Wasch-Puffer, um mögliche Rückstände der Färbelösung zu entfernen. Die Messung der Fluoreszenz der eingefärbten Hydroxylapatit-Kristalle wurde anhand des Fluorometers GENios mit einer Exzitationswellenlänge von 48nm und einer Emissionswellenlänge von 535nm über einen Integrationszeitraum von 30µs von der offenen Wellseite der Messplatte durchgeführt. Die Lichtausbeute bei Detektion von der Unterseite der jeweiligen Messplatte war deutlich geringer und für wenig mineralisierte Proben nicht aussagekräftig.

2.3.12 Proliferationsassay: CyQuant®

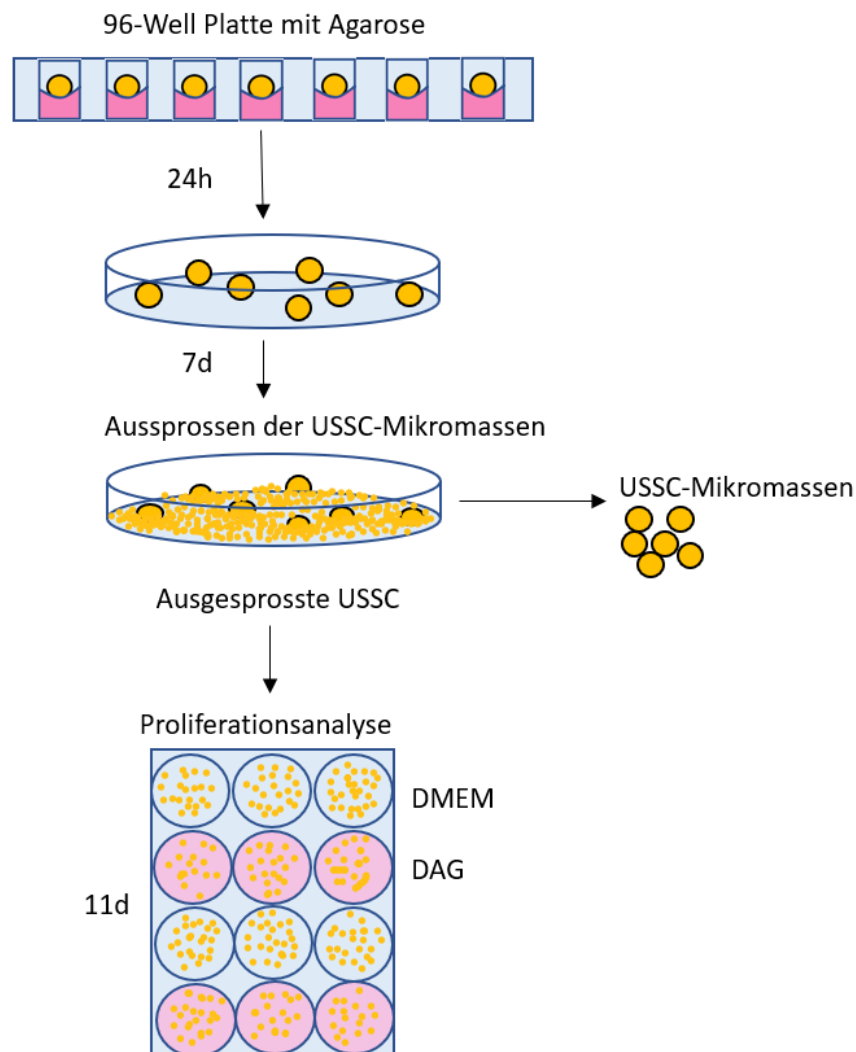


Abb.6.: Versuchsaufbau zur Untersuchung der Proliferationskapazität. Es wurden ausgesprossene USSC aus 45Mm und 90Mm auf die Proliferationsfähigkeit im Vergleich zu monolayerkultivierten USSC untersucht. Es wurden bei einer Aussaat von 10.000 Zellen pro cm² kumulativ 19.000 Zellen pro Well einer 24-Well Platte je mit osteoblastären Differenzierungsmedium (DAG) oder mit dem Kulturmedium (DMEM) für weitere 11 Tage kultiviert. Die Zunahme des DNA-Gehalts bzw. der Zellzahl wurde nach 11 Tagen mithilfe des CyQuant®-Assays bestimmt. Durch die Bindung eines Fluoreszenzfarbstoffes an freigesetzte Nukleinsäuren konnte mit dem Fluorometer GENios die Fluoreszenz-Werte der Proben ermittelt werden. Die Messung erfolgte bei einer Exzitations-Wellenlänge von 485nm und einer Emissions-Wellenlänge von 535nm über einen Zeitraum von 20µs integriert.

Das CyQuant® Cell Proliferationsassay Kit® von Invitrogen wurde zur Analyse der Proliferationsfähigkeit von ausgesprossenen USSC im Vergleich zu ML-USSC verwendet. Der Fluoreszenzfarbstoff CyQuant® GR dye zeigt eine hohe Affinität zur DNA eines Zell Lysats. Mithilfe eines Fluorometers konnte der Fluoreszenzwert dem DNA-Gehalt einer bestimmten Zellzahl innerhalb einer Probe zugeordnet werden. Zur Kalibrierung der Fluoreszenzwerte wurden Verdünnungsreihen mit ML-USSC (von 0 bis 100.000 Zellen) sowie mit der vom Hersteller zur Verfügung gestellten λ -DNA (von 0 bis 0,5ng) hergestellt. Jones et. al zufolge korrelieren die Fluoreszenz-Werte der jeweiligen Verdünnungsreihen linear ($r^2 > 0.995$) mit der Zellzahl bzw. des λ -DNA Gehalts (Jones, Gray et al. 2001). Abbildung 7 zeigt ein Beispiel einer Kalibrierungskurve.

Wie in Abbildung 6 dargestellt, wurden USSC aus ausgesprossenen Mikromassen der 45Mm und 90Mm an Tag 7 sowie ML-USSC als Kontrollgruppe, zur Ermittlung der Proliferationsfähigkeit untersucht. Es wurden bei einer Aussaat von 10.000 Zellen pro cm^2 kumulativ 19.000 Zellen pro Well einer 24-Well Platte je mit osteoblastären Differenzierungsmedium (DAG) oder mit dem Kulturmedium DMEM für 11 Tage kultiviert.

Die Zunahme des DNA-Gehalts bzw. der Zellzahl wurde nach 11 Tagen mithilfe des CyQuant®-Assays wie folgt bestimmt: Der 1:20 verdünnte Lyse Puffer, *Cell Lysis Buffer Stock Solution*, wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff, CyQuant® GR *Working Solution*, in 400-facher Verdünnung versetzt. Die zelluläre DNA wird durch die Lyse Puffer vermittelte Auflösung der Zell- und Kernmembranen freigesetzt, sodass der Fluoreszenzfarbstoff binden und einen Komplex mit den freigesetzten Nukleinsäuren bilden kann. Mit dem Fluorometer GENios wurden die Fluoreszenz-Werte der Proben bei einer Exzitations-Wellenlänge von 485nm und einer Emissions-Wellenlänge von 535nm über einen Zeitraum von 20 μ s integriert. Gemessen wurde von oberhalb der 96-Well Messplatte, die aus schwarzem Polystyrol war, um Störeffekte von benachbarten Wells auszuschließen. Die gemessenen Werte wurden, falls erforderlich, durch geeignete Verdünnung innerhalb des von der Korrelation festgelegten Intervalls ermittelt. Um die Replizierbarkeit zu prüfen, wurden die Messungen der Proben aus vier Aliquots der Färbung wiederholt.

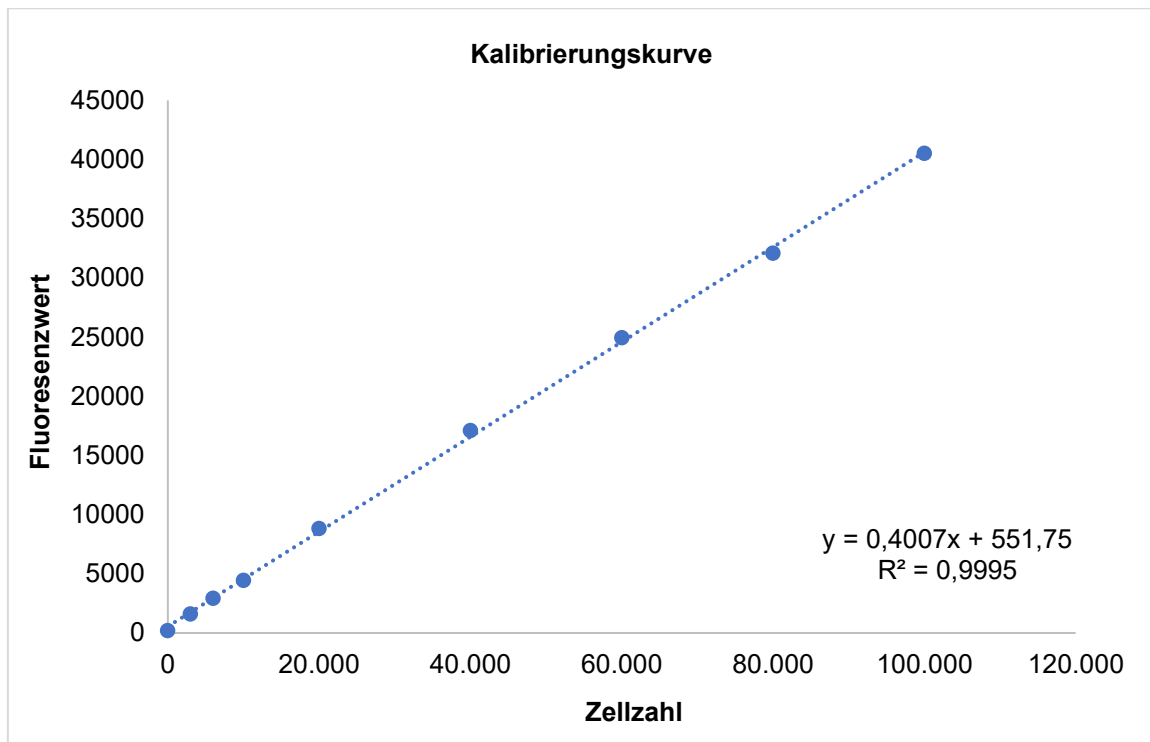


Abb.7.: Kalibrierungskurve. Ein Beispiel einer Kalibrierungskurve mit USSC. Der gemessene Fluoreszenzwert wird einer definierten Zellzahl zugeordnet. Mithilfe der linearen Gleichung können den gemessenen Fluoreszenzwerten der Versuchsgruppen eine Zellzahl zugeordnet werden.

2.4 Statistische Auswertung

Zur Sammlung der Daten und Analyse der Ergebnisse wurde Microsoft Excel (Version 2201) verwendet. Bei den erhobenen Daten handelt es sich um Distanzen, Fluoreszenzparameter und die vielfache Expression des *Housekeeping*-Gens (siehe 3.3.10. Formel zu Auswertung der quantitativen PCR-Ergebnisse).

Die Messung der Aussprossdistanzen von Mikromassen erfolgte in μm (siehe 3.3.5. DAPI-Färbung und Messung der Aussprossdistanz). Für die Auswertung wurden je Messpunkt (Tag 5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 16) 4 bis 11 Mikromassen vermessen. Es ergaben sich dadurch 96 Proben. Die Mittelwerte der Distanzen, Varianz und Standardabweichungen wurden mit Microsoft Excel (Version 2201) berechnet. Verglichen wurden die Mittelwerte durch einen zweiseitigen *student's t-test*. Es wurde ein α -Fehler mit $p < 0,05$ zur Berücksichtigung des Signifikanzniveaus angesetzt.

Bei den Proliferations- und Mineralisierungs-Analysen wurden pro Durchlauf 9 Mikromassen der gleichen Sorte gemessen. Es erfolgten 4 Durchläufe, sodass 36 Proben je Versuchsgruppe gemessen wurden. Insgesamt wurden dadurch 144 Proben untersucht. Die Berechnung der Mittelwerte, Varianz und Standardabweichung erfolgte mithilfe von Microsoft Excel (Version 2201). Zum Vergleich der Fluoreszenzmittelwerte wurde ein zweiseitiger *student's t-test* angewendet. Für das Signifikanzniveaus wurde ein α -Fehler mit $p < 0,05$ angesetzt. Die Grafikdarstellung aller Versuche erfolgte ebenfalls mithilfe von Microsoft Excel (Version 2201).

3 Ergebnisse

3.1 Aussprossversuch

3.1.1 Aussprossdistanz von USSC aus 45Mm

Wie in Abbildungen 8 und 9 ersichtlich, zeigten die humanen Nabelschnurblutstammzellen aus den 45Mm ein reges Aussprießen aus dem ursprünglichen sphärischen Zellkonglomerat. Am Tag der ersten Distanzmessung (Tag 5) wurde die durchschnittliche Aussprossdistanz mit $3,74\text{mm} \pm 1,00\text{mm}$ (SD) gemessen. Die Zunahme der durchschnittlichen Ausspross-Strecke verhielt sich über den Zeitraum von 16 Tagen linear, bei $R^2 = 0,96$. Nach 16 Tagen wurde eine Distanz von durchschnittlich $7,74\text{mm} \pm 2,41\text{mm}$ (SD) vom Mikromassen-Ursprung erreicht.

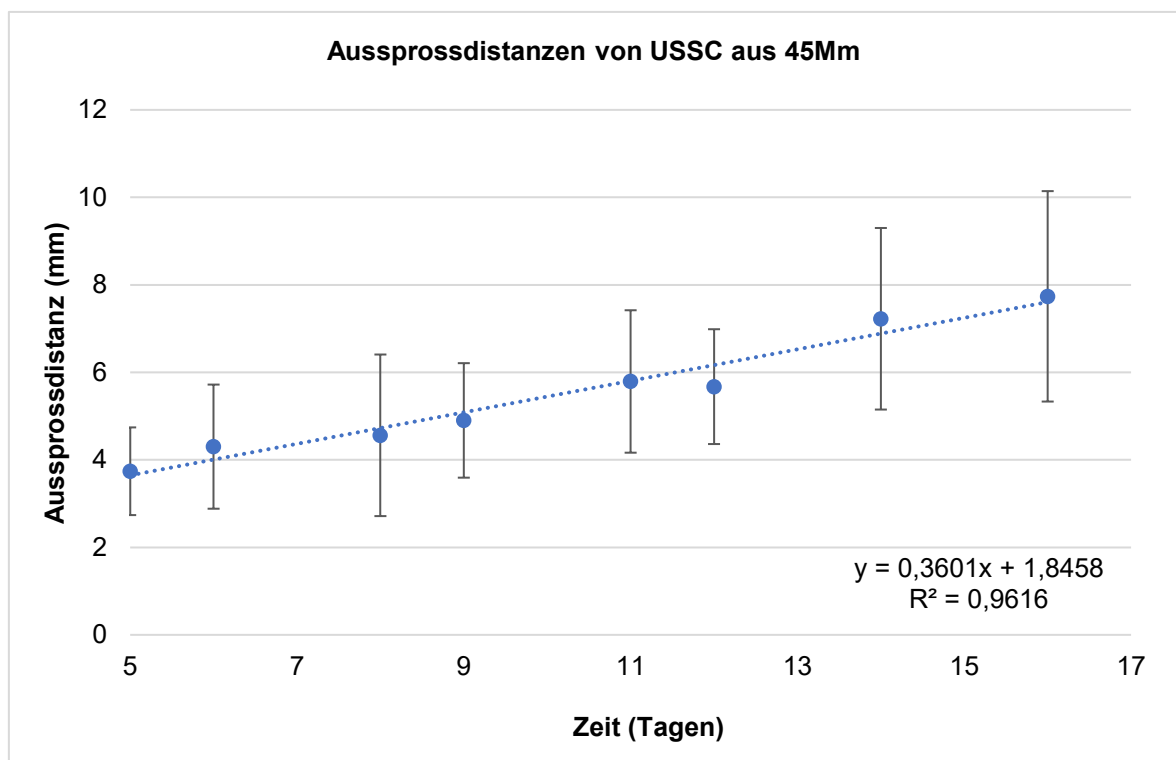


Abb. 8.: Aussprossdistanzen von USSC aus 45Mm. Die Mittelwerte der Aussprossdistanzen (mm) wurden über einen Kulturzeitraum von 5 bis 16 Tagen gemessen. Die Kultivierung erfolgte mit dem Kulturmedium DMEM auf Glasobjektträgern (*Chamber-Slides*). Im Rahmen der Standardabweichungen konnte ein linearer Zuwachs der Aussprossdistanz beobachtet werden.

Zeitabhängige Mittelwerte der Aussprossdistanzen von USSC aus 45Mm								
Tag	5	6	8	9	11	12	14	16
MW (mm)	3,74	4,30	4,56	4,90	5,79	5,67	7,23	7,74
STABW	1,00	1,42	1,85	1,31	1,63	1,31	2,08	2,41

Tabelle 14.: Zeitabhängige Mittelwerte der Aussprossdistanzen von USSC aus 45Mm. Die Mittelwerte der Aussprossdistanzen (mm) von USSC aus 45Mm in einem Zeitraum von 5 bis 16 Tagen. Die Präparate wurden mit DMEM (Kulturmedium) auf Glasobjektträger (*Chamber-Slides*) kultiviert. Es wurden der Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (STABW) für den jeweiligen Tag berechnet.

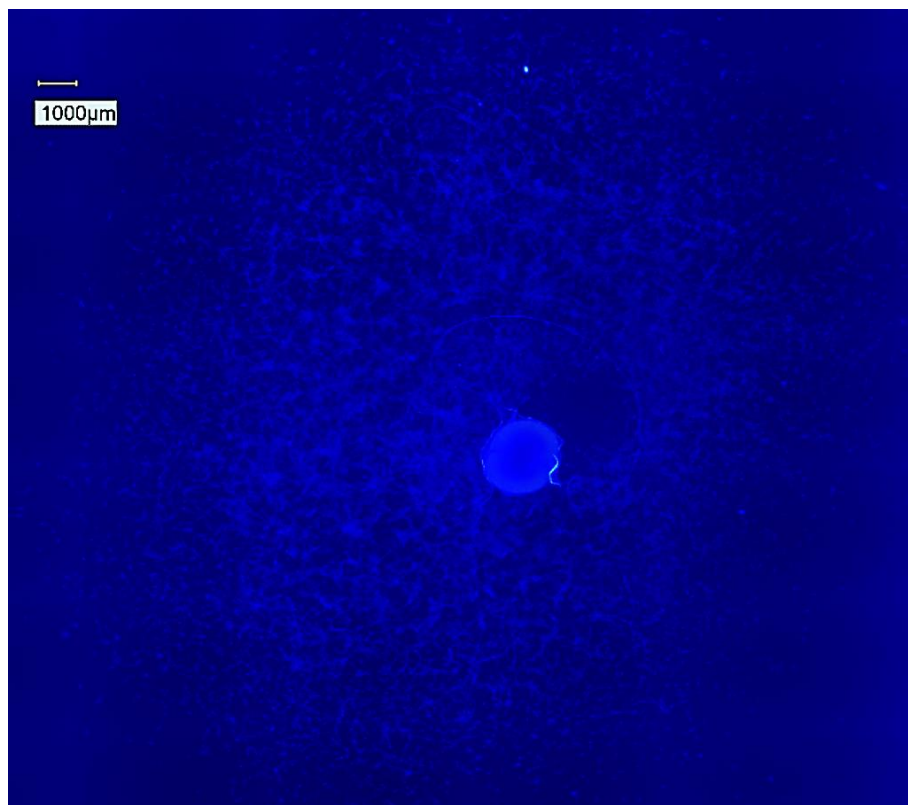


Abb.9.: Aussproßende 45Mm nach 8 Tagen. Beispiel aussproßender USSC aus einer 45Mm nach 8 Tagen auf einem Glasobjektträger (*Chamber-Slides*) mit dem Kulturmedium DMEM. Der Mittelwert der Aussprossdistanzen betrug zu diesem Zeitpunkt $4,56 \text{ mm} \pm 1,85 \text{ mm}$ vom Mikromassen-Ursprung. Die Färbung erfolgte mit dem fluoreszierenden Kernfarbstoff DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol). Die Messung erfolgte bei 40-facher Vergrößerung.

3.1.2 Aussprossdistanz der USSC aus 90Mm

Die USSC der 90Mm wiesen ein ähnliches Aussprossverhalten auf wie aussprossende Zellen der 45Mm (siehe Abbildung 11). Am Tag der ersten Messung (Tag 5) wurde ein Mittelwert der Aussprossdistanzen von $3,91\text{mm} \pm 0,81\text{mm}$ (SD) ermittelt. Wie in Abbildung 10 erkennbar, fiel ebenfalls eine zeitabhängige lineare Zunahme der Aussprossdistanz bei $R^2 = 0,96$ auf. Schließlich konnte an Tag 16 ein Mittelwert der Aussprossdistanzen von $8,97\text{mm} \pm 1,59\text{mm}$ dokumentiert werden.

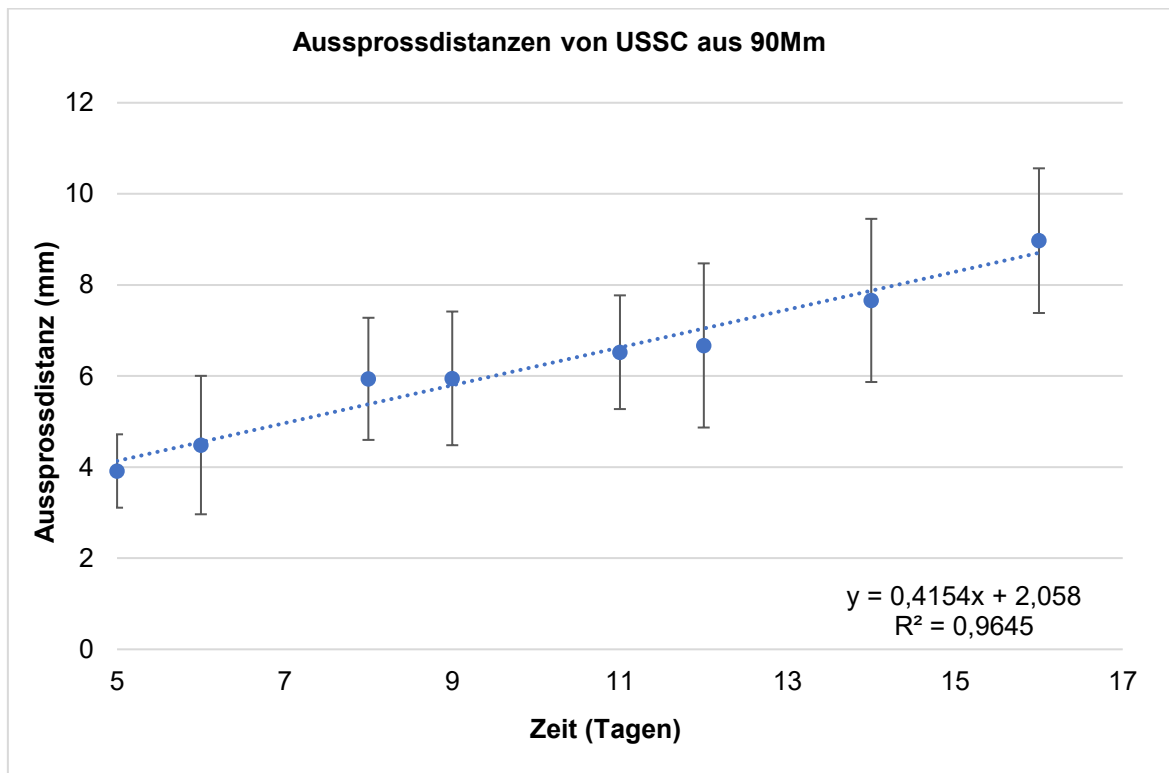


Abb.10: Aussprossdistanzen von USSC aus 90Mm. Der Mittelwert der Aussprossdistanz (mm) wurde in einem Zeitraum von 5 bis 16 Tagen gemessen. Die Kultivierung erfolgte mit dem Kulturmedium DMEM auf Glasobjektträger (*Chamber-Slides*). Es zeigt sich im Rahmen der Standardabweichungen eine lineare zeitabhängige Aussprossdistanz. Am Endpunkt (16 Tagen) konnte ein Mittelwert der Aussprossdistanzen von $8,97\text{mm} \pm 1,59\text{mm}$ (SD) vom Mikromassen-Ursprung gemessen werden.

Zeitabhängige Mittelwerte der Aussprossdistanzen von USSC aus 45Mm								
Tag	5	6	8	9	11	12	14	16
MW (mm)	3,91	4,48	5,94	5,95	6,52	6,67	7,66	8,97
STABW	0,81	1,52	1,34	1,47	1,25	1,80	1,79	1,59

Tabelle 15.: Zeitabhängige Mittelwerte der Aussprossdistanzen von USSC aus 45Mm. Die Mittelwerte der Aussprossdistanzen (mm) der USSC aus 90Mm über einem Zeitraum von 5 bis 16 Tagen auf Glasobjektträger (*Chamber-Slides*) mit dem Kulturmedium DMEM. Es wurden der Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (STABW) für den jeweiligen Tag berechnet.

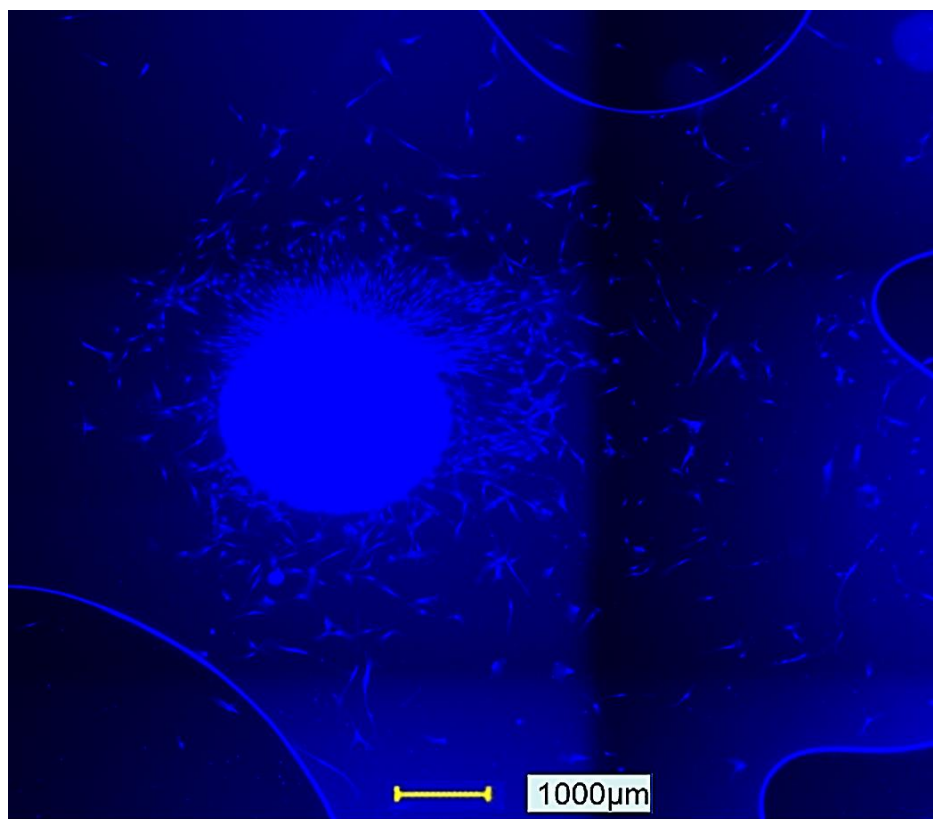


Abb. 11.: Aussprossende 90Mm nach 5 Tagen. Beispiel einer aussprossenden 90Mm nach 5 Tagen auf Glasobjektträgern (*Chamber-Slides*) mit dem Kulturmedium DMEM. Das Präparat wurde anschließend mit der fluoreszierenden Kernfärbung DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) behandelt. Zu diesem Zeitpunkt konnte ein Mittelwert der Aussprossdistanzen von $3,91\text{mm} \pm 0,81\text{mm}$ gemessen werden. Die Messung erfolgte bei 80-facher Vergrößerung.

3.1.3 Vergleich der Aussprossdistanzen

Während der 5 bis 16 Tage wurden stets weitere Aussprossdistanzen bei USSC der 90Mm im Vergleich zu der 45Mm gemessen (siehe Abbildung 12). Nach Anwendung des *student's t-test* bei zweiseitiger Hypothese und einem konstanten Signifikanzniveau von $\alpha < 0,05$ ergab sich ein signifikanter Unterschied an den Tagen 8, 9 und 12. Die Enddistanz erwies sich als nicht signifikant zwischen den Versuchsgruppen

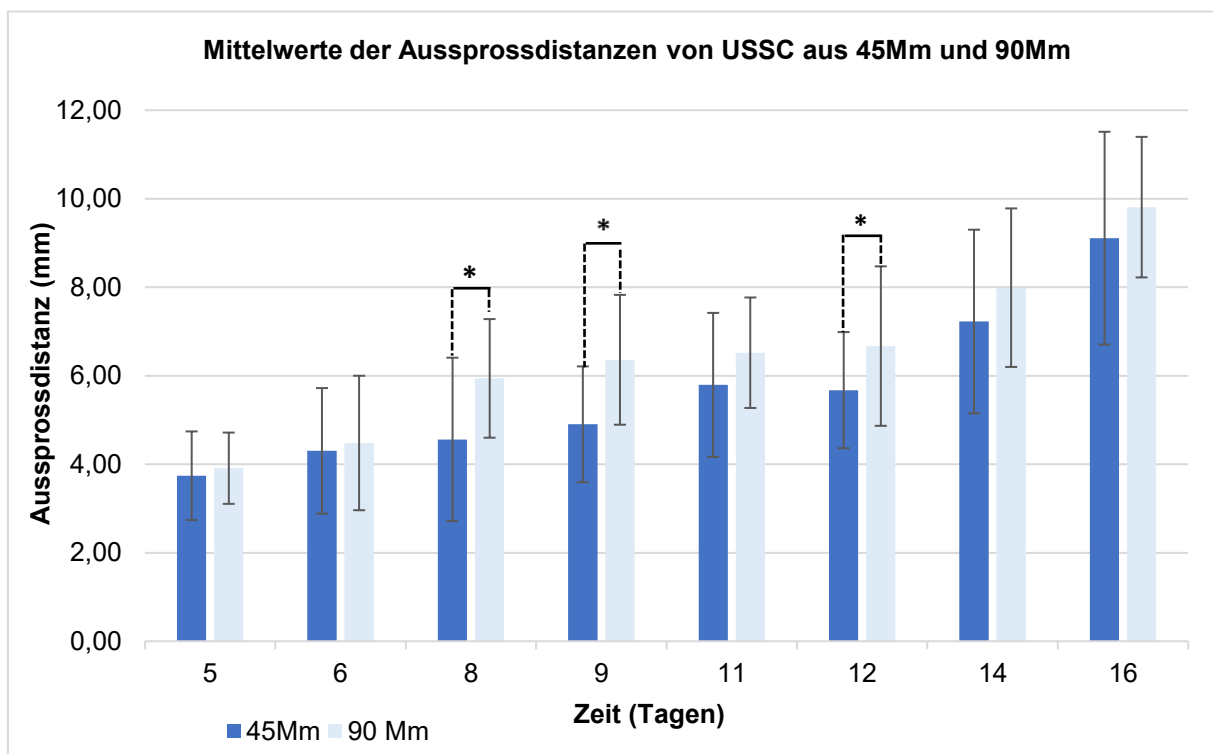


Abb. 12.: Mittelwerte der Aussprossdistanzen von USSC aus 45Mm und 90Mm. Der Vergleich der Mittelwerte von Aussprossdistanzen (mm) der 45Mm und 90Mm. Über 5 bis 16 Tagen erfolgte eine Kultivierung aus Glasobjektträgern (*Chamber-Slides*) mit DMEM. Nach statistischer Auswertung mit dem *student's t-test* zeigte sich bei zweiseitiger Hypothese und einem Signifikanzniveau von $\alpha < 0,05$, ein signifikanter Unterschied der Aussprossdistanzen an Tag 8,9 und 12, gekennzeichnet durch (*). Mm = Mikromassen.

Zeitabhängige Mittelwerte der Aussprossdistanzen von USSC aus 45Mm und 90Mm								
Tag	5	6	8	9	11	12	14	16
45Mm MW (mm)	3,74	4,30	4,56	4,90	5,79	5,67	7,23	7,74
90Mm MW (mm)	3,91	4,48	5,94	5,95	6,52	6,67	7,66	8,97
MW-Differenz	0,17	0,18	1,38	1,05	0,73	1,0	0,43	1,23
t-Wert bei zwei-seitigem t-test	1,99	1,99	2,01	2,00	2,00	2,00	1,99	2,00

Tabelle 16.: Zeitabhängige Mittelwerte der Aussprossdistanzen von USSC aus 45Mm und 90Mm. Es wurden die Mittelwerte (MW) der Aussprossdistanzen (mm) von USSC aus 45Mm und 90Mm über einen Zeitraum von 5 bis 16 Tagen gemessen. Die Präparate wurden mit dem Kulturmedium DMEM auf Glasobjektträger (*Chamber Slides*) kultiviert. Die statistische Auswertung mit dem *student's t-test* bei zweiseitiger Hypothese und einem konstanten Signifikanzniveau von $\alpha < 0,05$. Mm= Mikromassen.

3.2 Proliferation ausgesprossener USSC

3.2.1 Proliferative Aktivität mit DMEM

Die Analyse der absoluten Zellzahl bestätigt eine bestehende proliferative Aktivität der USSC aus beiden Mikromassengrößen nach 11-tägiger Kultur mit dem Kulturmedium DMEM (siehe Abbildung 13). Der stärkste Zellzuwachs konnte bei den ML-USSC mit 97.827 zusätzlichen Zellen pro Well (1,9 cm²) dokumentiert werden. Im Vergleich dazu zeichnete sich eine statistisch signifikant geringere Proliferation bei den ausgesprossenen USSC beider Mikromassengrößen ab. Unter den ausgesprossenen USSC konnte bei der 45Mm die höchste mittlere Zuwachsrate mit 51.129 zusätzlichen Zellen pro Well (1,9 cm²) ermittelt werden.

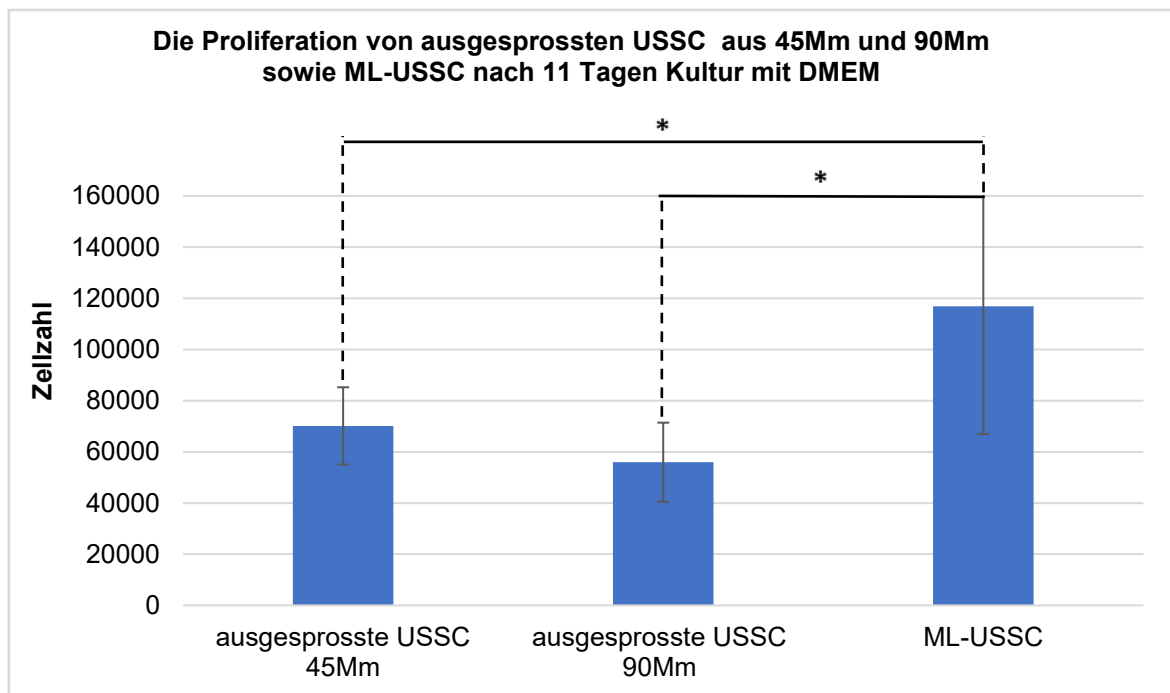


Abb. 13.: Die Proliferation von ausgesprossenen USSC aus 45Mm und 90Mm sowie ML-USSC nach 11 Tagen Kultur mit DMEM. Es wurde die absolute Zellzahl pro Well (1,9 cm²) nach 11 Tagen Kultur mit DMEM ermittelt. Es wurden ausgesprossene USSC aus 45Mm und 90Mm sowie ML-USSC als Kontrollgruppe untersucht. Insgesamt wurden n = 12 Versuche durchgeführt. Die statistische Auswertung mit dem *student's t-test* erfolgte bei zweiseitiger Hypothese und einem Signifikanzniveau von $\alpha < 0,05$. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied der absoluten Zellzahl von ML-USSC zu ausgesprossenen USSC beider Mikromassengrößen gekennzeichnet durch (*). ML-USSC = Monolayerkultivierte USSC, Mm = Mikromassen.

Statistische Auswertung des Zuwachses der Zellzahl mit DMEM			
	ausgespr. USSC aus 45Mm	ausgespr. USSC aus 90Mm	ML-USSC
Zellzahl/Well (MW)	70.129	55.926	11.6827
Zuwachs der Zellzahl	+51.129	+36.926	+97.827
STABW	15.089	15.471	49.883
t-Wert bei zweiseitigem t-test	1,99	1,99	

Tabelle 17.: Statistische Auswertung des Zuwachses der Zellzahl mit DMEM. Es wurden die Mittelwerte der absoluten Zellzahl pro Well (1,9 cm²) nach 11 Tagen Kultur mit DMEM anhand eines Proliferationsassays gemessen. Untersucht wurden ausgesproste USSC aus 45Mm und 90Mm sowie ML-USSC als Kontrollgruppe. Es wurden n = 12 Versuche durchgeführt. Die statistische Auswertung mit dem *student's t-test* erfolgte bei zweiseitiger Hypothese und einem Signifikanzniveau von $\alpha < 0,05$. MW= Mittelwert, STABW= Standardabweichung, ausgespr. USSC = ausgesproste USSC, ML-USSC= Monolayerkultivierte USSC, Mm = Mikromassen. DMEM = Kulturmedium.

3.2.2 Proliferative Aktivität mit DAG

Auch unter Stimulation mit DAG (Dexamethason, Ascorbinsäure, Beta-Glyzerolphosphat) zeigte sich nach 11-tägiger Kulturdauer eine weiterhin bestehende Fähigkeit zur Proliferation in allen Versuchsgruppen (siehe Abbildung 14). DAG stimuliert die Mineralisierung der extrazellulären Matrix. Es zeichnete sich bei den ML-USSC der höchste mittlere Zuwachs von 68.778 zusätzlichen Zellen pro Well ab. Verglichen mit dem Zellzuwachs ausgesprossener USSC beider Mikromassengrößen bestand ein signifikanter Unterschied bei einem Signifikanzniveau von $\alpha < 0,05$.

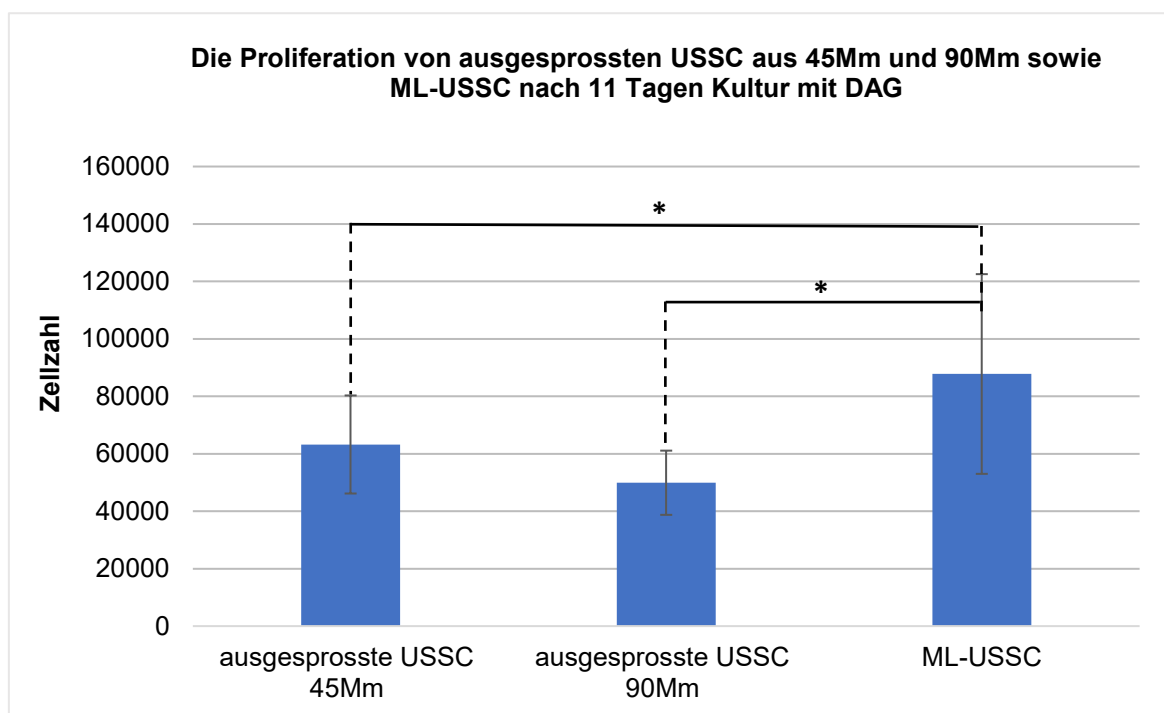


Abb. 14.: Die Proliferation von ausgesprossenen USSC aus 45Mm und 90Mm sowie ML-USSC nach 11 Tagen Kultur mit DAG. Es wurden die Mittelwerte der absoluten Zellzahl pro Well (1,9 cm²) nach 11 Tagen Kultur mit DAG (Dexamethason, Ascorbinsäure, Beta-Glyzerolphosphat) gemessen. DAG regt die Mineralisierung der extrazellulären Zellmatrix von USSC an. Die untersuchten Gruppen stellten sich aus ausgesprossenen USSC aus 45Mm und 90Mm sowie ML-USSC als Kontrollgruppe zusammen. Es wurden n = 12 Versuche durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem *student's t-test* erfolgte bei zweiseitiger Hypothese und einem Signifikanzniveau von $\alpha < 0,05$. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen ausgesprossenen USSC beider Mikromassengrößen und den ML-USSC, gekennzeichnet mit (*). ML-USSC = Monolayerkultivierte USSC, Mm= Mikromassen.

Statistische Auswertung des Zuwachses der Zellzahl mit DAG			
DAG	ausgespr.USSC aus 45Mm	ausgespr.USSC aus 90Mm	ML-USSC
Zellzahl/Well (MW)	63.231	49.914	87.776
Zuwachs der Zellzahl	+ 44.231	+ 30.914	+ 68.776
STABW	17.063	11.178	34.762
t-Wert bei zweiseitigem t-test	1,99	1,99	

Tabelle 18.: Gemessen wurde der Mittelwert der absoluten Zellzahl pro Well (1,9 cm²) nach 11 Tagen Kultur mit DAG (Dexamethason, Ascorbinsäure, Beta-Glyzerolphosphat). DAG ist ein osteoblastäres Differenzierungsmedium. Es wurden ausgesprossene USSC von 45Mm und 90Mm sowie ML-USSC als Kontrollgruppe untersucht. Es wurden n = 12 Versuche durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem *student's t-test* bei zweiseitiger Hypothese und einem Signifikanzniveau von $\alpha < 0,05$. MW = Mittelwert, STABW = Standardabweichung, ausgespr. USSC = ausgesprossene USSC, ML-USSC= Monolayerkultivierte USSC, Mm= Mikromassen.

3.2.3 Vergleich der Proliferation unter DMEM oder DAG

Um den Einfluss des osteoblastären Differenzierungsmediums auf die Zell-Proliferation zu vergleichen, wurden die jeweiligen Versuchsgruppen nach 11-tägiger Kultur mit DMEM oder DAG (osteoblastären Differenzierungsmedium) gegenübergestellt. Wie in Abbildung 15 ersichtlich, konnte in allen Versuchsgruppen eine deutlich reduzierte Proliferation in der DAG-Kultur nachgewiesen werden. Dabei kam es bei den ML-USSC mit 29.051 Zellen pro Well zum statistisch signifikant schwächsten Zellzuwachs unter DAG ($\alpha < 0,05$).

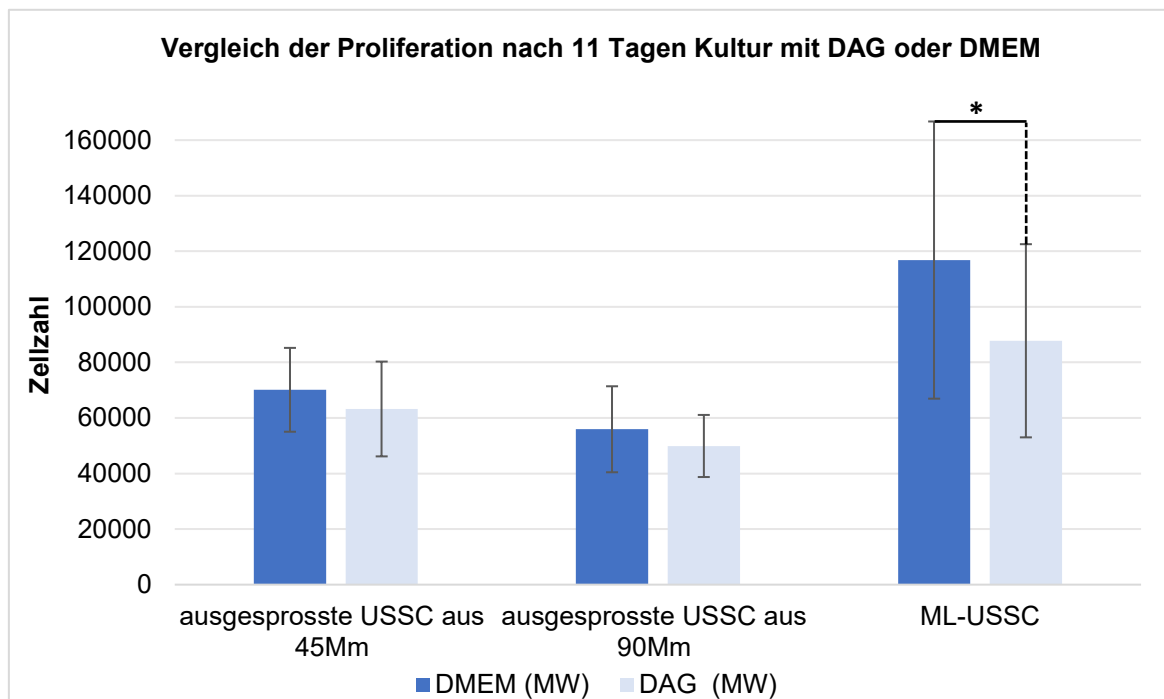


Abb.15.: Vergleich der Proliferation nach 11 Tagen Kultur mit DAG oder DMEM.

Gegenübergestellt wurden die Mittelwerte der absoluten Zellzahl pro Well (1,9 cm²) nach 11-tägiger Kultur mit osteoblastären Differenzierungsmedium (DAG) oder dem Kulturmedium (DMEM). Die Versuchsgruppen stellten sich aus ausgesprossenen USSC von 45Mm und 90Mm sowie ML-USSC zusammen. Es wurden n = 12 Versuche durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem *student's t-test* bei zweiseitiger Hypothese und einem konstanten Signifikanzniveau von $\alpha < 0,05$. Nur bei den ML-USSC konnte signifikanter Unterschied eruiert werden, gekennzeichnet durch (*). MW = Mittelwert, ML-USSC = Monolayerkultivierte USSC, Mm= Mikromassen.

Statistische Auswertung des Zuwachses der Zellzahl mit DMEM oder DAG			
	ausgespr. USSC aus 45Mm	ausgespr. USSC aus 90Mm	ML-USSC
Zellzahl/ Well (MW) DMEM	70.129	55.926	116.827
Zellzahl/ Well (MW) DAG	63.231	49.914	87.776
MW-Differenz	6.898	6.012	29.051
kritischer t-Wert bei zweiseitigem t-test	1,99	1,99	1,99

Tabelle 19.: Statistische Auswertung des Zuwachses der Zellzahl mit DMEM oder DAG. Gemessen wurde die Zellzahl pro Well (= 1,9 cm²) nach 11 Tagen Kultur mit osteoblastären Differenzierungsmedium (DAG) oder dem Kulturmedium (DMEM). Es wurden die Mittelwerte (MW) der Zellzahl pro Well ermittelt. Untersucht wurden ausgesprossene USSC aus Mikromassen der Größe 45Mm (ausgespr. USSC aus 45Mm), 90Mm (ausgespr. USSC aus 90Mm) sowie monolayerkultivierte USSC (ML-USSC) als Kontrollgruppe. Es wurden n = 12 Versuche durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem *student's t-test* bei zweiseitiger Hypothese und einem Signifikanzniveau von $\alpha < 0,05$. MW= Mittelwert, MW-Differenz = Mittelwert-Differenz, ML-USSC = Monolayerkultivierte USSC, Mm= Mikromassen.

3.3 Mineralisationsverhalten

Das fluoreszierende Agens im Mineralisationsassay (OsteoImage™, Fa. Lonza) wird durch die hochaffine Bindung an Hydroxylapatit-Kristalle zur Messung der Mineralisierung der extrazellulären Matrix von osteoblastär differenzierten USSC herangezogen. Mit dem Fluorometer (GENios, Fa. Tecan) wurde die Fluoreszenz der so markierten Hydroxylapatit-Kristalle gemessen. Der Mineralisierungsgehalt gibt Aufschluss über das osteoblastäre Differenzierungspotenzial der USSC vor und nach Aussprossen aus der Mikromasse. Dafür wurden ausgesprossene USSC aus Mikromassen der Größen 45Mm und 90Mm mit monolayerkultivierten USSC als Kontrollgruppe verglichen. Alle Versuchsgruppen wurden für 11 Tage jeweils mit Kulturmedium DMEM oder dem osteoblastären Differenzierungsmedium DAG kultiviert. Initial wurden 19.000 Zellen pro Well (10.000 Zellen pro cm²) ausgesät.

3.3.1 Die Mineralisation mit DMEM

Nach 11-tägiger Kultur mit DMEM konnte sowohl bei ausgesprossenen USSC aller Mikromassengrößen als auch in der Kontrollgruppe ML-USSC, eine spontane Bildung von Hydroxylapatit-Kristallen in der Zell-Matrix gemessen werden. Die höchsten Fluoreszenzwerte entsprechend dem höchsten Mineralisierungsgehalt der Matrix wurden bei ausgesprossenen USSC aus Mikromassen der Größe 45Mm gemessen (siehe Abbildung 16). Nach statistischer Auswertung mit dem *student's t-test* bei zweiseitiger Hypothese und konstantem Signifikanzniveau von $\alpha < 0,05$, erwiesen sich diese Ergebnisse als statistisch signifikant zur Monolayer-Kontrollgruppe.

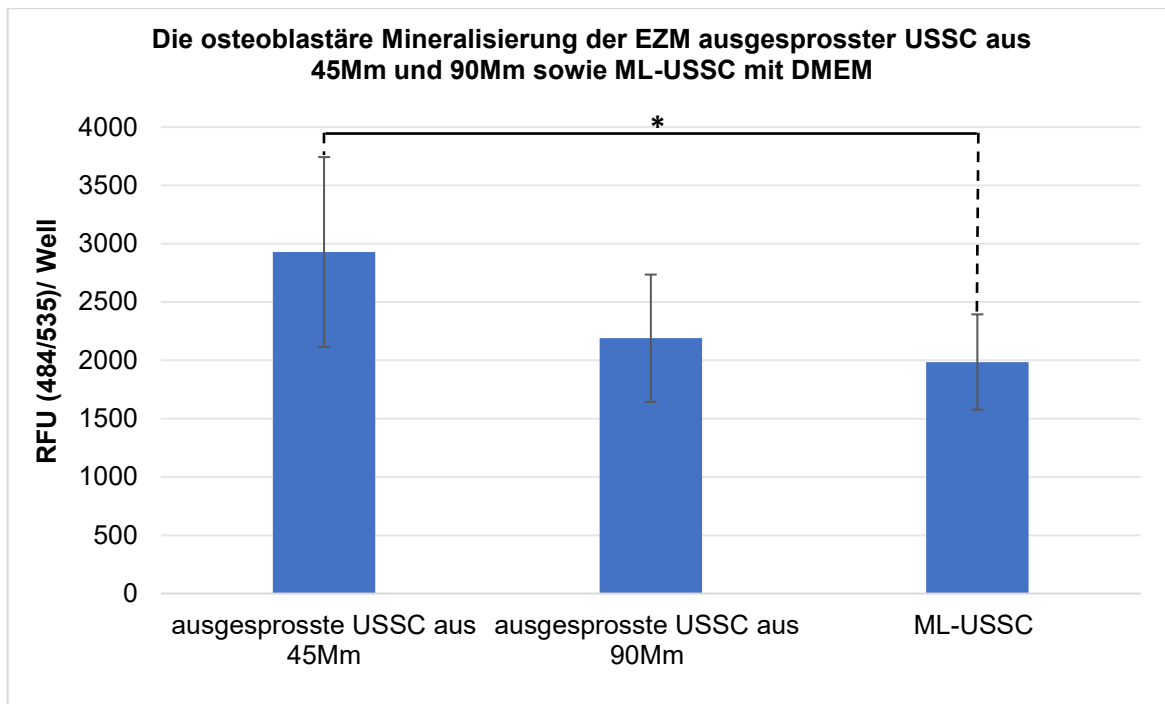


Abb.16.: Die osteoblastäre Mineralisierung der EZM ausgesprossener USSC aus 45Mm und 90Mm sowie ML-USSC mit DMEM. Gemessen wurde die Fluoreszenz von gebundenen Hydroxylapatit-Kristallen (RFU pro Well) nach 11 Tagen Kultur mit DMEM (Kulturmedium). Es wurden ausgesprossene USSC aus 45Mm und 90Mm sowie ML-USSC als Kontrollgruppe untersucht. Es wurden n = 12 Versuche durchgeführt. Ausgesprossene USSC der 45Mm zeigten eine signifikant stärkere Mineralisierung der EZM als die ML-USSC, gekennzeichnet durch (*). Zur statistischen Auswertung wurde der *student's t-test* bei zweiseitiger Hypothese und einem Signifikanzniveau von $\alpha < 0,05$ verwendet. ML-USSC = Monolayerkultivierte USSC, Mm= Mikromassen.

Statistische Auswertung der Mineralisierung mit DMEM			
Mineralisierung mit DMEM	ausgespr. USSC aus 45Mm	ausgespr. USSC aus 90Mm	ML-USSC
MW in RFU (484/535) /Well	2930	2189	1986
STABW	814	546	409
kritischer t-Wert bei zweiseitigem t-test	1,99	1,99	

Tabelle 20.: Statistische Auswertung der Mineralisierung mit DMEM. Gemessen wurde die Fluoreszenz von gebundenen Hydroxylapatit-Kristallen (RFU pro Well) nach 11 Tagen Kultur mit DMEM. Es wurden ausgesprossene USSC aus 45Mm und 90Mm sowie ML-USSC als Kontrollgruppe untersucht. Es wurden n = 12 Versuche durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem *student's t-test* bei zweiseitiger Hypothese und einem Signifikanzniveau von $\alpha < 0,05$. MW = Mittelwert, STABW = Standardabweichung, ausgespr. USSC = ausgesprossene USSC, ML-USSC= Monolayerkultivierte USSC, Mm= Mikromassen. DMEM= Kulturmedium.

3.3.2 Die Mineralisation mit DAG

Unter Einfluss des osteoblastären Differenzierungsmediums konnte in allen Versuchsgruppen ein hoher Mineralisationsgehalt der Zell-Matrix dokumentiert werden, wie in Abbildung 17 erkennbar. Auch mit DAG zeichnete sich bei ausgesprossenen USSC aus 45Mm eine signifikant stärkere Mineralisierung der EZM ab. Zur Auswertung wurde der *student's t-test* mit zweiseitiger Hypothese und einem Signifikanzniveau von $\alpha < 0,05$ verwendet.

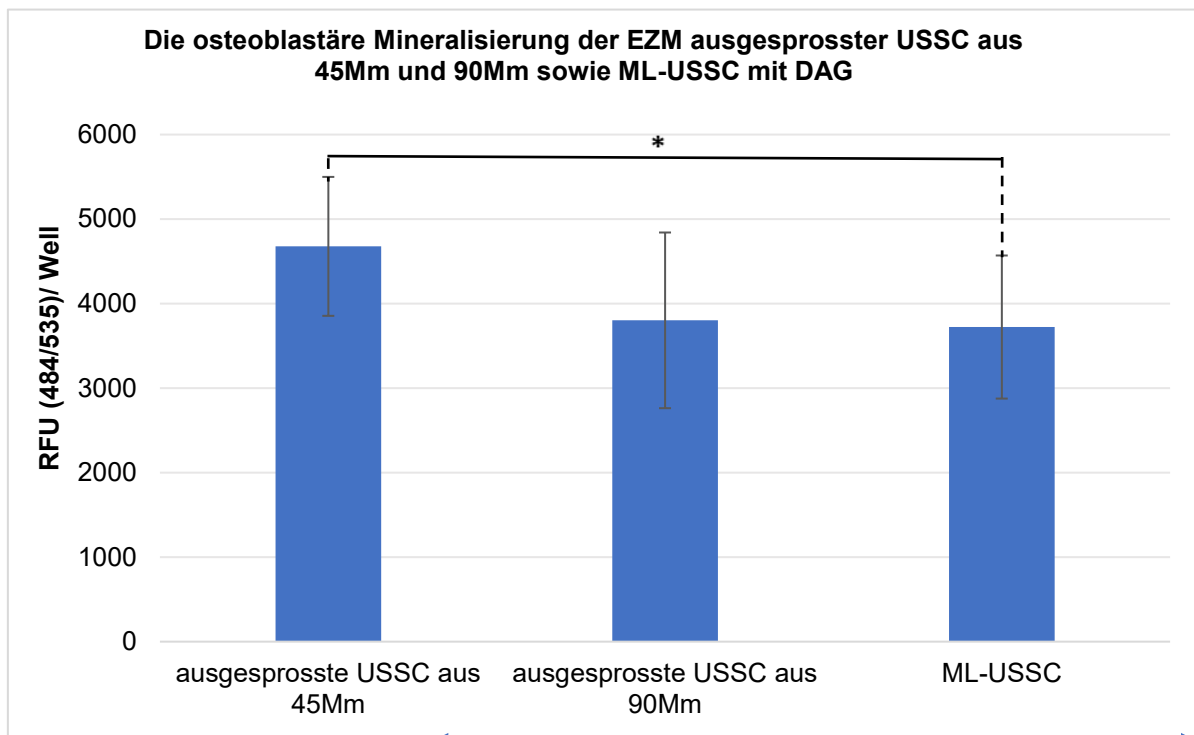


Abb.17: Die osteoblastäre Mineralisierung der EZM ausgesprossener USSC aus 45Mm und 90Mm sowie ML-USSC mit DAG. Gemessen wurde die Fluoreszenz von gebundenen Hydroxylapatit-Kristallen (RFU pro Well) nach 11 Tagen Kultur mit DAG (osteoblastäres Differenzierungsmedium). Es wurden ausgesprossene USSC aus 45Mm und 90Mm sowie ML-USSC als Kontrollgruppe untersucht. Es wurden n = 12 Versuche durchgeführt. Für ausgesprossene USSC der 45Mm ergab sich eine signifikant höhere Mineralisierung der EZM verglichen zu den ML-USSC, gekennzeichnet durch (*). Zur statistischen Auswertung wurde der *student's t-test* bei zweiseitiger Hypothese und einem Signifikanzniveau von $\alpha < 0,05$ angewendet. ML-USSC = Monolayerkultivierte USSC, Mm= Mikromassen.

Statistische Auswertung der Mineralisierung mit DAG			
Mineralisierung mit DAG	ausgespr. USSC aus 45Mm	ausgespr. USSC aus 90Mm	ML-USSC
MW in RFU (484/535) /Well	4677	3802	3722
STABW	822	1039	847
kritischer t-Wert bei zweiseitigem t-test	1,99	1,99	

Tabelle 21.: Statistische Auswertung der Mineralisierung mit DAG. Gemessen wurde die Fluoreszenz von gebundenen Hydroxylapatit-Kristallen (RFU pro Well) nach 11 Tagen Kultur mit DAG (Dexamethason, Ascorbinsäure, Beta-Glycerolphosphat). Es wurden ausgesprossste USSC aus 45Mm und 90Mm sowie ML-USSC als Kontrollgruppe untersucht. Es wurden n = 12 Versuche durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem *student's t-Test* bei zweiseitiger Hypothese und einem Signifikanzniveau von $\alpha < 0,05$. MW = Mittelwert, STABW = Standardabweichung, ausgespr. USSC = ausgesprossste USSC, ML-USSC= Monolayerkultivierte USSC, Mm = Mikromassen.

3.3.3 Vergleich der Mineralisierung mit DMEM oder DAG

Zur Gegenüberstellung des Effekts von osteoblastärem Differenzierungsmedium auf die Mineralisierung der EZM der jeweiligen Versuchsgruppen erfolgte eine 11-tägige Kultur mit DAG (Dexamethason, Ascorbinsäure, Beta-Glyzerolphosphat) oder DMEM als Kontrollgruppe.

Hierbei zeigte sich, bei einem Signifikanzniveau von $\alpha < 0,05$, eine signifikante Zunahme des Hydroxylapatit-Gehalts in allen Versuchsgruppen nach Kultivierung mit DAG (siehe Abbildung 18).

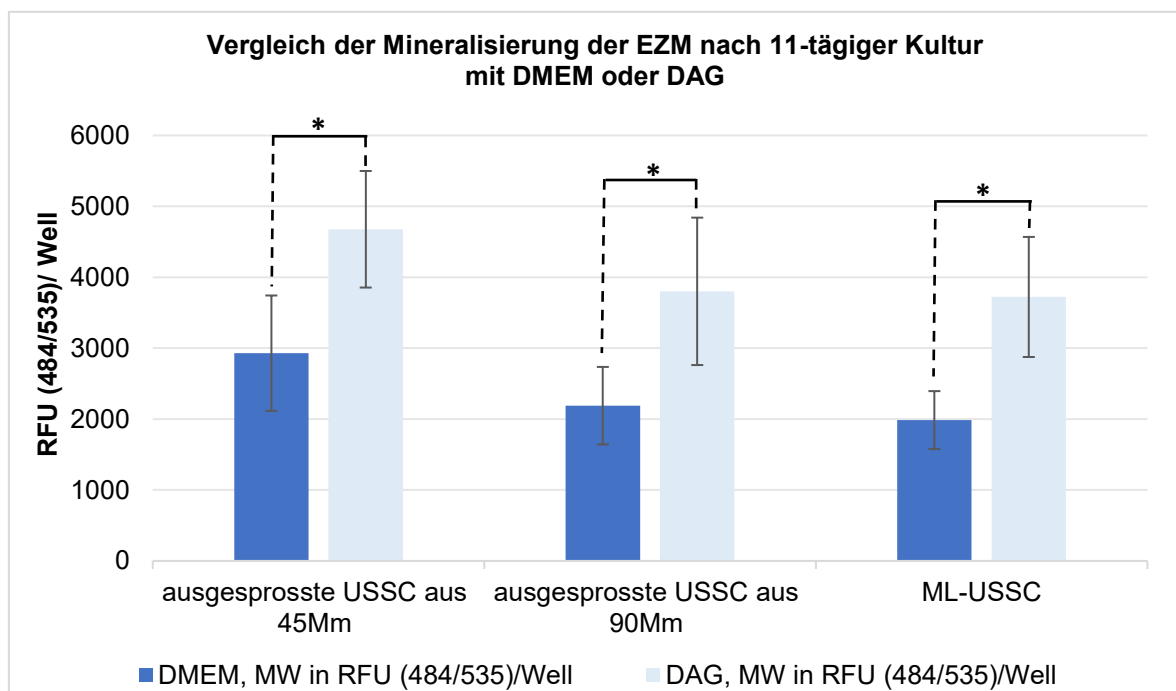


Abb. 18.: Vergleich der Mineralisierung der EZM nach 11-tägiger Kultur mit DMEM oder DAG.

Es wurden die Mittelwerte (MW) der Fluoreszenz von gebundenen Hydroxylapatit-Kristallen (RFU pro Well) nach 11 Tagen Kultur mit dem osteoblastären Differenzierungsmedium DAG (Dexamethason, Ascorbinsäure, Beta-Glyzerolphosphat). Es wurden ausgesprossene USSC aus 45Mm und 90Mm sowie ML-USSC als Kontrollgruppe untersucht. Insgesamt wurden $n = 12$ Versuche durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem *student's t-test* bei zweiseitiger Hypothese und einem Signifikanzniveau von $\alpha < 0,05$. Hier fiel ein signifikant höherer Mineralisierungsgehalt der EZM aller Versuchsgruppen nach 11-tägiger Kultur mit DAG auf. ML-USSC= Monolayerkultivierte USSC, Mm= Mikromassen, DMEM= Kulturmedium.

Statistische Auswertung der Mineralisierung mit DMEM oder DAG			
	ausgespr. USSC aus 45Mm	ausgespr. USSC aus 90Mm	ML- USSC
DMEM, MW in RFU (484/535) /Well	2930	2189	1986
DAG, MW in RFU (484/535) /Well	4677	3802	3722
MW-Differenz in RFU (484/535) /Well	1747	1612	1737
Kritischer t-Wert bei zweiseitigem t-test	1,99	1,99	

Tabelle 22.: Statistische Auswertung der Mineralisierung mit DMEM oder DAG. Gemessen wurde die Mittelwerte (MW) der Fluoreszenz von gebundenen Hydroxylapatit-Kristallen (RFU pro Well) nach 11 Tagen Kultur mit dem osteoblastären Differenzierungsmedium DAG (Dexamethason, Ascorbinsäure, Beta-Glyzerolphosphat). Es wurden ausgesprossste USSC aus 45Mm und 90Mm sowie ML-USSC als Kontrollgruppe untersucht. Insgesamt wurden n = 12 Versuche durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem *student's t-test* bei zweiseitiger Hypothese und einem Signifikanzniveau von $\alpha < 0,05$. MW = Mittelwert, MW-Differenz= Mittelwert-Differenz, DMEM= Kulturmedium, ML-USSC = Monolayerkultivierte USSC, Mm= Mikromassen.

3.4 Die relative Mineralisierung

Wie in den vorangegangenen Versuchen dargelegt, konnten nach einer Kultivierung von 11 Tagen Anzeichen einer mineralisierten EZM bei den jeweiligen Versuchsgruppen nachgewiesen werden. Neben der Mineralisierung der EZM kam es während dieser Kulturzeit jedoch gleichzeitig zum Zellzuwachs, wie anhand des CyQuant®-Proliferationsassays veranschaulicht wird. Zur Vermeidung einer Verzerrung der Fluoreszenzwerte angesichts höherer Zellzahlen, wurden die Mittelwerte der Fluoreszenzstärke (RFU 484/535) durch die Zellzahl der jeweiligen Versuchsgruppe geteilt. Dadurch konnte die relative Mineralisierung der EZM pro Zelle bzw. 10^2 Zellen ermittelt werden. Hier zeichnete sich vor allem bei den ausgesprosten USSC beider Mikromassengrößen eine deutlich höhere Mineralisierung pro 10^2 Zellen ab (siehe Abbildung 19). Die ML-USSC bildeten mit und ohne Zusatz des osteoblastären Differenzierungsmedium DAG einen geringen Hydroxylapatit Anteil pro 10^2 Zellen aus.

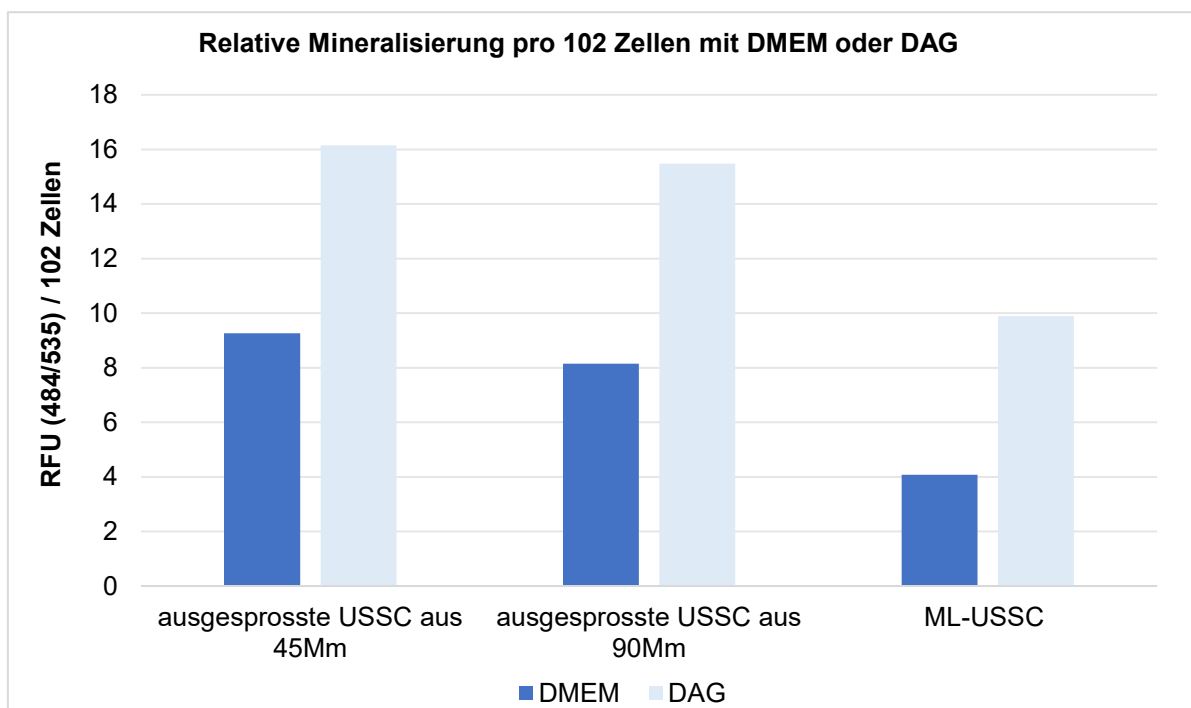


Abb.19.: Relative Mineralisierung pro 10^2 Zellen mit DMEM oder DAG. Gemessen wurde die Fluoreszenz von gebundenen Hydroxylapatit-Kristallen (RFU pro 10^2 Zellen) nach 11 Tagen Kultur mit osteoblastären Differenzierungsmedium DAG (Dexamethason, Ascorbinsäure, Beta-Glycerolphosphat) oder DMEM (Kulturmedium). Es wurden ausgesproste USSC aus 45Mm und 90Mm sowie ML-USSC als Kontrollgruppe untersucht. Insgesamt wurden $n = 12$ Versuche durchgeführt. Es zeigte sich eine gesteigerte Mineralisierung der Zell-Matrix insbesondere in ausgesprosten USSC. ML-USSC = Monolayerkultivierte USSC, Mm= Mikromassen.

Die relative Mineralisierung pro 10 ² Zellen mit DMEM oder DAG			
	ausgespr. USSC aus 45Mm	ausgespr. USSC aus 90Mm	ML-USSC
DMEM	4,18	3,91	1,70
DAG	7,40	7,62	4,24

Tabelle 23.: Die relative Mineralisierung pro 10² Zellen mit DMEM oder DAG. Gemessen wurde die relative Mineralisierung der Fluoreszenz von gebundenen Hydroxylapatit-Kristallen (RFU pro 10² Zellen) nach 11 Tagen Kultur mit osteoblastären Differenzierungsmedium DAG (Dexamethason, Ascorbinsäure, Beta-Glyzerolphosphat) oder DMEM (Kulturmedium). Es wurden ausgesprossste USSC aus 45Mm und 90Mm sowie ML-USSC als Kontrollgruppe untersucht. Insgesamt wurden n = 12 Versuche durchgeführt. Es zeigte sich eine gesteigerte Mineralisierung der Zell-Matrix insbesondere in ausgesprosssten USSC. Ausgespr. USSC = ausgesprossste USSC, ML-USSC = Monolayerkultivierte USSC, Mm= Mikromassen.

3.5 Translationsanalyse des Genexpressionsprofils mittels RT-PCR

Zur Untersuchung des Erhalts der Stammzellnische wurden spezifische Marker durch eine Polymerase Kettenreaktion (PCR) in ML-USSC, USSC aus 45Mm und ausgesprosssten USSC aus 45Mm und 90Mm analysiert, wobei ML-USSC als Kontrollgruppe gewählt wurde. Es wurde das Expressionsniveau von Komponenten der Stammzellnische, wie des zytoskelettalen Proteins Vinkulin, der extrazellulären MT1-MMP (Matrix-Metalloproteinasen), des Stammzellnischenmarkers Notch3 und des Hypoxie-induzierten Faktors (HIF-1) gemessen. Als Referenz-Gen wurde GAPDH (Glyzeraldehyd-3-Phosphate Dehydrogenase) gewählt.

3.5.1 Vinkulin

Das zytoskelettale Protein Vinkulin ist in der Ausbildung von fokalen Adhäsionen und *Adherens Junctions* beteiligt. In den ausgesprosten USSC beider Mikromassengrößen konnte keine Änderung des Expressionslevels von Vinkulin im Vergleich zu ML-USSC ermittelt werden. Bei USSC aus der 45Mm bestand eine 4-fache Reduktion der Vinkulin-Expression im Vergleich zu den ML-USSC, wie in Abbildung 20 verdeutlicht.

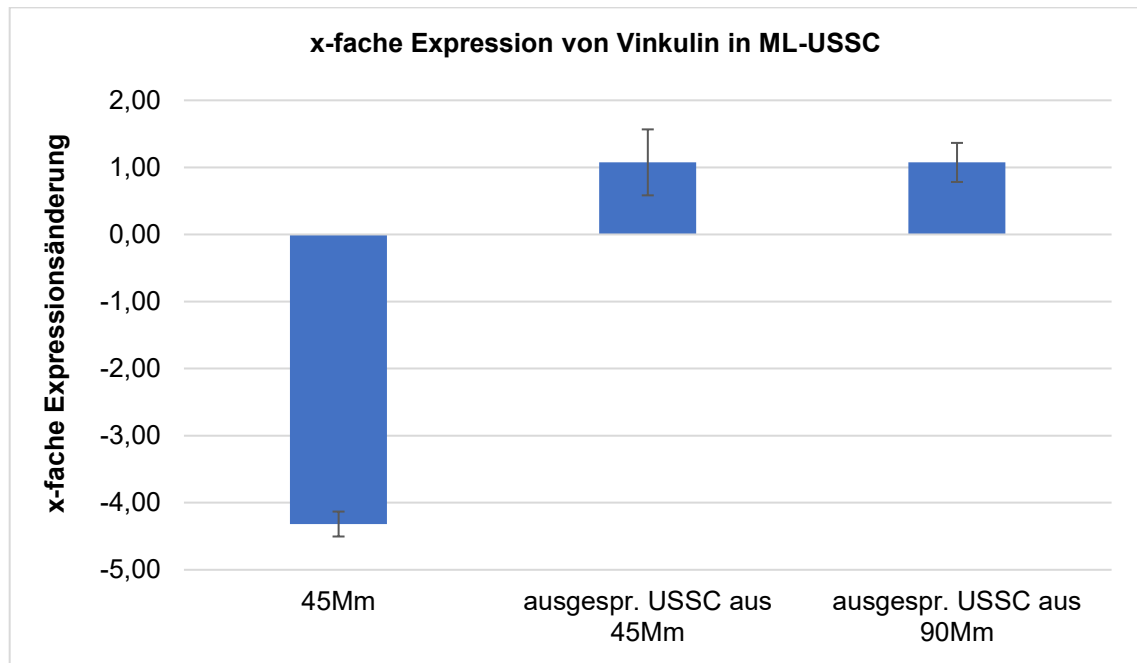


Abb. 20.: Die x-fache Expressionsänderung von Vinkulin in ML-USSC. USSC aus 45Mm, ausgesprosten USSC aus 45Mm und 90Mm wurden im Vergleich zu ML-USSC als Kontrollgruppe untersucht. Es wurden n = 3 Versuche durchgeführt. Ausgespr. USSC = ausgesproste USSC, Mm= Mikromassen.

Genexpression von Vinkulin	
	x-fache Expression der ML-USSC
45Mm	-4,32
Ausgesproste USSC aus 45Mm	1,07
Ausgesproste USSC aus 90Mm	1,07

Tabelle 24.: Genexpression von Vinkulin. Hier wurden USSC aus 45Mm, ausgesproste USSC aus 45Mm und 90Mm im Vergleich zu ML-USSC als Kontrollgruppe untersucht. Es wurden n = 3 Versuche durchgeführt. ML-USSC= Monolayerkultivierte USSC, Mm = Mikromassen.

3.5.2 MT1-MMP

Matrix-Metalloproteinasen sind extrazelluläre Peptidasen, die durch Degradierung der perizellulären Matrix zur zellulären Invasion in eine EZM benötigt werden. Im Vergleich zu ML-USSC ergab sich keine Änderung der MT1-MMP-Expression bei ausgesprosten USSC der 45Mm und 90Mm. In der 45Mm konnte eine 3-fache Reduktion der Genexpression verglichen zur Kontrollgruppe dokumentiert werden (siehe Abbildung 21).

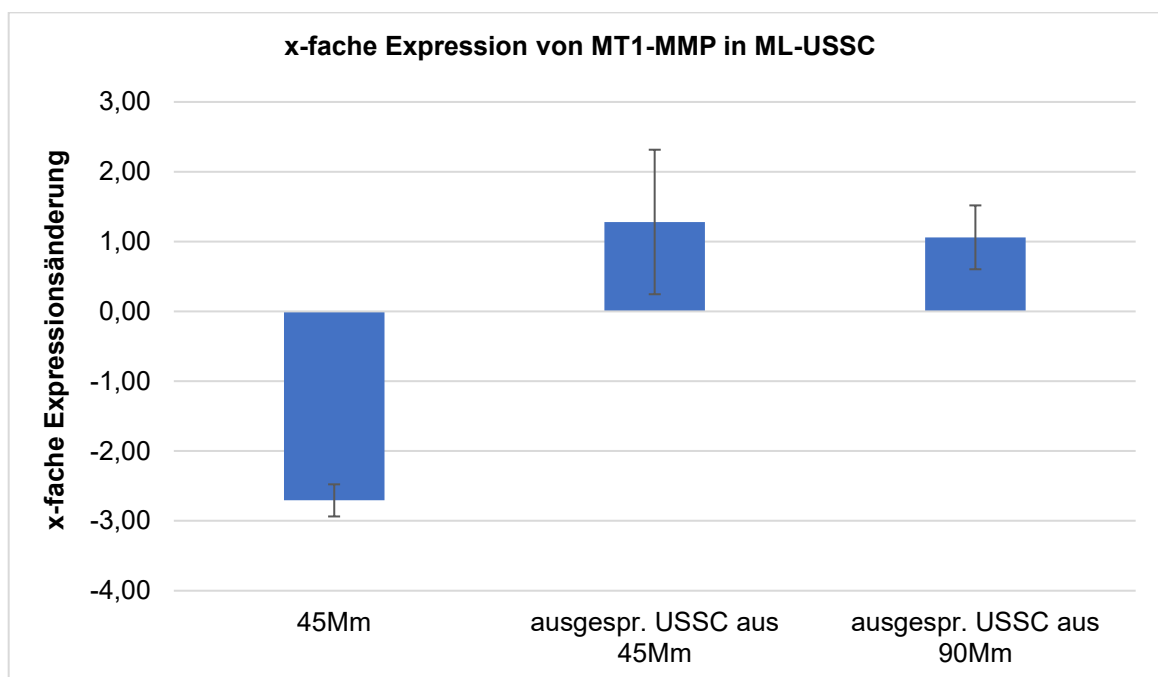


Abb. 21.: Die x-fache Expressionsänderung von MT1-MMP in ML-USSC. Hier wurden USSC aus 45Mm sowie ausgesproste USSC aus 45Mm und 90Mm im Vergleich zu ML-USSC als Kontrollgruppe untersucht. Es wurden n = 3 Versuche durchgeführt. USSC der 45Mm wiesen eine 3-fache Reduktion der MT1-MMP-Genexpression auf. Ausgespr. USSC= ausgesproste USSC, ML-USSC= Monolayerkultivierte USSC, Mm = Mikromassen.

Genexpression von MT1-MMP	
	x-fache Expression der ML-USSC
45Mm	-2,71
Ausgesprusste USSC aus 45Mm	1,28
Ausgesprusste USSC aus 90Mm	1,06

Tabelle 25.: Genexpression von MT1-MMP. USSC aus 45Mm sowie ausgesproste USSC aus 45Mm und 90Mm wurden im Vergleich zu ML-USSC als Kontrollgruppe untersucht. Es wurden n ≥ 3 Versuche durchgeführt. ML-USSC= Monolayerkultivierte USSC, Mm = Mikromassen.

3.5.3 HIF-1

Der Hypoxie-induzierte Faktor ist ein Transkriptionsfaktor und dient als Indikator zellulären Sauerstoffmangels. Die Auswertung des Genexpressionsprofils zeigt geringe Schwankungen der HIF-1 Expression (siehe Abbildung 22). Sowohl die USSC der 45Mm als auch die ausgesprosten USSC wiesen ein ähnliches Expressionslevel von HIF-1 wie ML-USSC auf.

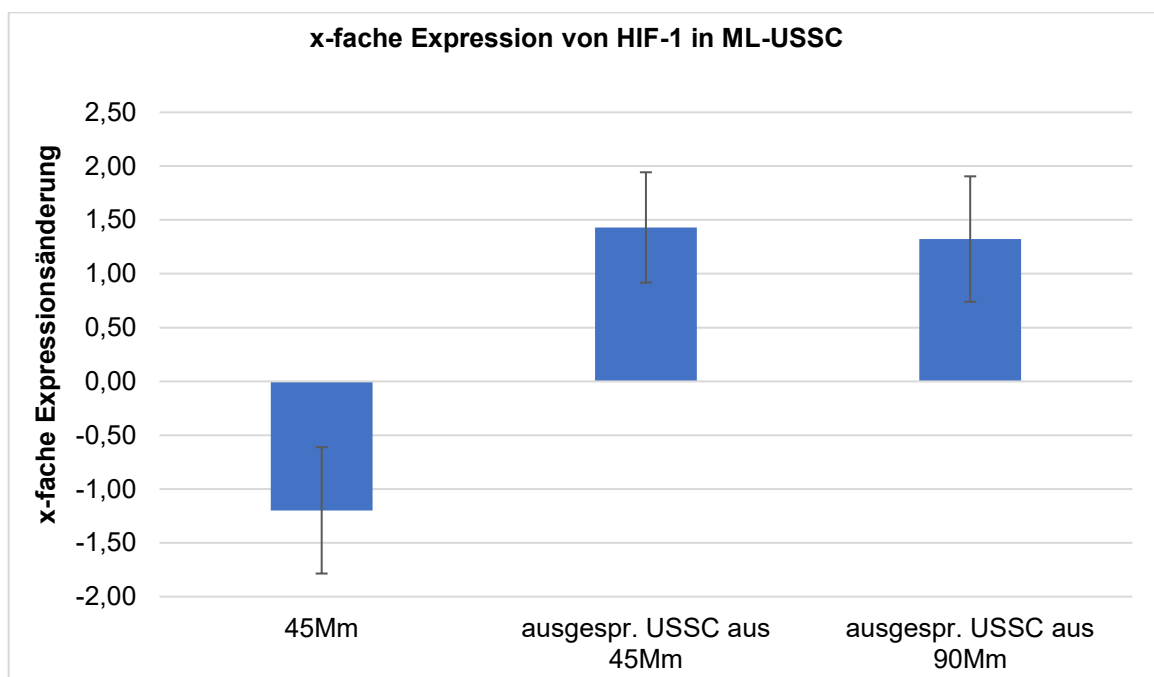


Abb.22.: Die x-fache Expressionsänderung von HIF-1 in ML-USSC. Hier wurden USSC aus 45Mm sowie ausgesproste USSC aus 45Mm und 90Mm im Vergleich zu monolayerkultivierten USSC als Kontrollgruppe untersucht. Es wurden n = 3 Versuche durchgeführt. Es bestand keine Änderung der Genexpression im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ausgespr. USSC= ausgesproste USSC, ML-USSC= Monolayerkultivierte USSC, Mm = Mikromassen.

Genexpression von HIF-1	
	x-fache Expression der ML-USSC
45Mm	-1,20
Ausgesproste USSC aus 45Mm	1,43
Ausgesproste USSC aus 90Mm	1,32

Tabelle 26.: Genexpression von HIF-1. Hier wurden USSC aus 45Mm sowie ausgesproste USSC aus 45Mm und 90Mm im Vergleich zu ML-USSC als Kontrollgruppe untersucht. Es wurden n = 3 Versuche durchgeführt. ML-USSC= Monolayerkultivierte USSC, Mm = Mikromassen.

3.5.4 Notch3

Das Expressionslevel von Notch3 soll Aufschluss über die Beibehaltung des Stammzellcharakters geben. Innerhalb der 45Mm erfuhren die Stammzellen eine dezente Hochregulation des Notch3 Gens. Die ausgesprossenen USSC wiesen ein ähnliches Expressionslevel wie die ML-USSC Zellen auf, wie in Abbildung 23 veranschaulicht.

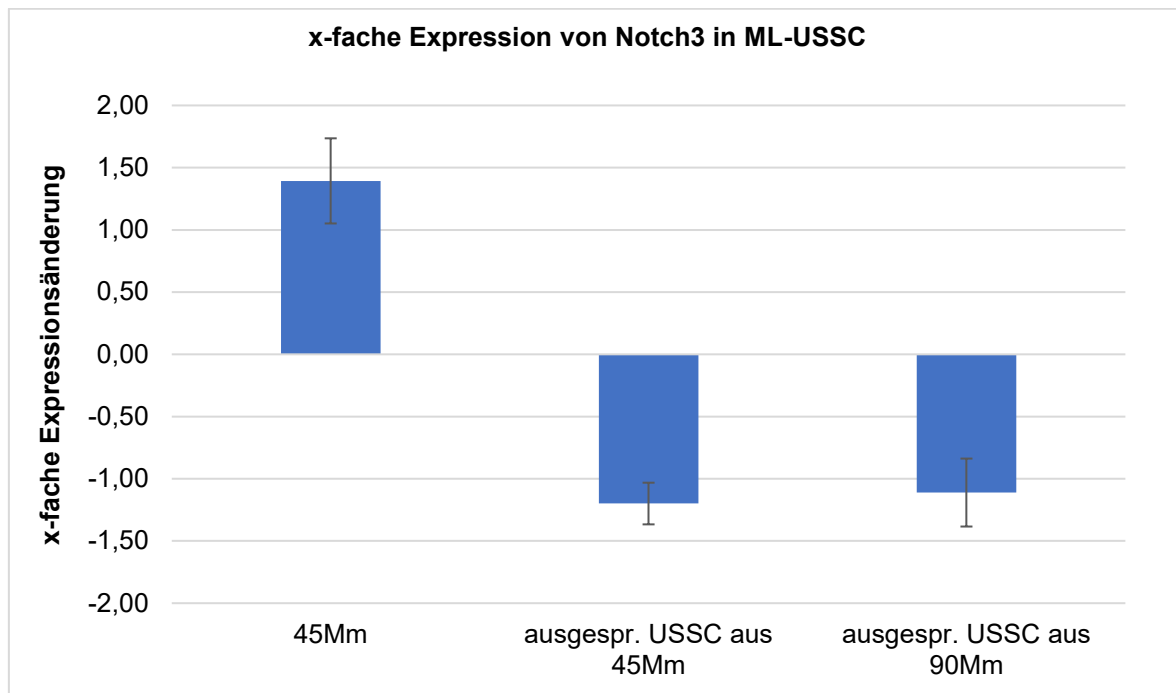


Abb. 23.: Die x-fache Expressionsänderung von Notch3. Hier wurden USSC aus 45Mm sowie ausgesprossene USSC aus 45Mm und 90Mm im Vergleich zu monolayerkultivierten USSC als Kontrollgruppe untersucht. Es wurden $n \geq 3$ Versuche durchgeführt. Es bestand keine Änderung der Genexpression im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ausgespr. USSC= ausgesprossene USSC, ML-USSC= Monolayerkultivierte USSC, Mm = Mikromassen.

Genexpression von Notch3	
	x-fache Expression der ML-USSC
45Mm	1,39
Ausgesprusste USSC aus 45Mm	-1,20
Ausgesprusste USSC aus 90Mm	-1,11

Tabelle 27.: Genexpression von Notch3. USSC aus 45 Mikromassen (45Mm), ausgesprossene USSC aus Mikromassen der Größe 45Mm und 90Mm wurden im Vergleich zu ML-USSC als Kontrollgruppe untersucht. Es wurden $n = 3$ Versuche durchgeführt. ML-USSC= Monolayerkultivierte USSC, Mm = Mikromassen.

4 Diskussion

4.1 USSC als Zellquelle für das Mikromassen-Modell

Als intrinsisch pluripotente Zellen mit hohem Selbsterneuerungspotenzial, kommt den Stammzellen eine bedeutende Rolle im *Bone Tissue Engineering* zu. Dafür häufig verwendete Zell-Linien, wie mesenchymale Stammzellen, gehen allerdings mit einer invasiven Gewinnung und einer damit assoziierten Komorbidität für den Patienten einher. Embryonale Stammzellen werden aus dem Stadium der Blastozyste gewonnen. Aufgrund ethischer Konflikte ist die Forschung an ESC durch das Stammzellgesetz (StGZ) ausschließlich über Genehmigungsverfahren streng reguliert möglich und eine Gewinnung von Stammzellen nicht gestattet. Humane Nabelschnurblutstammzellen können jedoch durch ihre besonderen Eigenschaften als Zellquelle für das *Bone-Tissue Engineering* genutzt werden. Sie werden aus dem überschüssigen Nabelschnurblut nach der Geburt ohne invasiven Eingriff gewonnen (Kogler, Sensken et al. 2004).

Im Gegensatz zu den anderen Stammzell-Linien können beim Gewinnungsprozess der USSC nur geringe Mengen an brauchbaren Zellen aus dem Nabelschnurblut gewonnen werden (Kern, Eichler et al. 2006). Dies kann allerdings aufgrund des hohen Expansionspotenzials von bis zu 10^{15} Zellen, ohne Verlust des Karyotypen und der Pluripotenz, durch eine suffiziente Zellexpansion *in vitro* kompensiert werden (Kogler, Sensken et al. 2004). Angesichts der Mikromassenherstellung und der Proliferation aussprossender Zellen ist dies von großer Bedeutung. Mesenchymale Stammzellen durchlaufen nämlich mit der Zell-Expansion einen Alterungsprozess aufgrund ihrer eingeschränkten Selbsterneuerung und Proliferationsfähigkeit (Lin, Sohn et al. 2019). Auch in dieser Arbeit, konnte sowohl bei der Zellexpansion vor der Herstellung der Mikromassen als auch nach Aussprießen aus der Mikromasse kein Verlust des von Kogler et al. beschriebenen Expansionspotenzials bis zu einer Zahl von 10^{13} festgestellt werden.

In vivo sind die HLA- und CD 45 negativen USSC als Spenderzellquelle immunologisch kompatibel und benötigen, anders als die MHC heterozygoten ESC, kein *Matching* mit dem Empfängerorganismus (Jeltsch, Radke et al. 2011). Darüber hinaus besitzen sie *in vivo* kein teratogenes oder malignes Entartungspotenzial (Kogler, Sensken et al. 2004). Dies verschafft ihnen im Vergleich zu den ESC einen herausragenden Vorteil bei *in vivo* Anwendungen.

Die *Unrestricted Somatic Stem Cell* wurde von Kogler et al. 2004 als intrinsisch pluripotente Stammzelle mit einem breitem Differenzierungspotenzial charakterisiert. Mit Hinblick auf die Überbrückung ossärer Defekte, sind vor allem das osteoblastäre und

chondrogene Differenzierungspotenzial der USSC von großem Interesse. Das osteoblastäre Differenzierungspotenzial der USSC hat sich *in vivo* und *in vitro* bestätigt. In mehreren Tiermodellen konnte eine hohe Erfolgsrate der Einheilung nach der Implantation von USSC beladenen Trägermaterialien in Knochendefekten beobachtet werden (Jager, Sager et al. 2004, Kogler, Sensken et al. 2004, Herten, Zilkens et al. 2019).

Für die Überbrückung von Knochendefekten erwies sich insbesondere das Sekretom der USSC als effektiv und vielversprechend für den Regenerationsprozess, da es nicht nur Proteine der Zell-Adhäsion beeinflusst, sondern auch auf die Migration, EZM-Organisation und Vaskularisation einwirkt (Schira, Falkenberg et al. 2015, Herten, Zilkens et al. 2019).

Handschel et al. konnten bei DAG-stimulierten Mikromassen aus ESC nach 10-tägiger Kultur, Anzeichen von Hydroxylapatit-ähnlichen Strukturen nachweisen (Handschel, 2011).

In vivo besaßen DAG-stimulierte USSC-Mikromassen, im Vergleich zu DAG-stimulierten ESC-Mikromassen, einen signifikant höheren Calciumgehalt und Mineralisierungsgrad (Handschel, 2010). Nach DAG-Zugabe stellten die ESC-Mikromassen das Aussprossen ein, wohingegen die USSC-Mikromassen auch nach DAG-Stimulation weiter aussprossen. Ohne osteoblastäre Differenzierung konnte sogar eine 2-fach größere Aussprossdistanz im Vergleich zu den ESC-Mikromassen nach 5 Tagen gemessen werden (Langenbach, Naujoks et al. 2010). Folglich stellt die USSC-Linie eine geeignete Zelllinie zur Herstellung von Mikromassen dar, da sie auch nach osteoblastärer Stimulation weiter aus Mikromassen aufsprießen kann.

4.2 Die zellreiche Mikromasse

Eine wichtige Rolle im BTE könnte der Mikromasse als ein gerüstfreies, zellreiches und dreidimensionales Konstrukt in Zukunft zu kommen (Handschel, Naujoks et al. 2011). In Vorversuchen von Langenbach et al. zeigte sich beim Aussprossversuch mit DAG-stimulierten USSC-Mikromassen, dass diese als zunehmend calcifiziertes Zellkonstrukt nach 5-tägiger Kultur in ihrer Grundstruktur bestehen bleiben. Als Ursache wurde eine erschwerte Zellmigration aus dem Zellkonstrukt durch die EZM-Mineralisierung der peripheren Mikromassenschichten postuliert (Langenbach, Naujoks et al. 2010).

In den hier durchgeführten Untersuchungen wurde bei nicht-DAG stimulierten USSC-Mikromassen sogar nach 16-tägiger Kultur eine nahezu vollständige Beibehaltung der Mikromassengeometrie festgestellt. Diese Beobachtung legt nahe, dass sich die Mikromasse im Rahmen der Ausbildung des Zellrasens nicht auflöst, sondern als zellreiches, dreidimensionales Konstrukt dauerhaft bestehen bleibt. Grund dafür könnte, bedingt durch die zunehmende Ablagerung von Calcium und Phosphat während der EZM-

Mineralisierung, eine reduzierte Proliferation und Migration der Zellen aus den inneren Mikromassenschichten sein.

In der bisherigen Literatur wurde vor allem die Mineralisierung der peripheren Mikromassenschichten nach DAG-Stimulation beschrieben (Langenbach, Naujoks et al. 2010, Handschel, Naujoks et al. 2011, Lammers, Naujoks et al. 2012). Lammers et al. fielen allerdings auch bei nicht-DAG stimulierten USSC-Mikromassen nach 7-tägiger Kultur Calcium/Phosphat-Ablagerungen auf. Nach 21 Tagen konnte ähnlich zu DAG-stimulierten Mikromassen eine nahezu vollständige Mineralisierung der Mikromasse beobachtet werden (Lammers, Naujoks et al. 2012). Morphologische Veränderungen zu einem Osteoblasten-ähnlichen Aussehen wie auch Calcium/Phosphatablagerungen im Rahmen der EZM-Mineralisierung, werden als Indikatoren für die osteoblastäre Differenzierung angesehen (Pittenger, Mackay et al. 1999, Bielby, Boccaccini et al. 2004, Lommen, Sus et al. 2022).

Obwohl die DAG-Zugabe als gängige und effektive Methode zur Stimulation der osteoblastären Differenzierung von USSC und insbesondere von USSC-Mikromassen gilt, scheinen sich weitere Faktoren, insbesondere in den inneren Mikromassenschichten, günstig auf die Differenzierung der USSC auszuwirken (Langenbach, Berr et al. 2011, Lammers, Naujoks et al. 2012, Zhang, Liu et al. 2022). Einer dieser Faktoren bezieht sich auf die hohe Zelldichte innerhalb der Mikromasse. Eine hohe Zelldichte induziert *in vivo* den Prozess der Osteogenese (Itoh, Itoh et al. 2021). Bei dichten *in vitro* Kulturen besteht eine Hochregulation der osteoblastären Differenzierungsmarker RUNX2 und Osteonectin (Bitar, Brown et al. 2008). Lammers et al. zufolge beginnt die EZM-Mineralisierung der nicht-DAG stimulierten Mikromassen vor allem im Zentrum der Mikromassen, an dem Ort mit der ursprünglich höchsten Zelldichte (Lammers, Naujoks et al. 2012).

Als weitere Faktoren fördern die Kollagen Typ I-reiche EZM sowie die intensiv ausgebildeten zellulären Kontakte, die osteoblastäre Differenzierung der sich in der Mikromasse befindenden USSC (Langenbach, Naujoks et al. 2010). Eine Schlüsselrolle kommt hierbei den Integrinen zu, als Teil fokaler Adhäsionen zwischen der Zytoplasmamembran und dem Kollagen Typ I der EZM. Sie induzieren die MAPK-Kaskade, welche über die Aktivierung von RUNX2 und CBFA-a (*Core-binding factor alpha*) zur osteoblastären Differenzierung der Stammzellen führt.

Auch andere Signalwege, wie der PI3K/AKT-Signalweg, erwiesen sich als ebenso maßgeblich für den spontanen Differenzierungsprozess der USSC-Mikromassen (Lommen, Sus et al. 2022). Im Gegensatz zum Integrin vermittelten MAPK-Signalweg, wird PI3K/Akt über das transmembrane Protein N-Cadherin initiiert und wirkt sowohl direkt und indirekt als Aktivator von RUNX2 (Meier, Schitteck et al. 2005, Cohen-Solal, Boregowda et al. 2015). Zusammenfassend betrachtet, kommt der hohen Zelldichte der inneren Mikromassenschichten sowie der Ausbildung von intensiven zellulären Kontakten, eine bedeutende Rolle in der zunehmenden Calcifizierung der EZM von USSC in Mikromassen

zu. Die Mikromasse kann als zellreiches Gerüst aus osteoblastär differenzierten USSC, umgeben von knochenähnlichem Gewebe, betrachtet werden. Sie durchläuft, auch ohne DAG-Stimulation, einen Reifungsprozess hin zu einem zunehmend calcifizierten Konstrukt.

Die gereifte Mikromasse bietet eine dreidimensionale Grundstruktur ohne die Verwendung von Fremdmaterial, das *in vivo* u. U. zu komplikationsreichen Verläufen während der Heilung führen könnte. Im *Bone Tissue Engineering* sollen Gerüste als Leitstruktur zur planbaren räumlichen Anordnung implantierter Zellen sowie zum Einsprießen von Zellen und Gefäßen dienen. Insbesondere für Gerüste bzw. dreidimensionale Konstrukte aus hohen Zellvolumina besteht ein erhöhtes Risiko für die Unterversorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen sowie der Akkumulation von metabolischen Giftstoffen (Oliveira Leeuwenburgh et al. 2021).

Die in dieser Arbeit durchgeführte Expressionsanalyse des Sauerstoffmangel-Markers HIF1-alpha zeigte weder eine Erhöhung der Kopienzahl in Zellen aus der 45Mm noch in ausgesprossenen USSC. Die zu diesem Zweck untersuchten Mikromassen wurden jedoch bereits nach 1-tägiger Kultur im Agarose-Bett geerntet und analysiert. Allerdings konnten Lammers et al. auch nach 21-tägiger Kultur in USSC-Mikromassen aus 180.000 Zellen (180Mm), keinen Hinweis auf Apoptose der von Calcium/Phosphat umgebenen USSC feststellen (Lammers, Naujoks et al. 2012). Dennoch sollten weiterführende Versuche erfolgen, um mögliche Mangelzustände in gereiften Mikromassen auszuschließen. Schließlich könnten Mangelzustände eine Abstoßung des transplantierten BTE-Konstrukts *in vivo* herbeiführen.

4.3 Ausgesprossene USSC aus den Mikromassen

In Vorversuchen wurde von Langenbach et al. während einer 5-tägigen Kulturdauer die Entwicklung eines aussprießenden Zellrasens um die Mikromasse beschrieben (Langenbach, Naujoks et al. 2010). Der in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Aussprossversuch belegt die Dynamik des sich kontinuierlich entwickelnden Zellrasens sogar über einen Zeitraum von 16 Tagen. Im Gegensatz zu den Untersuchungen von Langenbach et. al. wurden die in der vorliegenden Studie untersuchten Mikromassen nicht mit DAG zur osteoblastären Differenzierung stimuliert. Die Hinzugabe von DAG führte bei USSC-Mikromassen zu einer EZM-Mineralisierung äußerer Mikromassenschichten, die zur signifikanten Reduktion der Zellmigration beitrug (Langenbach, Berr et al. 2011, Lammers, Naujoks et al. 2012). Die in der vorliegenden Untersuchung durchschnittlich erreichte Distanz von 3,75mm (für 45Mm) und 3,91mm (für 90Mm) erwies sich um 46-48% weiter als

die der DAG-stimulierten USSC-Mikromassen von Langenbach et al. (Langenbach, Naujoks et al. 2010).

Es war bisher ungeklärt, ob die EZM-Mineralisierung lediglich die Migration der Zellen aus den peripheren Mikromassenschichten oder auch die der aussprossenden USSC beeinflusst. Hier ergab sich in Zusammenschau mit der Proliferations- und Mineralisierungsanalyse mehr Aufschluss über das Verhalten der aussprossenden USSC. Ähnlich den USSC der Mikromassen, sind auch ausgesprossene USSC zu einer spontanen Mineralisierung der EZM fähig. Vor allem bei ausgesprossenen USSC der 45Mm ergaben sich unter DMEM signifikant erhöhte Mengen von Hydroxylapatitkristallen nach 11-tägiger Kultur. Die Auswertung der EZM-Mineralisierung pro Zelle (unter DMEM), ergab bei ausgesprossenen USSC einen doppelt so hohen Mineralisierungsgehalt wie bei ML-USSC. Gleichzeitig blieben die ausgesprossenen USSC gegenüber der osteoblastären Stimulation mit DAG weiterhin sensibel. Augesprossene USSC der 45Mm wiesen auch hier einen signifikant höheren Mineralisierungsgehalt als ML-USSC auf. Insgesamt scheint sich die Mikromassen-Formation nachhaltig positiv auf die osteoblastäre Differenzierungsfähigkeit ausgesprossener USSC auszuwirken. Angesichts der ausgeprägten spontanen Mineralisierungsneigung scheinen auch bei ausgesprossenen USSC die Voraussetzungen zur Mineralisierung wie bei zentralen Mikromassenschichten vorzuliegen. Zur genaueren Evaluation der hohen Bereitschaft ausgesprossener USSC zur EZM-Mineralisierung, bedarf es weiterführender Versuche auf Ebene der Genexpression.

Der konfluente Zellrasen wurde mutmaßlich durch Zellen der äußeren Mikromassenschichten gebildet, deren Migration und Proliferation zu Kulturbeginn noch nicht durch Calcium/Phosphat-Ablagerungen beeinflusst worden ist. Auch wenn ausgesprossene USSC zu einer deutlich stärker EZM-Mineralisierung als ML-USSC neigen, so sind sie weiterhin zur Proliferation fähig, wie in den Auswertungen der hier durchgeführten Proliferationsanalyse veranschaulicht. Es ergab sich dennoch ein signifikanter Unterschied zum Proliferationsvermögen monolayerkultivierter USSC, sowohl unter DMEM als auch unter DAG. Nach den Ergebnissen von Lammers et al. ist anzunehmen, dass sich der Zellrasen kontinuierlich entwickelt, während sich die spontane EZM-Mineralisierung vom Zentrum der Mikromasse nach peripher über den Zellrasen ausbreitet. Demzufolge könnte der ausgesprossene Zellrasen im Laufe der Kulturdauer einen ähnlichen Reifungsprozess wie die Mikromasse durchlaufen. Auch dies sollte durch weiterführende Versuche verifiziert werden.

4.4 Die MT1-MMP vermittelte Zellmigration

Das stetige Migrationsvermögen der USSC konnte in dem hier durchgeführten Aussprossversuch anhand der linearen Aussprossdistanz dargelegt werden. Auch unter DAG-Stimulation wurde in Vorversuchen von Langenbach et. al eine erhaltene Migrationsfähigkeit ausgesprosster USSC aus Mikromassen demonstriert. Selbst über die Imitation einer physiologischen Basalmembran migrierten DAG-stimulierte USSC aus der Mikromasse (Langenbach, Naujoks et al. 2010).

Als perizelluläre Peptidase trägt MT1-MMP zum Abbau von Fibronectin-Bündeln im Rahmen des EZM-*Remodeling* zur Migration freigewordener Zellen bei (Wan, Liu et al. 2019). Auf dem Niveau der hier durchgeführten Expressionsanalyse wiesen auch ausgesprossste USSC eine beständige MT1-MMP-Expression auf.

Bei USSC aus Mikromassen zeigte sich jedoch eine signifikant verringerte MT1-MMP Expression. Laut Literatur besteht ein Zusammenhang zwischen supprimierter MT1-MMP-Expression und Inhibierung des ERK- sowie des PI3K/AKT-Signalwegs in dreidimensionaler EZM-Umgebung mit nachfolgender Hemmung der Proliferation und Invasionsfähigkeit von MSC (Sun, Gao et al. 2013). Sowohl der ERK- als auch PI3K/AKT-Signalweg sind mit der osteoblastären Differenzierungsfähigkeit von Stammzellen, insbesondere mit der spontanen osteoblastären Differenzierung von USSC-Mikromassen assoziiert (Zhang, Yu et al. 2018, Lommen, Sus et al. 2022). Hinsichtlich der spontanen Mineralisierungsneigung der USSC aus Mikromassen wäre von einem Zusammenhang zwischen osteoblastärer Mineralisierung und MT1-MMP-Expression auszugehen. Allerdings wurden die hier untersuchten USSC aus Mikromassen bereits nach 1-tägiger Kultur zur RNA-Extraktion geerntet. Entsprechend den Ergebnissen von Lommen et al. war zu diesem Zeitpunkt von keiner EZM-Mineralisierung der nicht-DAG stimulierten Mikromassen auszugehen (Lommen, Sus et al. 2022).

Es scheint somit eher die Mikromassenformation an sich die MT1-MMP-Expression zu beeinflussen. Hierbei könnten Integrin-vermittelte Signalwege, die eine MT1-MMP-Expression über Zug- und Scherkräfte sowie Substratfestigkeit regulieren, in Betracht kommen (Takino, Guo et al. 2013, Gifford and Itoh 2019). Es ist anzunehmen, dass die substratvermittelten Einflüsse des Agarose-Betts und die hohe Zelldichte über die Integrin-vermittelten Signalwege zu einer verringerten Expression von MT1-MMP geführt haben. Bei Fibrosarkomzellen konnten Takino et al. eine MT1-MMP-Inhibierung infolge der Kulturbedienung eines lockeren und nicht verformbaren Substrats demonstrieren. Nach Zugabe eines neutralisierenden Antikörpers zeigte sich eine wiederhergestellte Proliferationskapazität in den zuvor MT1-MMP-supprimierten Fibrosarkomzellen (Takino, Guo et al. 2013). Die Restitution der MT1-MMP-Expression konnte auch in der hier

durchgeführten Expressionsanalyse bei ausgesprossenen USSC belegt werden. Folglich scheint die MT1-MMP-Expression der USSC durch äußere Einflüsse moduliert zu werden. Ausgesprossene USSC sind mutmaßlich durch die längere Kulturdauer auf festem Substrat, hier der Petri-Schale, sowie der geringeren Zelldichte wieder zur MT1-MMP-Expression fähig.

Zur Untersuchung, inwiefern Substratfestigkeit und Zelldichte die MT1-MMP-Expression in USSC beeinflussen, sollten weitere Versuche durchgeführt werden. Es bleibt offen, ob die MT1-MMP-Expression im Laufe der Mikromassenreifung und damit einhergehenden osteoblastären Differenzierung zusätzlich beeinflusst wird. Zur Verifizierung sollten weitere Analysen der MT1-MMP-Genexpression in reifen Mikromassen (nach 7-tägiger Kultur) ergänzt werden.

4.5 Vinkulin

Eine effektive Zellmigration wird sowohl zur Entwicklung embryonalen Gewebes als auch für Gewebeheilungsprozesse benötigt. Während dieser Prozesse migrieren Zellen im mesenchymalen Migrationsmodus in Form von hochpolarisierten Zellen mit Aktin-gesteuerten Protrusionen und Adhäsionen zur EZM, die über Integrinrezeptor-vermittelte Übertragung von Zug- und Scherkräften des Zytoskeletts gesteuert werden (Bays and DeMali 2017). Als Modulator der Mechanosensorik von zytoskelettalen Zug- und Kontraktionskräften ist Vinkulin im Aufbau von Zell-Zell-Kontakten (*Adherens junctions*) und Zell-Matrix-Kontakten (fokalen Adhäsionen) involviert. Über seine Bindung an Talin, Paxillin und alpha-Aktinin in fokalen Adhäsionen, ist Vinkulin für die mechanische Kopplung zwischen Integrinen und dem Zytoskelett verantwortlich (Bays and DeMali 2017, Wang, Melero et al. 2021).

Die Auswertung der RT-PCR Analyse von Vinkulin zeigte das gleiche Expressionsniveau in ausgesprossenen USSC wie in der monolayerkultivierten Kontrollgruppe. Das stetige Migrationspotenzial von ausgesprossenen USSC ließ sich auch im Aussprossversuch anhand linearer Aussprossdistanzen nachweisen. In USSC aus Mikromassen hingegen, bestand eine signifikant reduzierte Expression von Vinkulin verglichen zu den ML-USSC und ausgesprossenen USSC. Ähnlich wie bei der MT1-MMP-Expression, könnten Faktoren der äußeren Umgebung Einfluss auf die Expression von Vinkulin in USSC ausüben. Als Modulator der Mechanosensorik von zytoskelettalen Zug- und Kontraktionskräften, reagiert Vinkulin ebenfalls sensibel gegenüber der Substratfestigkeit. Erhöhte Expressionslevel von Vinkulin wurden in MSC-Kulturen auf festem Substrat nachgewiesen (Zhang, Lin et al. 2018). Ob auch in diesem Zusammenhang die substratvermittelten Einflüsse des Agarose-

Betts zu einem verringerten Vinkulin-Expressionsniveau geführt haben, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Als Folge einer supprimierten Vinkulin-Expression in zweidimensionalen Kulturen, beschrieben Thievessen et al. eine verstärkte Zellmigration aufgrund von geringerem Haftungsvermögen der Zellen. Im Gegensatz dazu wirkt sich die Vinkulin-Supprimierung in dreidimensionalen Zellkulturen hemmend auf das Migrationsverhalten der Zellen aus, die zudem in einem weiteren Winkel mit häufigerem Richtungswechsel im Sinne einer eher ungerichteten Migration wanderten. Dementsprechend scheint Vinkulin für eine gerichtete Migration in dreidimensionaler EZM verantwortlich zu sein (Thievessen, Fakhri et al. 2015). Zu Beginn des Aussprossversuchs sprossen die ersten migrierenden und proliferierenden USSC der äußeren Schichten eher ungerichtet aus der Mikromasse aus (siehe Abbildung 11). Entsprechend den Ergebnissen von Thievessen et al. wiesen USSC aus Mikromassen eine verringerte Vinkulin-Expression auf. Im weiteren Verlauf entwickelten die ausgesprossenen USSC des Zellrasens eine gerichtete Migration zur gegenüberliegenden Mikromasse, möglicherweise durch Gradienten löslicher Faktoren dieser Mikromasse. In den ausgesprossenen USSC restituierte sich die Vinkulin-Expression auf das gleiche Niveau wie in ML-USSC. Auch in diesem Kontext bedarf es weiterer Versuche zur Evaluierung des Vinkulin-Expressionsprofils durch mögliche weitere Faktoren.

Das Schicksal von Stammzellen innerhalb der Stammzellnische wird unter anderem durch molekulare Signale wie Zug- und Scherkraft und durch die spatiotemporale Koordination zu benachbarten Stromazellen beeinflusst (Sajeesh, Broekelman et al. 2020). Innerhalb der Stammzellnische ist Vinkulin über Talin an der Aktivierung von Integrin-vermittelten Komplexen involviert. Komplexe aus N-Cadherin/ β -Catenin, VCAM (*vascular cell adhesion molecule*) /Integrin und Osteopontin/ β 1-Integrin regulieren die asymmetrische Teilung und Migration von differenzierten Stammzellen aus der Nische (Ohmori, Kashiwakura et al. 2010).

Ausgesprossene USSC aus Mikromassen und monolayerkultivierte USSC wiesen ähnlich hohe Expressionslevel von Vinkulin auf, sodass von teilweise konservierten Eigenschaften der Stammzellnische auszugehen ist.

Das geringe Vinkulin-Expressionsniveau in USSC aus Mikromassen könnte ein Hinweis auf einen Verlust dieser Eigenschaften sein. In Vinkulin-supprimierten MSC kam es zu einem beschleunigten Zellzyklus einhergehend mit einem Verlust der Quieszenz und des Stammzell-Reservoirs. Auf dem Niveau der Expressionsanalyse ging dies mit einem Verlust der Stammzellmarker SOX9 und K19 einher (Biswas, Banerjee et al. 2021). Verantwortlich für den Verlust des Stammzellcharakters ist eine geschwächte Kontaktinhibition von Stammzellen zu ihrer Umgebung, die indirekt über Vinkulin vermittelt wird. Zur Verankerung und Abschirmung besitzen Stammzellen in der Quieszenz eine erhöhte Expression von

Adherens junctions, in denen der mechanosensitive Transkriptionsfaktor YAP1 (*Yes-associated Protein 1*) im inaktiven Zustand vorliegt. In Vinkulin-supprimierten Stammzellen ist YAP1 aktiv und seine Cyclin-assoziierten Zielproteine sind hochreguliert, was zu einem beschleunigten Zellzyklus sowie einer erhöhten Proliferation und Differenzierung der Stammzellen führt (Biswas, Banerjee et al. 2021).

In Hinblick auf die signifikant verringerte Vinkulin-Expression in USSC aus Mikromassen ist es fraglich, ob das Aussprießen der USSC aus der Mikromasse auf eine erhöhte Proliferation und Differenzierung aufgrund des beschleunigten Zellzyklus zurückzuführen ist. Hier bedarf es weiterführender Untersuchungen mittels einer Proliferationsanalyse von USSC aus Mikromassen nach kurzer Kulturdauer.

Ferner ist YAP auch an der Initiierung der osteoblastären Differenzierung von Stammzellen durch Übertragen von Substratfestigkeit über fokale Adhäsionen beteiligt (Wei, Holle et al. 2020). Die Untersuchungen von Lammers et al. legen nahe, dass USSC aus nicht-osteoblastär stimulierten Mikromassen eine hohe spontane osteoblastäre Differenzierungsfähigkeit aufweisen (Lammers, Naujoks et al. 2012). Dies könnte unter anderem zur Initiierung des Reifungsprozesses innerhalb der Mikromasse beitragen. Hier könnten Untersuchungen der YAP-Genexpression weiter Aufschluss geben.

4.6 Notch3

Zum Erhalt physiologischer Gewebefunktionen und Reparaturmechanismen ist die Stammzellnische ein wichtiger Bestandteil, indem die Proliferations-, Differenzierungs- und Selbsterneuerungsfähigkeit von Stammzellen bewahrt werden (Sajeesh, Broekelman et al. 2020). Im Falle einer akuten ossären Verletzung expandieren Stammzellen im Knochenmark, um durch asymmetrische Teilung, Proliferation und Differenzierung neue Zellen zur Geweberegeneration hervorzubringen (Chan, Gulati et al. 2018). Durch Deregelung und Alterung können Stammzellen ihre Fähigkeiten verlieren oder zugrunde gehen (Lane, Williams et al. 2014, Pignolo, Law et al. 2021). Der Notch-Signalweg ist ein grundlegender Bestandteil in der Kommunikation von Stammzellen mit ihrem Umfeld zum Erhalt ihrer Fähigkeiten und der Antwort auf akute Gewebeverletzungen (Koch, Lehal et al. 2013, Tikhonova, Dolgalev et al. 2019). Bei sich differenzierenden Stammzellen besteht eine herabregulierte Notch3 Expression (Pignolo, Law et al. 2021). USSC gelten als pluripotente Stammzellen, sodass von einer erhaltenen Notch3 Expression in der monolayerkultivierten Kontrollgruppe auszugehen ist. Die Expressionsanalyse von USSC aus 45Mm und ausgesprossenen USSC aus Mikromassen wies keinen Unterschied zur ML-USSC Kontrollgruppe auf. Dies lässt auf einen konservierten Stammzellcharakter sowohl

von USSC innerhalb der Mikromasse als auch ausgesprossenen USSC schließen, obwohl in ausgesprossenen USSC eine hohe Neigung zur osteoblastären Differenzierung festgestellt wurde. Zur Untersuchung mittels RT-PCR wurden ausgesprossene USSC für 7 Tage kultiviert, während das Mineralisierungsassay an ausgesprossenen USSC nach weiteren 11 Tagen Kultur (also nach kumulativ 18-tägiger Kultur) angewandt wurde. Demzufolge scheinen sich ausgesprossene USSC zwischen Tag 7 und 18 spontan entlang der osteoblastären Linie zu differenzieren. In weiteren Untersuchungen sollte ermittelt werden, ab wann dies die Notch3 Expression beeinflusst. Diesbezüglich sollten auch Expressionsanalysen von Notch3 an reifen Mikromassen (nach 7 Tagen) ergänzt werden.

4.7 HIF-1

Ein weiterer Regulator des Erhalts der Stammzellnische ist der Sauerstoffmarker HIF-1 α . Hämatopoetische Stammzellen (HSC) in der osteoblastischen Nische benötigen einen hypoxischen Zustand zur Beibehaltung der Quieszenz. Hinweisend dafür ist die moderate Hochregulation des Hypoxie-Markers HIF-1 α in LT-HSC (*Long-term repopulating hematopoietic stem cells*) (Szade, Gulati et al. 2018). HIF-1 α -supprimierte Stammzellen wiesen eine erhöhte Proliferation und geringere Toleranz gegenüber Stressfaktoren auf (Zhang, Chan et al. 2022). Eine deutlich erhöhte Hochregulation von HIF-1 α führte hingegen zur verfrühten Erschöpfung der Selbsterneuerung (Suda, Takubo et al. 2011). Folglich agiert HIF-1 α als feiner Regulator des Erhalts der Stammzellnische.

Obwohl die Mikromasse aus einer hohen Zelldichte besteht, ließ sich bei der hier durchgeführten Expressionsanalyse von HIF-1 α keine Hochregulation des Sauerstoffmangel-Markers feststellen. Sowohl USSC aus Mikromassen als auch ausgesprossene USSC wiesen ein ähnliches Expressionsniveau wie monolayerkultivierte USSC auf. Es ist daher von keiner Dysregulation der Stammzeleigenschaften von USSC aufgrund von HIF-1 auszugehen. Zur weiteren Verifizierung sollten noch Expressionsanalysen von HIF-1 auch an Mikromassen mit längerer Kulturdauer erfolgen.

4.8 Ausblick

Mit der vorliegenden Arbeit wurden umfangreiche Untersuchungen zur Evaluierung der zelltypischen Eigenschaften ausgesprossener USSC aus Mikromassen unterschiedlicher Größe durchgeführt.

Das Mikromassen-Modell bietet als dreidimensionales zellreiches Konstrukt eine gute Grundlage für die Implantation hoher Zellzahlen. Dabei schafft die dreidimensionale zellreiche Sphäre günstige Voraussetzungen für die spontane und induzierbare osteoblastäre Differenzierung der USSC. Durch das Aussprießen ist die Voraussetzung für die Entwicklung eines flächenhaften und konfluenten Zellrasens gegeben. In den hier durchgeführten Versuchen konnte die kontinuierliche Entwicklung des Zellrasens über einen Zeitraum von 16 Tagen nachgewiesen werden. Dabei fiel ein signifikanter Unterschied zwischen ausgesprossenen USSC aus Mikromassen und monolayerkultivierten USSC hinsichtlich der proliferativen Aktivität und ihres osteoblastären Differenzierungspotenzials auf. Die Kultur innerhalb der Mikromasse wirkt sich nachhaltig auf die ausgesprossenen USSC aus, die dennoch ihr Potenzial als Stammzellen nicht verlieren. In der Literatur wurde bisher hauptsächlich das Migrationsverhalten von USSC in kurzen Zeiträumen untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit ließ sich in längeren Zeiträumen, insbesondere auch auf Ebene der Genexpression, ein signifikanter Unterschied zwischen USSC in Mikromassen und ausgesprossenen USSC sowie monolayerkultivierten USSC nachweisen.

In USSC aus Mikromassen sind eine Reihe von obligatorischen Genen der Zellmigration nicht exprimiert. Das Verhalten der Zellen im Mikromassen-Konstrukt wird folglich von Einflüssen der Umgebung gesteuert. Bei ausgesprossenen USSC wurde die Expression dieser Gene wieder aufgenommen.

Es ließ sich der Erhalt der Stammzellnischen-Eigenschaften bei USSC sowohl in den Mikromassen als auch nach dem Aussprießen vermuten. In Bezug auf die Expressionsanalyse der Stammzellnischen-Marker bestand kein signifikanter Unterschied zwischen ausgesprossenen USSC aus 45Mm und 90Mm. Dadurch sollte die Möglichkeit der Gewebesynthese und -heilung im Rahmen einer *in vivo* implantierbaren Mikromasse gegeben sein.

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die Annahme, dass die Implantation hoher Zellzahlen und die flächenhafte Besiedelung eines ossären Defekts durch USSC-Mikromassen möglich zu sein scheinen. Vor allem der sich kontinuierlich entwickelnde Zellrasen könnte zur Deckung umfangreicher Läsionen eingesetzt werden, wobei die

Mikromasse als zellreiches, fremdmaterialfreies Gerüst bestehen bleibt. Ob ein ähnliches Zellverhalten auch *in vivo* zu beobachten ist, sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Schließlich konnte in dieser Arbeit eine hohe Sensibilität der USSC auf ihr extrazelluläres Umfeld bestätigt werden. Da *in vivo* sowohl physiologische Barrieren, wie auch weitere extrazelluläre Einflüsse und immunologische Reaktionen zu erwarten sind, könnte *in vivo* ein anderes Verhalten der USSC in Erscheinung treten. Darüber hinaus müsste vor einem klinischen Einsatz untersucht werden, ob die flächenhafte Besiedelung bzw. Defektüberbrückung einer ossären Läsion mit ausgesprosten USSC aus Mikromassen überhaupt möglich ist.

5 Literaturverzeichnis

Aburjania, Z., S. Jang, J. Whitt, R. Jaskula-Stzul, H. Chen and J. B. Rose (2018). "The Role of Notch3 in Cancer." *Oncologist* 23(8): 900-911.

Akhavan Rahnema, M., M. Soufi Zomorrod, S. Abroun and A. Atashi (2021). "The effect of exosomes derived from unrestricted somatic stem cells on murine model of sepsis." *Cells Tissues Organs*.

Arthur, A. and S. Gronthos (2020). "Clinical Application of Bone Marrow Mesenchymal Stem/Stromal Cells to Repair Skeletal Tissue." *Int J Mol Sci* 21(24).

Aumüller (2006). *Duale Reihe Anatomie Thieme*.

Baker, C. L. and M. F. Pera (2018). "Capturing Totipotent Stem Cells." *Cell Stem Cell* 22(1): 25-34.

Bartosh, T. J. and J. H. Ylostalo (2019). "Efficacy of 3D Culture Priming is Maintained in Human Mesenchymal Stem Cells after Extensive Expansion of the Cells." *Cells* 8(9).

Bays, J. L. and K. A. DeMali (2017). "Vinculin in cell-cell and cell-matrix adhesions." *Cell Mol Life Sci* 74(16): 2999-3009.

Berdasco, M. and M. Esteller (2011). "DNA methylation in stem cell renewal and multipotency." *Stem Cell Res Ther* 2(5): 42.

Bielby, R. C., A. R. Boccaccini, J. M. Polak and L. D. Buttery (2004). "In vitro differentiation and in vivo mineralization of osteogenic cells derived from human embryonic stem cells." *Tissue Eng* 10(9-10): 1518-1525.

Biswas, R., A. Banerjee, S. Lembo, Z. Zhao, V. Lakshmanan, R. Lim, S. Le, M. Nakasaki, V. Kutyavin, G. Wright, D. Palakodeti, R. S. Ross, C. Jamora, V. Vasioukhin, Y. Jie and S. Raghavan (2021). "Mechanical instability of adherens junctions overrides intrinsic quiescence of hair follicle stem cells." *Dev Cell* 56(6): 761-780 e767.

Bitar, M., R. A. Brown, V. Salih, A. G. Kidane, J. C. Knowles and S. N. Nazhat (2008). "Effect of cell density on osteoblastic differentiation and matrix degradation of biomimetic dense collagen scaffolds." *Biomacromolecules* 9(1): 129-135.

Blache, U., Q. Vallmajo-Martin, E. R. Horton, J. Guerrero, V. Djonov, A. Scherberich, J. T. Erler, I. Martin, J. G. Snedeker, V. Milleret and M. Ehrbar (2018). "Notch-inducing hydrogels reveal a perivascular switch of mesenchymal stem cell fate." *EMBO Rep* 19(8).

Branco, M. A., J. P. Cotovio, C. A. V. Rodrigues, S. H. Vaz, T. G. Fernandes, L. M. Moreira, J. M. S. Cabral and M. M. Diogo (2019). "Transcriptomic analysis of 3D

Cardiac Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells Reveals Faster Cardiomyocyte Maturation Compared to 2D Culture." *Sci Rep* 9(1): 9229.

Briscoe, J. and S. Small (2015). "Morphogen rules: design principles of gradient-mediated embryo patterning." *Development* 142(23): 3996-4009.

Bustin, S. A. (2000). "Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays." *J Mol Endocrinol* 25(2): 169-193.

Canalis, E., S. Zanotti, L. Schilling, T. Eller and J. Yu (2021). "Activation of Notch3 in osteoblasts/osteocytes causes compartment-specific changes in bone remodeling." *J Biol Chem* 296: 100583.

Capaccione, K. M. and S. R. Pine (2013). "The Notch signaling pathway as a mediator of tumor survival." *Carcinogenesis* 34(7): 1420-1430.

Chan, C. K. F., G. S. Gulati, R. Sinha, J. V. Tompkins, M. Lopez, A. C. Carter, R. C. Ransom, A. Reinisch, T. Wearda, M. Murphy, R. E. Brewer, L. S. Koepke, O. Marecic, A. Manjunath, E. Y. Seo, T. Leavitt, W. J. Lu, A. Nguyen, S. D. Conley, A. Salhotra, T. H. Ambrosi, M. R. Borrelli, T. Siebel, K. Chan, K. Schallmoser, J. Seita, D. Sahoo, H. Goodnough, J. Bishop, M. Gardner, R. Majeti, D. C. Wan, S. Goodman, I. L. Weissman, H. Y. Chang and M. T. Longaker (2018). "Identification of the Human Skeletal Stem Cell." *Cell* 175(1): 43-56 e21.

Chhabra, S. N. and B. W. Booth (2021). "Asymmetric cell division of mammary stem cells." *Cell Div* 16(1): 5.

Cohen-Solal, K. A., R. K. Boregowda and A. Lasfar (2015). "RUNX2 and the PI3K/AKT axis reciprocal activation as a driving force for tumor progression." *Mol Cancer* 14: 137.

Ding, Z., K. Tan, C. Alter, S. Temme, P. Bouvain, C. Owenier, S. Hansch, S. Wesselborg, C. Peter, S. Weidtkamp-Peters, U. Flogel, J. Schira-Heinen, K. Stuhler, J. Hesse, G. Kogler and J. Schrader (2022). "Cardiac injection of USSC boosts remuscularization of the infarcted heart by shaping the T-cell response." *J Mol Cell Cardiol* 175: 29-43.

Estes, B. T., B. O. Diekman, J. M. Gimble and F. Guilak (2010). "Isolation of adipose-derived stem cells and their induction to a chondrogenic phenotype." *Nat Protoc* 5(7): 1294-1311.

Fatherazi, S., D. Matsa-Dunn, B. L. Foster, R. B. Rutherford, M. J. Somerman and R. B. Presland (2009). "Phosphate regulates osteopontin gene transcription." *J Dent Res* 88(1): 39-44.

Ferreira, M. J. S., F. E. Mancini, P. A. Humphreys, L. Ogene, M. Buckley, M. A. N. Domingos and S. J. Kimber (2022). "Pluripotent stem cells for skeletal tissue engineering." *Crit Rev Biotechnol* 42(5): 774-793.

Gifford, V. and Y. Itoh (2019). "MT1-MMP-dependent cell migration: proteolytic and non-proteolytic mechanisms." *Biochem Soc Trans* 47(3): 811-826.

- Godini, R., K. Karami and H. Fallahi (2019). "Genome imprinting in stem cells: A mini-review." *Gene Expr Patterns* 34: 119063.
- Grigull, N. P., J. I. Redeker, B. Schmitt, M. M. Saller, V. Schonitzer and S. Mayer-Wagner (2020). "Chondrogenic Potential of Pellet Culture Compared to High-Density Culture on a Bacterial Cellulose Hydrogel." *Int J Mol Sci* 21(8).
- Gstranthalder, G. and T. Lindl (2013). *Zell-und Gewebekultur*, Springer Berlin Heidelberg.
- Guo, L., Y. Zhou, S. Wang and Y. Wu (2014). "Epigenetic changes of mesenchymal stem cells in three-dimensional (3D) spheroids." *J Cell Mol Med* 18(10): 2009-2019.
- Guo, X., Y. Chen, W. Ji, X. Chen, C. Li and R. Ge (2019). "Enrichment of cancer stem cells by agarose multi-well dishes and 3D spheroid culture." *Cell Tissue Res* 375(2): 397-408.
- Han, J., L. Chen, G. Luo, B. Dai, X. Wang and J. Dai (2013). "Three-dimensional culture may promote cell reprogramming." *Organogenesis* 9(2): 118-120.
- Handschel, J., C. Naujoks, R. Depprich, L. Lammers, N. Kubler, U. Meyer and H. P. Wiesmann (2011). "Embryonic stem cells in scaffold-free three-dimensional cell culture: osteogenic differentiation and bone generation." *Head Face Med* 7: 12.
- Handschel, J. G., R. A. Depprich, N. R. Kubler, H. P. Wiesmann, M. Ommerborn and U. Meyer (2007). "Prospects of micromass culture technology in tissue engineering." *Head Face Med* 3: 4.
- He, J., G. Chen, M. Liu, Z. Xu, H. Chen, L. Yang and Y. Lv (2020). "Scaffold strategies for modulating immune microenvironment during bone regeneration." *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 108: 110411.
- Heid, C. A., J. Stevens, K. J. Livak and P. M. Williams (1996). "Real time quantitative PCR." *Genome Res* 6(10): 986-994.
- Herten, M., C. Zilkens, F. Thorey, T. Tassemeier, S. Lensing-Hohn, J. C. Fischer, M. Sager, R. Krauspe and M. Jager (2019). "Biomechanical Stability and Osteogenesis in a Tibial Bone Defect Treated by Autologous Ovine Cord Blood Cells-A Pilot Study." *Molecules* 24(2).
- Hildebrandt, C., H. Buth and H. Thielecke (2011). "A scaffold-free in vitro model for osteogenesis of human mesenchymal stem cells." *Tissue Cell* 43(2): 91-100.
- Hsieh, J.-Y., Y.-S. Fu, S.-J. Chang, Y.-H. Tsuang and H.-W. Wang (2010). "Functional module analysis reveals differential osteogenic and stemness potentials in human mesenchymal stem cells from bone marrow and Wharton's jelly of umbilical cord." *Stem cells and development* 19(12): 1895-1910.
- Hubbi, M. E. and G. L. Semenza (2015). "Regulation of cell proliferation by hypoxia-inducible factors." *Am J Physiol Cell Physiol* 309(12): C775-782.

Hur, Y. H., S. Feng, K. F. Wilson, R. A. Cerione and M. A. Antonyak (2021). "Embryonic Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Maintain ESC Stemness by Activating FAK." *Dev Cell* 56(3): 277-291 e276.

Itoh, Y., S. Itoh, H. Naruse, T. Kagioka, M. T. Hue, M. Abe and M. Hayashi (2021). "Intracellular density is a novel indicator of differentiation stages of murine osteoblast lineage cells." *J Cell Biochem* 122(12): 1805-1816.

Jager, M., M. Sager, A. Knipper, O. Degistirici, J. Fischer, G. Kogler, P. Wernet and R. Krauspe (2004). "[In vivo and in vitro bone regeneration from cord blood derived mesenchymal stem cells]." *Orthopade* 33(12): 1361-1372.

Jeltsch, K. S., T. F. Radke, S. Laufs, F. A. Giordano, H. Allgayer, F. Wenz, W. J. Zeller, G. Kogler, S. Fruehauf and P. Maier (2011). "Unrestricted somatic stem cells: interaction with CD34+ cells in vitro and in vivo, expression of homing genes and exclusion of tumorigenic potential." *Cytotherapy* 13(3): 357-365.

Johnson, R. P. and S. W. Craig (2000). "Actin activates a cryptic dimerization potential of the vinculin tail domain." *J Biol Chem* 275(1): 95-105.

Jones, L. J., M. Gray, S. T. Yue, R. P. Haugland and V. L. Singer (2001). "Sensitive determination of cell number using the CyQUANT cell proliferation assay." *J Immunol Methods* 254(1-2): 85-98.

Kern, S., H. Eichler, J. Stoeve, H. Kluter and K. Bieback (2006). "Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue." *Stem Cells* 24(5): 1294-1301.

Koch, U., R. Lehal and F. Radtke (2013). "Stem cells living with a Notch." *Development* 140(4): 689-704.

Kogler, G., S. Sensken, J. A. Airey, T. Trapp, M. Muschen, N. Feldhahn, S. Liedtke, R. V. Sorg, J. Fischer, C. Rosenbaum, S. Greschat, A. Knipper, J. Bender, O. Degistirici, J. Gao, A. I. Caplan, E. J. Colletti, G. Almeida-Porada, H. W. Muller, E. Zanjani and P. Wernet (2004). "A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential." *J Exp Med* 200(2): 123-135.

Kogler, G., S. Sensken and P. Wernet (2006). "Comparative generation and characterization of pluripotent unrestricted somatic stem cells with mesenchymal stem cells from human cord blood." *Exp Hematol* 34(11): 1589-1595.

Kubler, N. R., J. F. Reuther, G. Faller, T. Kirchner, R. Ruppert and W. Sebald (1998). "Inductive properties of recombinant human BMP-2 produced in a bacterial expression system." *Int J Oral Maxillofac Surg* 27(4): 305-309.

Lammers, L., C. Naujoks, K. Berr, R. Depprich, N. Kubler, U. Meyer, F. Langenbach, B. Luttenberg, G. Kogler, H. P. Wiesmann and J. Handschel (2012). "Impact of DAG stimulation on mineral synthesis, mineral structure and osteogenic differentiation of human cord blood stem cells." *Stem Cell Res* 8(2): 193-205.

Lane, S. W., D. A. Williams and F. M. Watt (2014). "Modulating the stem cell niche for tissue regeneration." *Nat Biotechnol* 32(8): 795-803.

Langenbach, F., K. Berr, C. Naujoks, A. Hassel, M. Hentschel, R. Depprich, N. R. Kubler, U. Meyer, H. P. Wiesmann, G. Kogler and J. Handschel (2011). "Generation and differentiation of microtissues from multipotent precursor cells for use in tissue engineering." *Nat Protoc* 6(11): 1726-1735.

Langenbach, F. and J. Handschel (2013). "Effects of dexamethasone, ascorbic acid and beta-glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro." *Stem Cell Res Ther* 4(5): 117.

Langenbach, F., C. Naujoks, P. V. Kersten-Thiele, K. Berr, R. A. Depprich, N. R. Kubler, G. Kogler and J. Handschel (2010). "Osteogenic differentiation influences stem cell migration out of scaffold-free microspheres." *Tissue Eng Part A* 16(2): 759-766.

Langenbach, F., C. Naujoks, A. Laser, M. Kelz, P. Kersten-Thiele, K. Berr, R. Depprich, N. Kubler, G. Kogler and J. Handschel (2012). "Improvement of the cell-loading efficiency of biomaterials by inoculation with stem cell-based microspheres, in osteogenesis." *J Biomater Appl* 26(5): 549-564.

Lei, P. F., R. Y. Hu and Y. H. Hu (2019). "Bone Defects in Revision Total Knee Arthroplasty and Management." *Orthop Surg* 11(1): 15-24.

Lin, H., J. Sohn, H. Shen, M. T. Langhans and R. S. Tuan (2019). "Bone marrow mesenchymal stem cells: Aging and tissue engineering applications to enhance bone healing." *Biomaterials* 203: 96-110.

Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method." *Methods* 25(4): 402-408.

Lommen, J., M. Sus, K. Berr, N. R. Kubler, F. Langenbach, C. Sproll, M. Wilkat, F. Schrader, J. Handschel and L. Schorn (2022). "Analysis of Spontaneous and Induced Osteogenic Differentiation in 3D-micromasses of Human Multipotent Stem Cells." *In Vivo* 36(3): 1067-1076.

Lüllmann-Rauch, R. (2003). *Binde- und Stützgewebe Histologie Thieme*. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.

Lv, C., S. Wang, L. Lin, C. Wang, K. Zeng, Y. Meng, G. Sun, S. Wei, Y. Liu and Y. Zhao (2021). "USP14 maintains HIF1-alpha stabilization via its deubiquitination activity in hepatocellular carcinoma." *Cell Death Dis* 12(9): 803.

Meier, F., B. Schitteck, S. Busch, C. Garbe, K. Smalley, K. Satyamoorthy, G. Li and M. Herlyn (2005). "The RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT signaling pathways present molecular targets for the effective treatment of advanced melanoma." *Front Biosci* 10: 2986-3001.

Meyer, U. and H. P. Wiesmann (2005). "Tissue engineering: a challenge of today's medicine." *Head Face Med* 1: 2.

Ohmori, T., Y. Kashiwakura, A. Ishiwata, S. Madoiwa, J. Mimuro, Y. Furukawa and Y. Sakata (2010). "Vinculin is indispensable for repopulation by hematopoietic stem cells, independent of integrin function." *J Biol Chem* 285(41): 31763-31773.

Oliveira, C. S., S. Leeuwenburgh and J. F. Mano (2021). "New insights into the biomimetic design and biomedical applications of bioengineered bone microenvironments." *APL Bioeng* 5(4): 041507.

Pagella, P., L. de Vargas Roditi, B. Stadlinger, A. E. Moor and T. A. Mitsiadis (2021). "Notch signaling in the dynamics of perivascular stem cells and their niches." *Stem Cells Transl Med* 10(10): 1433-1445.

Perez, J. R., D. Kouroupis, D. J. Li, T. M. Best, L. Kaplan and D. Correa (2018). "Tissue engineering and cell-based therapies for fractures and bone defects." *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 6: 105.

Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." *Nucleic Acids Res* 29(9): e45.

Pignolo, R. J., S. F. Law and A. Chandra (2021). "Bone Aging, Cellular Senescence, and Osteoporosis." *JBMR Plus* 5(4): e10488.

Pittenger, M. F., A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig and D. R. Marshak (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." *Science* 284(5411): 143-147.

Sajeesh, S., T. Broekelman, R. P. Mecham and A. Ramamurthi (2020). "Stem cell derived extracellular vesicles for vascular elastic matrix regenerative repair." *Acta Biomater* 113: 267-278.

Santourlidis, S., P. Wernet, F. Ghanjati, N. Graffmann, J. Springer, C. Kriegs, X. Zhao, J. Brands, M. J. Arauzo-Bravo, R. Neves, G. Koepler and M. Uhrberg (2011). "Unrestricted somatic stem cells (USSC) from human umbilical cord blood display uncommitted epigenetic signatures of the major stem cell pluripotency genes." *Stem Cell Res* 6(1): 60-69.

Sapienza, C. (2002). "Imprinted gene expression, transplantation medicine, and the "other" human embryonic stem cell." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(16): 10243-10245.

Schira, J., H. Falkenberg, M. Hendricks, D. M. Waldera-Lupa, G. Kogler, H. E. Meyer, H. W. Muller and K. Stuhler (2015). "Characterization of Regenerative Phenotype of Unrestricted Somatic Stem Cells (USSC) from Human Umbilical Cord Blood (hUCB) by Functional Secretome Analysis." *Mol Cell Proteomics* 14(10): 2630-2643.

Schofield, R. (1978). "The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell." *Blood Cells* 4(1-2): 7-25.

Schwenzer N., E. M. (2010). "Zahn-Mund-Kiefer-Heilkunde, Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie." Georg-Thieme Verlag 4.

- Semenza, G. L. (1999). "Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1." *Annu Rev Cell Dev Biol* 15: 551-578.
- Suda, T., K. Takubo and G. L. Semenza (2011). "Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in the hypoxic niche." *Cell Stem Cell* 9(4): 298-310.
- Sun, X., X. Gao, L. Zhou, L. Sun and C. Lu (2013). "PDGF-BB-induced MT1-MMP expression regulates proliferation and invasion of mesenchymal stem cells in 3-dimensional collagen via MEK/ERK1/2 and PI3K/AKT signaling." *Cell Signal* 25(5): 1279-1287.
- Szade, K., G. S. Gulati, C. K. F. Chan, K. S. Kao, M. Miyanishi, K. D. Marjon, R. Sinha, B. M. George, J. Y. Chen and I. L. Weissman (2018). "Where Hematopoietic Stem Cells Live: The Bone Marrow Niche." *Antioxid Redox Signal* 29(2): 191-204.
- Tada, H., E. Nemoto, B. L. Foster, M. J. Somerman and H. Shimauchi (2011). "Phosphate increases bone morphogenetic protein-2 expression through cAMP-dependent protein kinase and ERK1/2 pathways in human dental pulp cells." *Bone* 48(6): 1409-1416.
- Takahashi, K. and S. Yamanaka (2006). "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors." *cell* 126(4): 663-676.
- Takino, T., L. Guo, T. Domoto and H. Sato (2013). "MT1-MMP prevents growth inhibition by three dimensional fibronectin matrix." *Biochem Biophys Res Commun* 436(3): 503-508.
- Thievensen, I., N. Fakhri, J. Steinwachs, V. Kraus, R. S. Mclsaac, L. Gao, B. C. Chen, M. A. Baird, M. W. Davidson, E. Betzig, R. Oldenbourg, C. M. Waterman and B. Fabry (2015).
- "Vinculin is required for cell polarization, migration, and extracellular matrix remodeling in 3D collagen." *FASEB J* 29(11): 4555-4567.
- Tikhonova, A. N., I. Dolgalev, H. Hu, K. K. Sivaraj, E. Hoxha, A. Cuesta-Dominguez, S. Pinho, I. Akhmetzyanova, J. Gao, M. Witkowski, M. Guillaumot, M. C. Gutkin, Y. Zhang, C. Marier, C. Diefenbach, S. Kousteni, A. Heguy, H. Zhong, D. R. Fooksman, J. M. Butler, A.
- Economides, P. S. Frenette, R. H. Adams, R. Satija, A. Tsigirigos and I. Aifantis (2019). "The bone marrow microenvironment at single-cell resolution." *Nature* 569(7755): 222-228.
- Vimalraj, S., B. Arumugam, P. J. Miranda and N. Selvamurugan (2015). "Runx2: Structure, function, and phosphorylation in osteoblast differentiation." *Int J Biol Macromol* 78: 202-208.
- Voss, P. J., A. Matsumoto, E. Alvarado, R. Schmelzeisen, F. Duttenehoefer and P. Poxleitner (2019). "Correction to: Treatment of stage II medication-related osteonecrosis of the jaw with necrosectomy and autologous bone marrow mesenchymal stem cells." *Odontology* 107(2): 269.

Wan, G., Y. Liu, J. Zhu, L. Guo, C. Li, Y. Yang, X. Gu, L. L. Deng and C. Lu (2019). "SLFN5 suppresses cancer cell migration and invasion by inhibiting MT1-MMP expression via AKT/GSK-3 β /beta-catenin pathway." *Cell Signal* 59: 1-12.

Wang, D. Y., C. Melero, A. Albaraky, P. Atherton, K. A. Jansen, A. Dimitracopoulos, F. Dajas-Bailador, A. Reid, K. Franze and C. Ballestrem (2021). "Vinculin is required for neuronal mechanosensing but not for axon outgrowth." *Exp Cell Res* 407(2): 112805.

Wei, Q., A. Holle, J. Li, F. Posa, F. Biagioni, O. Croci, A. S. Benk, J. Young, F. Noureddine, J. Deng, M. Zhang, G. J. Inman, J. P. Spatz, S. Campaner and E. A. Cavalcanti-Adam (2020). "BMP-2 Signaling and Mechanotransduction Synergize to Drive Osteogenic Differentiation via YAP/TAZ." *Adv Sci (Weinh)* 7(15): 1902931.

Wiesmann, H. P., U. Joos and U. Meyer (2004). "Biological and biophysical principles in extracorporal bone tissue engineering. Part II." *Int J Oral Maxillofac Surg* 33(6): 523-530.

Winter, M., X. N. Wang, W. Daubener, A. Eyking, M. Rae, A. M. Dickinson, P. Wernet, G. Kogler and R. V. Sorg (2009). "Suppression of cellular immunity by cord blood-derived unrestricted somatic stem cells is cytokine-dependent." *J Cell Mol Med* 13(8B): 2465-2475.

Wu, Y. F., F. L. He, Y. Q. Gu, X. S. Chen, L. Chen, L. Chen, J. Zhang and Z. G. Wang (2015). "Evaluation in vivo of autologous cell derived vein grafts based on tissue engineering concept." *Int Angiol* 34(5): 495-501.

Yamanaka, S. (2020). "Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapy-Promise and Challenges." *Cell Stem Cell* 27(4): 523-531.

Zhang, C., M. Liu, X. Wang, S. Chen, X. Fu, G. Li, N. Dong and X. Shang (2022). "Mechanism of CircANKRD36 regulating cell heterogeneity and endothelial mesenchymal transition in aortic valve stromal cells by regulating miR-599 and TGF- β signaling pathway." *Int J Cardiol* 352: 104-114.

Zhang, M., W. Yu, K. Niibe, W. Zhang, H. Egusa, T. Tang and X. Jiang (2018). "The Effects of Platelet-Derived Growth Factor-BB on Bone Marrow Stromal Cell-Mediated Vascularized Bone Regeneration." *Stem Cells Int* 2018: 3272098.

Zhang, S., R. W. S. Chan, E. H. Y. Ng and W. S. B. Yeung (2022). "Hypoxia Regulates the Self-Renewal of Endometrial Mesenchymal Stromal/Stem-like Cells via Notch Signaling." *Int J Mol Sci* 23(9).

Zhang, T., S. Lin, X. Shao, S. Shi, Q. Zhang, C. Xue, Y. Lin, B. Zhu and X. Cai (2018). "Regulating osteogenesis and adipogenesis in adipose-derived stem cells by controlling underlying substrate stiffness." *J Cell Physiol* 233(4): 3418-3428.

6 Anhang

6.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.: Zellkulturmedium. Medium zur Kultivierung der ML-USSC.

Tabelle 2.: Einfriermedium. Medium zum Einfrieren von USSC.

Tabelle 3.: Osteoblastäres Differenzierungsmedium DAG. Dieses Medium wurde zur osteoblastären Differenzierung von ML-USSC und ausgesprossenen USSC angewendet.

Tabelle 4.: Basismedium. Medium zur Kultur der Mikromassen.

Tabelle 5.: Herstellung der Agarose Platten. Eine 96-Well Platte mit konkav geformter Agarose wurde zur Herstellung der Mikromassen verwendet.

Tabelle 6.: Kernfärbung. DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) wurde zum Färben von ausgesprossenen USSC aus Mikromassen verwendet wurde.

Tabelle 7.: CyQuant® Proliferationsassay Kit. Anhand des Proliferationsassays wurde die proliferative Aktivität von ML-USSC und ausgesprossenen USSC bestimmt.

Tabelle 8.: Verwendete EDV-Programme zur Vermessung und Auswertung. Das BZII-Analyzer Keyence Programs wurde zur Ausmessung von ausgesprossenen USSC verwendet. Die restliche Datenanalyse erfolgte mit Microsoft Office.

Tabelle 9.: Geräte und Laborhilfsmittel. Diese Utensilien wurden in der experimentellen Phase der Arbeit verwendet.

Tabelle 10.: Verdünnungsreihe der Zellsuspension zur Mikromassen Herstellung. Zur Herstellung der verschiedenen Mikromassengrößen- 45Mm (45.000 Zellen) und 90Mm wurden die entsprechenden Verdünnungen der Zellsuspension angewandt.

Tabelle 11.: Thermocycler Programm der RT-PCR. Das Temperatur-Zeit-Profil des Thermocyclerprogramms zur RT-PCR (*Reverse Transcriptase* Polymerase Kettenreaktion). Die Detektion der freigesetzten Fluoreszenz erfolgte jeweils nach Step 2 in Zyklus Nummer 3. Es wurden die epigenetischen Veränderungen von Vinkulin, MT1-MMP, HIF-1 und Notch3 untersucht.

Tabelle 12.: Primer-Sequenzen der verwendeten Gene. Es wurden die Gene Vinkulin, MT1 MMP, HIF-1 und Notch3 zur Analyse des Erhalts der Stammzellnische untersucht.

Tabelle 13.: Sonden der verwendeten Gene. Die Sonden stammen aus der *Universal Probe Library*, Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim (D). Es wurden die Gene Vinkulin, MT1-MMP, HIF-1 und Notch3 zur Analyse des Erhalts der Stammzellnische untersucht.

Tabelle 14.: Zeitabhängige Mittelwerte der Aussprossdistanzen von USSC aus 45Mm. Die Mittelwerte der Aussprossdistanzen (mm) von USSC aus 45Mm in einem Zeitraum von 5 bis 16 Tagen. Die Präparate wurden mit DMEM (Kulturmedium) auf Glasobjektträger (*Chamber-Slides*) kultiviert. Es wurden der Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (STABW) für den jeweiligen Tag berechnet.

Tabelle 15.: Zeitabhängige Mittelwerte der Aussprossdistanzen von USSC aus 45Mm. Die Mittelwerte der Aussprossdistanzen (mm) der USSC aus 90Mm über einem Zeitraum von 5 bis 16 Tagen auf Glasobjektträger (*Chamber-Slides*) mit dem Kulturmedium DMEM. Es wurden der Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (STABW) für den jeweiligen Tag berechnet.

Tabelle 16.: Zeitabhängige Mittelwerte der Aussprossdistanzen von USSC aus 45Mm und 90Mm. Es wurden die Mittelwerte (MW) der Aussprossdistanzen (mm) von USSC aus 45Mm und 90Mm über einen Zeitraum von 5 bis 16 Tagen gemessen. Die Präparate wurden mit dem Kulturmedium DMEM auf Glasobjektträger (*Chamber Slides*) kultiviert. Die statistische Auswertung mit dem *student's t-test* bei zweiseitiger Hypothese und einem konstanten Signifikanzniveau von $\alpha < 0,05$. Mm= Mikromassen.

Tabelle 17.: Statistische Auswertung des Zuwachses der Zellzahl mit DMEM. Es wurden die Mittelwerte der absoluten Zellzahl pro Well ($1,9 \text{ cm}^2$) nach 11 Tagen Kultur mit DMEM anhand eines Proliferationsassays gemessen. Untersucht wurden ausgesprossste USSC aus 45Mm und 90Mm sowie ML-USSC als Kontrollgruppe. Es wurden $n = 12$ Versuche durchgeführt. Die statistische Auswertung mit dem *student's t-test* erfolgte bei zweiseitiger Hypothese und einem Signifikanzniveau von $\alpha < 0,05$. MW= Mittelwert, STABW= Standardabweichung, ausgespr. USSC = ausgesprossste USSC, ML-USSC= Monolayerkultivierte USSC, Mm = Mikromassen. DMEM = Kulturmedium.

Tabelle 18.: Gemessen wurde der Mittelwert der absoluten Zellzahl pro Well (1,9 cm²) nach 11 Tagen Kultur mit DAG (Dexamethason, Ascorbinsäure, Beta-Glycerolphosphat). DAG ist ein osteoblastäres Differenzierungsmedium. Es wurden ausgesprossste USSC von 45Mm und 90Mm sowie ML-USSC als Kontrollgruppe untersucht. Es wurden n = 12 Versuche durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem *student's t-test* bei zweiseitiger Hypothese und einem Signifikanzniveau von $\alpha < 0,05$. MW = Mittelwert, STABW = Standardabweichung, ausgespr. USSC = ausgesprossste USSC, ML-USSC= Monolayerkultivierte USSC, Mm= Mikromassen.

Tabelle 19.: Statistische Auswertung des Zuwachses der Zellzahl mit DMEM oder DAG. Gemessen wurde die Zellzahl pro Well (= 1,9 cm²) nach 11 Tagen Kultur mit osteoblastären Differenzierungsmedium (DAG) oder dem Kulturmedium (DMEM). Es wurden die Mittelwerte (MW) der Zellzahl pro Well ermittelt. Untersucht wurden ausgesprossste USSC aus Mikromassen der Größe 45Mm (ausgespr. USSC aus 45Mm), 90Mm (ausgespr. USSC aus 90Mm) sowie monolayerkultivierte USSC (ML-USSC) als Kontrollgruppe. Es wurden n = 12 Versuche durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem *student's t-test* bei zweiseitiger Hypothese und einem Signifikanzniveau von $\alpha < 0,05$. MW= Mittelwert, MW-Differenz = Mittelwert-Differenz, ML-USSC = Monolayerkultivierte USSC, Mm= Mikromassen.

Tabelle 20.: Statistische Auswertung der Mineralisierung mit DMEM. Gemessen wurde die Fluoreszenz von gebundenen Hydroxylapatit-Kristallen (RFU pro Well) nach 11 Tagen Kultur mit DMEM. Es wurden ausgesprossste USSC aus 45Mm und 90Mm sowie ML-USSC als Kontrollgruppe untersucht. Es wurden n = 12 Versuche durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem *student's t-test* bei zweiseitiger Hypothese und einem Signifikanzniveau von $\alpha < 0,05$. MW = Mittelwert, STABW = Standardabweichung, ausgespr. USSC = ausgesprossste USSC, ML-USSC= Monolayerkultivierte USSC, Mm= Mikromassen. DMEM= Kulturmedium

Tabelle 21.: Statistische Auswertung der Mineralisierung mit DAG. Gemessen wurde die Fluoreszenz von gebundenen Hydroxylapatit-Kristallen (RFU pro Well) nach 11 Tagen Kultur mit DAG (Dexamethason, Ascorbinsäure, Beta-Glycerolphosphat). Es wurden ausgesprossste USSC aus 45Mm und 90Mm sowie ML-USSC als Kontrollgruppe untersucht. Es wurden n = 12 Versuche durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem *student's t-Test* bei zweiseitiger Hypothese und einem Signifikanzniveau von $\alpha < 0,05$. MW = Mittelwert, STABW = Standardabweichung, ausgespr. USSC = ausgesprossste USSC, ML-USSC= Monolayerkultivierte USSC, Mm = Mikromassen.

Tabelle 22.: Statistische Auswertung der Mineralisierung mit DMEM oder DAG.

Gemessen wurde die Mittelwerte (MW) der Fluoreszenz von gebundenen Hydroxylapatit-Kristallen (RFU pro Well) nach 11 Tagen Kultur mit dem osteoblastären Differenzierungsmedium DAG (Dexamethason, Ascorbinsäure, Beta-Glycerolphosphat). Es wurden ausgesprossene USSC aus 45Mm und 90Mm sowie ML-USSC als Kontrollgruppe untersucht. Insgesamt wurden n = 12 Versuche durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem *student's t-test* bei zweiseitiger Hypothese und einem Signifikanzniveau von $\alpha < 0,05$. MW = Mittelwert, MW-Differenz= Mittelwert-Differenz, DMEM= Kulturmedium, ML-USSC = Monolayerkultivierte USSC, Mm= Mikromassen.

Tabelle 23.: Die relative Mineralisierung pro 10² Zellen mit DMEM oder DAG.

Gemessen wurde die relative Mineralisierung der Fluoreszenz von gebundenen Hydroxylapatit-Kristallen (RFU pro 10² Zelle nach 11 Tagen Kultur mit osteoblastären Differenzierungsmedium DAG (Dexamethason, Ascorbinsäure, Beta-Glycerolphosphat oder DMEM (Kulturmedium)). Es wurden ausgesprossene USSC aus 45Mm und 90Mm sowie ML-USSC als Kontrollgruppe untersucht. Insgesamt wurden n = 12 Versuche durchgeführt. Es zeigte sich eine gesteigerte Mineralisierung der Zell-Matrix insbesondere in ausgesprossenen USSC. Ausgespr. USSC = ausgesprossene USSC, ML-USSC = Monolayerkultivierte USSC, Mm= Mikromassen.

Tabelle 24.: Genexpression von Vinkulin. Hier wurden USSC aus 45Mm, ausgesprossene USSC aus 45Mm und 90Mm im Vergleich zu ML-USSC als Kontrollgruppe untersucht. Es wurden n = 3 Versuche durchgeführt. ML-USSC= Monolayerkultivierte USSC, Mm = Mikromassen.

Tabelle 25.: Genexpression von MT1-MMP. USSC aus 45Mm sowie ausgesprossene USSC aus 45Mm und 90Mm wurden im Vergleich zu ML-USSC als Kontrollgruppe untersucht. Es wurden n $\geq$ 3 Versuche durchgeführt. ML-USSC= Monolayerkultivierte USSC, Mm = Mikromassen.

Tabelle 26.: Genexpression von HIF-1. Hier wurden USSC aus 45Mm sowie ausgesprossene USSC aus 45Mm und 90Mm im Vergleich zu ML-USSC als Kontrollgruppe untersucht. Es wurden n = 3 Versuche durchgeführt. ML-USSC= Monolayerkultivierte USSC, Mm = Mikromassen.

Tabelle 27.: Genexpression von Notch3. USSC aus 45 Mikromassen (45Mm), ausgesprossene USSC aus Mikromassen der Größe 45Mm und 90Mm wurden im Vergleich

zu ML-USSC als Kontrollgruppe untersucht. Es wurden n = 3 Versuche durchgeführt. ML-USSC= Monolayerkultivierte USSC, Mm = Mikromassen.

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abb.1.: Differenzierungspotenzial von Stammzellen. USSC gelten als pluripotente Stammzell-Linie. Modifiziert nach Berdasco et. al (Berdasco and Esteller 2011).

Abb.2: Versuchs-Schema. Anfertigung der Mikromassen in 96-Well Platten. Nach 24h erfolgte das Umsetzen auf *Chamber-Slides* für die DAPI-Färbung oder zum Aussprossen für 7 Tage in Petrischalen mit Medium. Nach Entfernung der Mikromassen erfolgte die RNA-Isolation zur cDNA-Synthese des ausgesprossenen Zellrasens. Die cDNA wurde zur RT-PCR Analyse (Reverse Transcriptase Polymerase Ketten- reaktion) verwendet. Zellen des ausgesprossenen Zellrasens wurden für 10 Tage auf 24-Well Platten ausgesät zur Analyse der Proliferation mit dem CyQuant® Cell Proliferationsassay Kit® und der Mineralisation mit dem OsteoImage™ Mineralisierungsassay.

Abb.3: Versuchsschema der ausgesprossenen Zellen. USSC-Mikromassen werden in einer 96-Well Agarose-Platte innerhalb von 24h geformt. Danach erfolgt ein Umsetzen der fertigen Mikromassen auf Petrischalen. Es erfolgt eine Kultivierung für 7 Tage mit DMEM. Die Ablösung der Mikromassen erfolgt durch Trypsin. Anschließend wird der Zellrasen gelöst. Die ausgesprossenen Zellen werden zur Proliferations- und Mineralisierungs-Analyse sowie zur Kryokonservierung genutzt. Die kryokonservierten Zellen wurden weiter zur RNA-Isolation verwendet.

Abb.4.: Versuchsaufbau des Ausspross-Versuchs. Initial erfolgte die Herstellung der USSC-Mikromassen auf den Agarose-Well Platten. Es wurden Mikromassen der Größen 45Mm und 90Mm verwendet. Nach 24h konnten die Mikromassen geerntet und auf die Glas-*Chamber-Slides* umgesetzt werden. Nach einer definierten Kulturdauer von 5, 6, 8, 9, 11, 12, 14 und 16 Tagen erfolgte die DAPI-Färbung zur Darstellung des ausgesprossenen Zellrasens. Die Aussprossdistanz konnte mithilfe des BZ-9000E KEYENCE- Mikroskops bei 40-facher Vergrößerung fotografiert und mithilfe des BZII-Analyzer Keyence Programms vermessen werden.

Abb.5.: Versuchsaufbau zur Untersuchung des osteoblastären Differenzierungspotenzials. Es wurden ML-USSC, ausgesprossene USSC aus 45Mm und 90Mm auf die Bildung einer mineralisierten Matrix untersucht. Die jeweiligen

Versuchsgruppen wurden mit osteoblastären Differenzierungsmedium (DAG) oder mit Kulturmedium (DMEM) für 11 Tage auf 24-Well Platten kultiviert. Die Analyse der mineralisierten Matrix erfolgte durch das OsteoImage™ Mineralisationsassay. Hier wird ein Hydroxylapatit-spezifisch bindendes Peptid verwendet, das an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Die Messung der Fluoreszenz der eingefärbten Hydroxylapatit-Kristalle wurde anhand des Fluorometers GENios mit einer Exzitationswellenlänge von 485nm und einer Emissionswellenlänge von 535nm über einen Integrationszeitraum von 30µs von der offenen Wellseite der Messplatte durchgeführt.

Abb.6.: Versuchsaufbau zur Untersuchung der Proliferationskapazität. Es wurden ausgesprossene USSC aus 45Mm und 90Mm auf die Proliferationsfähigkeit im Vergleich zu monolayerkultivierten USSC untersucht. Es wurden bei einer Aussaat von 10.000 Zellen pro cm² kumulativ 19.000 Zellen pro Well einer 24-Well Platte je mit osteoblastären Differenzierungsmedium (DAG) oder mit dem Kulturmedium (DMEM) für weitere 11 Tage kultiviert. Die Zunahme des DNA-Gehalts bzw. der Zellzahl wurde nach 11 Tagen mithilfe des CyQuant®-Assays bestimmt. Durch die Bindung eines Fluoreszenzfarbstoffes an freigesetzte Nukleinsäuren konnte mit dem Fluorometer GENios die Fluoreszenz-Werte der Proben ermittelt werden. Die Messung erfolgte bei einer Exzitations-Wellenlänge von 485nm und einer Emissions-Wellenlänge von 535nm über einen Zeitraum von 20µs integriert.

Abb.7.: Kalibrierungskurve. Ein Beispiel einer Kalibrierungskurve mit USSC. Der gemessene Fluoreszenzwert wird einer definierten Zellzahl zugeordnet. Mithilfe der linearen Gleichung können den gemessenen Fluoreszenzwerten der Versuchsgruppen eine Zellzahl zugeordnet werden.

Abb. 8.: Aussprossdistanzen von USSC aus 45Mm. Die Mittelwerte der Aussprossdistanzen (mm) wurden über einen Kulturzeitraum von 5 bis 16 Tagen gemessen. Die Kultivierung erfolgte mit dem Kulturmedium DMEM auf Glasobjektträgern (*Chamber-Slides*). Im Rahmen der Standardabweichungen konnte ein linearer Zuwachs der Aussprossdistanz beobachtet werden.

Abb.9.: Aussprossende 45Mm nach 8 Tagen. Beispiel aussprossender USSC aus einer 45Mm nach 8 Tagen auf einem Glasobjektträger (*Chamber-Slides*) mit dem Kulturmedium DMEM. Der Mittelwert der Aussprossdistanzen betrug zu diesem Zeitpunkt 4,56 mm ± 1,85 mm vom Mikromassen-Ursprung. Die Färbung erfolgte mit dem fluoreszierenden Kernfarbstoff DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol). Die Messung erfolgte bei 40-facher Vergrößerung.

Abb.10: Aussprossdistanzen von USSC aus 90Mm. Der Mittelwert der Aussprossdistanz (mm) wurde in einem Zeitraum von 5 bis 16 Tagen gemessen. Die Kultivierung erfolgte mit dem Kulturmedium DMEM auf Glasobjektträger (*Chamber-Slides*). Es zeigt sich im Rahmen der Standardabweichungen eine lineare zeitabhängige Aussprossdistanz. Am Endpunkt (16 Tagen) konnte ein Mittelwert der Aussprossdistanzen von $8,97\text{mm} \pm 1,59\text{mm}$ (SD) vom Mikromassen-Ursprung gemessen werden.

Abb. 11.: Aussprossende 90Mm nach 5 Tagen. Beispiel einer aussprossenden 90Mm nach 5 Tagen auf Glasobjektträgern (*Chamber-Slides*) mit dem Kulturmedium DMEM. Das Präparat wurde anschließend mit der fluoreszierenden Kernfärbung DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) behandelt. Zu diesem Zeitpunkt konnte ein Mittelwert der Aussprossdistanzen von $3,91\text{mm} \pm 0,81\text{mm}$ gemessen werden. Die Messung erfolgte bei 40-facher Vergrößerung.

Abb. 12.: Mittelwerte der Aussprossdistanzen von USSC aus 45Mm und 90Mm. Der Vergleich der Mittelwerte von Aussprossdistanzen (mm) der 45Mm und 90Mm. Über 5 bis 16 Tagen erfolgte eine Kultivierung auf Glasobjektträgern (*Chamber-Slides*) mit DMEM. Nach statistischer Auswertung mit dem *student's t-test* zeigte sich bei zweiseitiger Hypothese und einem Signifikanzniveau von $\alpha < 0,05$, ein signifikanter Unterschied der Aussprossdistanzen an Tag 8,9 und 12, gekennzeichnet durch (*). Mm = Mikromassen.

Abb. 13.: Die Proliferation von ausgesprossenen USSC aus 45Mm und 90Mm sowie ML-USSC nach 11 Tagen Kultur mit DMEM. Es wurde die absolute Zellzahl pro Well ($1,9\text{ cm}^2$) nach 11 Tagen Kultur mit DMEM ermittelt. Es wurden ausgesprossene USSC aus 45Mm und 90Mm sowie ML-USSC als Kontrollgruppe untersucht. Insgesamt wurden $n = 12$ Versuche durchgeführt. Die statistische Auswertung mit dem *student's t-test* erfolgte bei zweiseitiger Hypothese und einem Signifikanzniveau von $\alpha < 0,05$. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied der absoluten Zellzahl von ML-USSC zu ausgesprossenen USSC beider Mikromassengrößen gekennzeichnet durch (*). ML-USSC = Monolayerkultivierte USSC, Mm = Mikromassen.

Abb. 14.: Die Proliferation von ausgesprossenen USSC aus 45Mm und 90Mm sowie ML-USSC nach 11 Tagen Kultur mit DAG. Es wurden die Mittelwerte der absoluten Zellzahl pro Well ($1,9\text{ cm}^2$) nach 11 Tagen Kultur mit DAG (Dexamethason, Ascorbinsäure, Beta-Glycerolphosphat) gemessen. DAG regt die Mineralisierung der extrazellulären Zellmatrix von USSC an. Die untersuchten Gruppen stellten sich aus ausgesprossenen USSC aus 45Mm und 90Mm sowie ML-USSC als Kontrollgruppe zusammen. Es wurden n

= 12 Versuche durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem *student's t-test* erfolgte bei zweiseitiger Hypothese und einem Signifikanzniveau von $\alpha < 0,05$. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen ausgesprossenen USSC beider Mikromassengrößen und den ML-USSC, gekennzeichnet mit (*). ML-USSC = Monolayerkultivierte USSC, Mm= Mikromassen.

Abb.15.: Vergleich der Proliferation nach 11 Tagen Kultur mit DAG oder DMEM.

Gegenübergestellt wurden die Mittelwerte der absoluten Zellzahl pro Well ($1,9 \text{ cm}^2$) nach 11-tägiger Kultur mit osteoblastärem Differenzierungsmedium (DAG) oder dem Kulturmedium (DMEM). Die Versuchsgruppen stellten sich aus ausgesprossenen USSC von 45Mm und 90Mm sowie ML-USSC zusammen. Es wurden $n = 12$ Versuche durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem *student's t-test* bei zweiseitiger Hypothese und einem konstanten Signifikanzniveau von $\alpha < 0,05$. Nur bei den ML-USSC konnte signifikanter Unterschied eruiert werden, gekennzeichnet durch (*). MW = Mittelwert, ML-USSC = Monolayerkultivierte USSC, Mm= Mikromassen.

Abb.16.: Die osteoblastäre Mineralisierung der EZM ausgesprossener USSC aus 45Mm und 90Mm sowie ML-USSC mit DMEM. Gemessen wurde die Fluoreszenz von gebundenen Hydroxylapatit-Kristallen (RFU pro Well) nach 11 Tagen Kultur mit DMEM (Kulturmedium). Es wurden ausgesprossene USSC aus 45Mm und 90Mm sowie ML-USSC als Kontrollgruppe untersucht. Es wurden $n = 12$ Versuche durchgeführt. Ausgesprossene USSC der 45Mm zeigten eine signifikant stärkere Mineralisierung der EZM als die ML-USSC, gekennzeichnet durch (*). Zur statistischen Auswertung wurde der *student's t-test* bei zweiseitiger Hypothese und einem Signifikanzniveau von $\alpha < 0,05$ verwendet. ML-USSC = Monolayerkultivierte USSC, Mm= Mikromassen.

Abb.17: Die osteoblastäre Mineralisierung der EZM ausgesprossener USSC aus 45Mm und 90Mm sowie ML-USSC mit DAG. Gemessen wurde die Fluoreszenz von gebundenen Hydroxylapatit-Kristallen (RFU pro Well) nach 11 Tagen Kultur mit DAG (osteoblastäres Differenzierungsmedium). Es wurden ausgesprossene USSC aus 45Mm und 90Mm sowie ML-USSC als Kontrollgruppe untersucht. Es wurden $n = 12$ Versuche durchgeführt. Für ausgesprossene USSC der 45Mm ergab sich eine signifikant höhere Mineralisierung der EZM verglichen zu den ML-USSC, gekennzeichnet durch (*). Zur statistischen Auswertung wurde der *student's t-test* bei zweiseitiger Hypothese und einem Signifikanzniveau von $\alpha < 0,05$ angewendet. ML-USSC = Monolayerkultivierte USSC, Mm= Mikromassen.

Abb. 18.: Vergleich der Mineralisierung der EZM nach 11-tägiger Kultur mit DMEM oder DAG. Es wurden die Mittelwerte (MW) der Fluoreszenz von gebundenen

Hydroxylapatit-Kristallen (RFU pro Well) nach 11 Tagen Kultur mit dem osteoblastären Differenzierungsmedium DAG (Dexamethason, Ascorbinsäure, Beta-Glycerolphosphat). Es wurden ausgesprossene USSC aus 45Mm und 90Mm sowie ML-USSC als Kontrollgruppe untersucht. Insgesamt wurden n = 12 Versuche durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem *student's t-test* bei zweiseitiger Hypothese und einem Signifikanzniveau von $\alpha < 0,05$. Hier fiel ein signifikant höherer Mineralisierungsgehalt der EZM aller Versuchsgruppen nach 11-tägiger Kultur mit DAG auf. ML-USSC= Monolayerkultivierte USSC, Mm= Mikromassen, DMEM= Kulturmedium.

Abb.19.: Relative Mineralisierung pro 10^2 Zellen mit DMEM oder DAG. Gemessen wurde die Fluoreszenz von gebundenen Hydroxylapatit-Kristallen (RFU pro 10^2 Zellen) nach 11 Tagen Kultur mit osteoblastären Differenzierungsmedium DAG (Dexamethason, Ascorbinsäure, Beta-Glycerolphosphat) oder DMEM (Kulturmedium). Es wurden ausgesprossene USSC aus 45Mm und 90Mm sowie ML-USSC als Kontrollgruppe untersucht. Insgesamt wurden n = 12 Versuche durchgeführt. Es zeigte sich eine gesteigerte Mineralisierung der Zell-Matrix insbesondere in ausgesprossenen USSC. ML-USSC = Monolayerkultivierte USSC, Mm= Mikromassen.

Abb. 20.: Die x-fache Expressionsänderung von Vinkulin in ML-USSC. USSC aus 45Mm, ausgesprossenen USSC aus 45Mm und 90Mm wurden im Vergleich zu ML-USSC als Kontrollgruppe untersucht. Es wurden n = 3 Versuche durchgeführt. Ausgespr. USSC = ausgesprossene USSC, Mm= Mikromassen.

Abb. 21.: Die x-fache Expressionsänderung von MT1-MMP in ML-USSC. Hier wurden USSC aus 45Mm sowie ausgesprossene USSC aus 45Mm und 90Mm im Vergleich zu ML-USSC als Kontrollgruppe untersucht. Es wurden n = 3 Versuche durchgeführt. USSC der 45Mm wiesen eine 3-fache Reduktion der MT1-MMP-Genexpression auf. Ausgespr. USSC= ausgesprossene USSC, ML-USSC= Monolayerkultivierte USSC, Mm = Mikromassen.

Abb.22.: Die x-fache Expressionsänderung von HIF-1 in ML-USSC. Hier wurden USSC aus 45Mm sowie ausgesprossene USSC aus 45Mm und 90Mm im Vergleich zu monolayerkultivierten USSC als Kontrollgruppe untersucht. Es wurden n = 3 Versuche durchgeführt. Es bestand keine Änderung der Genexpression im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ausgespr. USSC= ausgesprossene USSC, ML-USSC= Monolayerkultivierte USSC, Mm = Mikromassen.

Abb. 23.: Die x-fache Expressionsänderung von Notch3 in ML-USSC. Hier wurden USSC aus 45Mm sowie ausgesprossene USSC aus 45Mm und 90Mm im Vergleich zu monolayerkultivierten USSC als Kontrollgruppe untersucht. Es wurden $n \geq 3$ Versuche durchgeführt. Es bestand keine Änderung der Genexpression im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ausgespr. USSC= ausgesprossene USSC, ML-USSC= Monolayerkultivierte USSC, Mm = Mikromassen.

6.3 Danksagung

An erster Stelle möchte ich einen großen Dank an Frau Prof. Dr. Rita Depprich aus der Klinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie, aussprechen für ihr außerordentliches Engagement und ihre wertvolle wissenschaftliche Betreuung bei der Anfertigung dieser Dissertation. Ein weiterer besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Norbert Kübler, Direktor der Klinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie, für die Möglichkeit zur Ausarbeitung dieses Themas sowie der Unterstützung und wissenschaftlichen Betreuung insbesondere in der experimentellen Phase und bei der Poster-Präsentation auf dem MKG-Kongress in Hamburg (Juni 2016). Zudem möchte ich mich auch ausdrücklich bei Herrn Prof. Dr. Norbert Kübler bedanken für die zur Verfügung gestellten Räumlichkeiten, Materialien und Utensilien des Forschungslabors der Klinik für Mund-, Kiefer- und Plastischen Gesichtschirurgie.

Insbesondere bei Frau Prof. Dr. Gesine Kögler, Leiterin der José Carreras Stammzellbank (Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika), möchte ich mich für die zur Verfügung gestellten humanen Nabelschnurblutstammzellen (USSC) bedanken.

Ein außerordentliches und großes Dankeschön geht an Frau Dr. Karin Berr, die mich durchgehend unterstützte. Sie erwies sich als unermüdlich bei meiner Einarbeitung in Arbeitsabläufe und Labortechniken. Ihr stetiger Enthusiasmus trotz Rückschlägen und kleinerer Pannen immer weiterzumachen, half mir sehr durch die experimentelle Phase der Arbeit. Auch bei den später anfallenden Korrekturen stand sie mir stets für Fragen und den wissenschaftlichen Austausch zur Seite, der mir wertvolle Erkenntnisse erbrachte. Bei der Posterpräsentation auf dem MKG-Kongress im Juni 2016 in Hamburg, verhalf sie mir durch außerordentlich gute Vorbereitung und emotionale Unterstützung bei der erfolgreichen Präsentation meines Posters.

Des Weiteren gilt ein großer Dank dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Jürgen Scheller, für das Vertrauen und die freundliche Bereitstellung des BZ-9000E KEYENCE Mikroskops und des BZII-Analyzer Keyence Programms zur Durchführung des Aussprossversuchs.

Auch bei dem Forschungsteam der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Nikolas Stoecklein möchte ich

mich für die Unterstützung bei der Bereitstellung von Laborgeräten und Utensilien bedanken.

Ein weiteres Dankeschön geht an Frau Marianne Hölbling für die Unterstützung und ihre Hilfsbereitschaft bei Fragen zur Laborabläufen.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meiner Mutter bedanken für die vielen, vielen Ermutigungen und das große Engagement insbesondere beim Korrekturlesen. Ihre große Förderung und Unterstützung haben sowohl zur Fertigstellung dieser Dissertation als auch zu meinem bisherigen Werdegang maßgeblich beigetragen.

Danke!