Aus der Medizinischen Klinik I der Universität zu Lübeck Direktor: Professor Dr. H. Lehnert

Isolation und Charakterisierung adulter mesenchymaler Stromazellen aus murinem Nierengewebe und Modulation der renalen Differenzierung embryonaler Stammzellen der Maus.

> Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Universität zu Lübeck

- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von Johannes Wolfgang Osbahr geb. Waldmann aus Schwerin

Lübeck 2012

- 1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med Jan Kramer
- 2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Ralf Paus

Tag der mündlichen Prüfung: 21.08.2012

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 21.08.2012

- Promotionskommission der Sektion Medizin -

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1 1.2	Ablauf des akuten Nierenversagens Mesenchymale Stromazellen	1 2
1.3	Reparative Vorgänge nach einem akuten Nierenversagen	2
1.3.1 1.3.2	Rolle mesenchymaler Zellen bei Reparaturvorgängen in der Niere Rolle epithelialer Zellen bei Reparaturvorgängen in der Niere	2 4
1.4	Erythropoietin als renoprotektiver Mediator	4
1.5	Die Nephrogenese während embryonaler Entwicklungsvorgänge	5
1.6	Embryonale Stammzellen als <i>in vitro</i> Modell von	
1.7	Differenzierungsvorgängen Fragestellung	6 8
2	Material und Methoden	9
2.1	Material	9
2.1.1	Versuchstiere und Zellen	9
2.1.2	Chemikalien und Reagenzien	9
2.1.3	Antikörper	9
2.1.4	Primer und Sonden	10
2.1.5	Geräte	10
2.1.6	Verbrauchsmaterialien	10
2.1.7	Zellkulturmedien	10
2.1.7.1	Medien (MSC-Versuche)	10
2.1.7.2	Medien (ES-Zell-Versuche)	10
2.1.8	Puffer und Lösungen	11
2.1.8.1	Puffer und Lösungen (MSC-Versuche)	11
2.1.8.2	Puffer und Lösungen (ES-Zell-Versuche)	11

2.2	Mesenchymale Zellen	12	
2.2.1	Isolation muriner, mesenchymaler Zellen aus verschiedenen Organen	12	
2.2.1.1	Präparation der Maus zur Gewinnung mesenchymaler Zellen	12	
2.2.1.2	Isolation muriner mesenchymaler Zellen aus Nieren, Lungen und Dickdarm	13	
2.2.1.3	Isolation muriner mesenchymaler Zellen aus Knochenmark	14	
2.2.1.4	Isolation muriner Fibroblasten aus Bauchhaut	14	
2.2.2	Kultivierung der mesenchymalen Zellen	15	
2.2.2.1	Passagieren	15	
2.2.2.2	Bestimmung der Zellzahl	15	
2.2.2.3	Kryokonservierung	16	
2.2.3	Analyse der Colony-Forming-Unit-Fibroblasts	16	
2.2.4	Analyse der Proliferation unter Normoxie und Hypoxie (2% O ₂)	16	
2.2.5	Analyse der Telomeraseaktivität	17	
2.2.6	Bestimmung von Proteinmengen mit dem Bradford Protein Test	19	
2.2.7	Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenmarkermoleküle	20	
2.2.8	Differenzierung von mesenchymalen Zellen aus Niere und Knochenmark	21	
2.2.8.1	Differenzierung in Knochenzellen	21	
2.2.8.2	Differenzierung in Fettzellen	22	
2.2.8.3	Differenzierung in Knorpelzellen	22	
2.2.9	Optimierung von Fixierungstechniken für GFP ⁺ Zellen	23	
2.3	Embryonale Stamm (ES)-Zellen (ESC)	24	
2.3.1	ES-Zell-Kultur	24	
2.3.1.1	Beschichtung des ES-Zellkulturmaterials mit Gelatine	24	
2.3.1.2	Wachstumsgrundlage für ESC	24	
2.3.1.3	Passagieren von ESC	25	
2.3.1.4	Bestimmung der ESC-Zellzahl	25	
2.3.1.5	Kryokonservierung der ESC	25	
2.3.1.6	Differenzierung von ESC via Embryoid Bodies (EBs)	25	
2.3.1.7	Kultivierung von EBs mit verschiedenen Wachstumsfaktoren	26	
2.3.2	Differenzierung von EBs in einer Perfusionskultur	27	
2.4	Färbungen	28	
2.4.1	Alkalische Phosphatase-Färbung	28	
2.4.2	Sudan III + HE Färbung	28	
2.4.3	Immunfluoreszenzfärbungen	29	
2.4.4	Anfertigung von Gefrierschnitten der MMB	29	
2.4.5			
	isolierter Zellen aus Nieren und Bauchhaut	30	
2.4.6	Konservierung von Präparaten	31	

2.5	Analyse der Genexpression	31	
2.5.1	RNA-Isolation	31	
2.5.2	Reverse Transkription	32	
2.5.3	Polymerase-Ketten-Reaktion	33	
2.5.4	Elektrophoretische Analyse der PCR-Amplifikate	33	
2.5.5	Analyse der EPO-Expression unter Normoxie und Hypoxie (2% O ₂)	34	
2.5.5.1	mRNA-in situ-Hybridisierung zum Nachweis von EPO	34	
2.5.5.2	DNA-Sequenzierung	36	
2.5.5.3	Realtime quantitative RT-PCR	36	
2.6	Statistische Auswertung	38	
3	Ergebnisse	39	
3.1	Isolation und Charakterisierung mesenchymaler Stromazellen der M	Iaus 39	
3.1.1	Die Isolation mesenchymaler Stromazellen aus Niere, Lunge, Darm		

5.1.1	Die isolation mesenenymater Stromazenen aus Friere, Dange, Dan	
	und Knochenmark ist möglich.	39
3.1.2	Plastikadhärente Zellen aus Niere, Lunge, Darm und Knochenmark bilden	
	Colony-Forming-Unit-Fibroblasts	39
3.1.3	Plastikadhärente Zellen aus Niere, Lunge, Darm und KM sowie	
	Haut-Fibroblasten lassen sich durch Analyse der Morphologie	
	nicht sicher voneinander unterscheiden.	40
3.1.4	Zellen aus Niere, Lunge, Darm und KM sowie Haut-Fibroblasten weisen in	
	Normoxie eine höhere Proliferationsrate als in Hypoxie auf.	42
3.1.5	Plastikadhärente Zellen aus Niere, Lunge, Darm und KM sowie	
	Haut-Fibroblasten verfügen über Telomeraseaktivität.	43
3.1.6	Plastikadhärente Zellen aus Niere, Lunge, Darm und KM sowie	
	Haut-Fibroblasten lassen sich durch Analyse der Oberflächenmarker	
	voneinander unterscheiden.	44
3.1.7	Native mesenchymale renale Zellen lassen sich mit Hilfe von	
	Immunfloureszenzfärbungen und RT-PCR von Haut-Fibroblasten abgrenzen	. 46
3.1.8	Isolierte Zellen der Niere und des KM zeigen eine eingeschränkte adipogene	,
	chondrogene und osteogene Differenzierungsfähigkeit.	47
3.2	Analyse der EPO-Produktion renaler Zellen	49
3.2.1	Die Expression von <i>epo</i> kann in renalen Zellen mit Hilfe von gRT-PCR	
	nachgewiesen werden.	49
3.2.2	Die Anwendung einer EPO mRNA-in situ-Hybridisierung ergibt bei den	_

isolierten renalen Zellen keinen positiven Nachweis von EPO. 51

3.3 Optimierung der Zellfixierung zur Signalkonservierung von GFP	51
---	----

3.4	Differenzierung von ES-Zellen zu renalen Progenitorzellen in vitro	52
3.4.1	EBs exprimieren Marker der Nierenzelldifferenzierung.	53
3.4.2	Der Zusatz von Wachstumsfaktoren zum Standardmedium kann die renale	
	Differenzierung von EBs verstärken.	54
3.4.3	Die Kultivierung der ESC in einer Perfusionskultur führt nicht zu einer	
	verstärkten renalen Differenzierung von EBs.	58
4.	Diskussion	60
4.1	Isolation und Charakterisierung mesenchymaler Stromazellen (MSC)	60
4.1.1	Eine Isolation multipotenter mesenchymaler Stromazellen ist möglich.	60
4.1.2	Zellen verschiedenen Ursprunges zeigen unterschiedliche Phänotypen	
	in vitro.	61
4.1.3	In vitro lässt sich nur eine geringe epo-Expression durch renale Zellen	
	nachweisen.	62
4.2	Differenzierung von ESC zu renalen Vorläuferzellen in vitro	65
4.2.1	ESC der Linie D3 differenzieren spontan zu renalen Progenitorzellen	
	in vitro	65
4.2.2	Die Applikation von Wachstumsfaktoren beeinflusst die renale Differenzieru	ıng
	von ES-Zellen in vitro.	67
4.2.3	Ein kontinuierlicher Mediumfluss hemmt die renale Differenzierung in EBs.	68
5.	Zusammenfassung	70
6.	Literaturverzeichnis	72
7.	Anhang	
7.1	Tabellen und Abbildungen	Ι
7.2	Danksagung X	VIII
7.3	Curriculum vitae	XIX
7.4	Posterpräsentationen	XX

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ANV	Akutes Nierenversagen
AMP	Adenosin-Mono-Phosphat
BMSC	Multipotente mesenchymale Stromazelle des Knochenmarks
BrdU	5'-Bromo-2'deoxy-Uridin
BSA	Bovines Serumalbumin
CBBG	Coomassie-Brillant-Blau G-250
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	komplementäre DNA
CFU/-F	Colony-Forming-Unit/-Fibroblast
d	Tag
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxynukleinsäure
EB	Embryoid Body
EGF	Endothelial Growth Fractor
ELISA	Enzyme Linked Immune Sorbent Assay
EPO	Erythropoietin
EPOR	Erythropoietinrezeptor
ESC/ES-Zelle	Embryonale Stammzelle
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FGF	Fibroblast Growth Factor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
GFP	Green Fluorescent Protein
HLA	Human Leukocyte Antigen
HOX	Hypoxie
KM	Knochenmark
LIF	Leukemia Inhibiting Factor
MET	Mesenchyme to Epithel Transition
ME-Zellen	Murine Embryonale Fibroblasten
MMB	MicroMassBody
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
MSC	Mesenchymale multipotente Stromazelle
NOX	Normoxie
pc	post conceptionem
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PPAR	Peroxisome Proliferation-Activated Receptor
qRT-PCR	quantitative Polymerasekettenreaktion nach RT
RA	Retinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	PCR nach RT
Tab.	Tabelle
TGF	Transforming Growth Factor
TRAP	Telomerase Repeat Amplification Protocol
VEGF	Vascular Endothelial GrowthFactor
vs.	versus

1 EINLEITUNG

1.1 Ablauf des akuten Nierenversagens

Das akute Nierenversagen (ANV) spielt im klinischen Alltag eine große Rolle. Insgesamt sind von diesem Krankheitsbild 1-5% der hospitalisierten Patienten und sogar fast ein Viertel der Intensivpatienten betroffen [1, 2].

Das ANV ist definiert durch eine im Grunde reversible Abnahme der Nierenfunktion durch eine prä-, intra- oder postrenale Ursache unterschiedlicher Ätiologie. Pathophysiologisch steht die ischämische Schädigung im Vordergrund, welche mit dem Verlust von Tubulusepithelzellen, vorwiegend im proximalen Tubulus im äußeren Mark [3], und mit einer Entzündungsreaktion einhergeht (Abb. 1) [1, 4].



Abbildung 1: Ablauf des akuten Nierenversagens

Bei normaler Nierenfunktion (A) fließt im Tubuluslumen Harn, aus welchem Stoffe und Wasser über die Mikrovilli der Tubulusepithelzellen rückresorbiert werden. Nach Schädigung dieser Zellen z.B. durch eine Ischämie, ist die Rückresorption eingeschränkt, so dass es zur Aufdehnung des Tubuluslumens (B) und Ablösung sterbender Tubuluszellen (C) kommt. Auch im umliegenden Gewebe findet eine Entzündungsreaktion (D) statt: das Gewebe wird ödematös, Entzündungszellen sowie mesenchymale Zellen wandern ein und es beginnt die Regeneration mit Ersatz abgestorbener und die Interaktion mit verbleibenden Tubuluszellen. Vermittelt werden die Reperaturvorgänge durch Signalmoleküle (E).

Insgesamt liegt die Mortalitätsrate bei einem ANV bei etwa 50% [1, 5] – diese wird jedoch stark durch verschiedene Komorbiditäten des jeweiligen Patienten beeinflusst [4-6]. Über 90% der überlebenden Patienten weisen eine vollständige und nur weniger als 1% keine Erholung der Nierenfunktion auf [6]. Dieses ist zurückzuführen auf verschiedene effektive

Reparaturmechanismen. Ziel ist hierbei der Ersatz abgestorbener Tubulusepithelzellen durch vitale Zellen und somit das Wiederherstellen der physiologischen Struktur.

1.2 Mesenchymale Stromazellen

Mesenchymale Stromazellen (MSC) kommen in vielen Organen vor [7-9]. Ihnen werden multipotente und regenerative Fähigkeiten zugeschrieben.

Diese Zellen wurden zuerst um 1970 von Friedenstein et al. aus Knochenmark isoliert und beschrieben [10, 11]. Bis heute gibt es viele verschiedene Isolations- und Kultivierungsverfahren, die eine Vereinheitlichung der Ergebnisse erschweren [12]. Zudem gibt es keine einheitliche Nomenklatur für diese isolierten Zellen, da ihnen ein speziell zuzuordnender Marker fehlt und damit eher eine heterogene als eine homogene Zellpopulation beschrieben wird [13]. Aus diesem Grund wurde von der internationalen Gesellschaft für Zelltherapie eine Vereinheitlichung der Nomenklatur auf "multipotente mesenchymale Stromazellen" für diese spezielle Zellpopulation gefordert, welche bestimmte Kriterien erfüllt [14, 15]. Diese definierten Kriterien umfassen:

- Die Isolationsmöglichkeit durch Plastikadhärenz mit nachfolgender Bildung von fibroblastoiden Kolonien, welche auch als Colony-Forming-Units (CFUs) bezeichnet werden. Diese sollen aus einer einzigen Zelle, dem Colony-Forming-Unit-Fibroblast (CFU-F), hervorgehen [14, 16].
- Die Expression spezieller Antigenmuster: Zum einen ein positiver Nachweis f
 ür CD73, CD90 und CD105 und zum anderen eine fehlende Expression von CD34, CD45, CD14 oder CD11b, CD79a oder CD19 und HLA-DR
- Ein multipotentes Differenzierungspotential in adipogene, chondrogene und osteogene Zellen.

Diese Kriterien sind jedoch nicht ausreichend [13]. So wurden bereits reine Fibroblastenkulturen beschrieben, welche über das genannte Antigenmuster verfügen [17], so dass eine direkte und eindeutige Phänotypisierung der definitiven und naiven MSC noch nicht gelungen ist. Des Weiteren wurden diese Kriterien nur auf humane Zellen bezogen und andere Spezies bei der Kriterienauswahl nicht berücksichtigt.

1.3 Reparative Vorgänge nach einem akuten Nierenversagen

1.3.1 Rolle mesenchymaler Zellen bei Reparaturvorgängen in der Niere

Mesenchymalen Stromazellen aus dem Knochenmark (engl. bone marrow stromal cells, BMSC) wurde lange Zeit eine große Bedeutung bei reparativen Vorgängen nach einem ANV zugeschrieben. Dieses basiert auf zwei Beobachtungen: 1) BMSC integrieren sich bei ausgeprägter Differenzierungsfähigkeit auch unter physiologischen Bedingungen in Nierengewebe. Aber auch Fusionen mit renalen Zellen wurden beschrieben. Nach Knochenmarktransplantation konnte nachgewiesen werden, dass lokal 2-8% der differenzierten Nierenzellen aus dem Knochenmark stammen [18, 19]. 2) Experimentelle Injektion von BMSC intravaskulär (arteriell oder venös) oder intrarenal nach induziertem ANV führte bei einigen Experimenten zu einer deutlichen Verbesserung der Nierenfunktion und des Krankheitsverlaufes [20-24]. Eine Arbeit hingegen konnte keinen Effekt auf den Verlauf des ANV nachweisen [25]. In mehreren Studien konnte zwar eine gesteigerte Mobilisation und Einwanderung von BMSC in die Niere im ANV nachgewiesen werden - diese lag allerdings mit insgesamt 8-20% der tubulären Zellen [18, 25, 26] in einem Bereich, welche nur eine geringe Steigerung im Vergleich zur physiologischen BMSC-Integration (siehe unter 1) darstellt. Neben zusätzlicher Einwanderung ins Mesangium (10% der BMSC) integrierte sich die überwiegende Zahl (80%) der Zellen ins Interstitium [25]. Interessant ist, dass Langzeitergebnisse nach experimenteller Applikation von MSC zwar eine gute Nierenfunktion, jedoch auch das deutlich vermehrte Auftreten von intraglomerulären Adipozyten und das Auftreten einer Glomerulosklerose gezeigt haben [21]. Somit scheint der Ersatz apoptotischer Tubulusepithelzellen durch BMSC in vivo eher eine supportive, insgesamt untergeordnete Bedeutung zu spielen. Auf Grund der interstitiellen Hauptlokalisation scheinen MSC vielmehr parakrin regulierend bei reparativen Vorgängen zu wirken [27].

Auch in der Niere selbst wurden multipotente mesenchymale Stromazellen beschrieben [9, 28-32], denen eine supportive Rolle bei der Regeneration der Niere nach ANV zugeschrieben wird. Diese Zellen können *in vitro* ebenfalls durch Plastikadhärenz isoliert werden [29, 32] und sind bei *in vivo* Experimenten sogar zu einer Tubulogenese befähigt [29]. Wie auch in anderen Organen, scheinen diese Zellen hauptsächlich perizytär zu liegen [8, 33, 34], wobei eine dominierende Lokalisation an der renalen Papille diskutiert wird [35, 36].

Durch Sezernierung diverser parakriner Faktoren [8] scheinen – eingewanderte oder residente – MSC im Entzündungsgebiet mitogen und antiapoptotisch auf vorhandene Tubulusepithelzellen, zudem proangiogen und antiinflammatorisch zu wirken [8, 27, 36, 37]. An den reparativen Vorgängen insgesamt haben, nach dem heutigen Stand der Literatur, residente renale Zellen deutlich mehr Bedeutung als einwandernde BMSC [25, 38].

1.3.2 Rolle epithelialer Zellen bei Reparaturvorgängen in der Niere

Neben mesenchymalen multipotenten Stromazellen wurden auch epitheliale Stammzellen in tubulärer Lage beschrieben [31, 39, 40]. Diese zeigten ebenso wie die MSC, multipotentes Verhalten und verbesserten, bei Nachweis einer Integration in geschädigte Tubuli, die Nierenfunktion nach einem ANV. Diese Zellen wurden zum einen in den verschiedenen Tubuli, betont proximal, aber auch im Sammelrohr [39, 40], zum anderen in der Bowmans Kapsel oder dem Gefäßpol gegenüberliegend gefunden [31].

Insgesamt scheint der Hauptmechanismus der reparativen Vorgänge nach einem ANV der Ersatz apoptotischer und nekrotischer Tubuluszellen durch residente Tubulusepithelzellen zu sein [25, 38, 41-44], welche im Zuge der Reparatur dedifferenzieren und proliferieren [25, 44]. Gestützt wird diese Annahme dadurch, dass residente Tubuluszellen nach einem Tubulusschaden wieder beginnen Marker des Prozesses der Zelldifferenzierung, wie *vimentin* und *pax2*, und nicht weiter Marker des finalen Differenzierungszustandes, wie z.B. *lotus tetragonolobus agglutinin*, zu exprimieren [25, 44]. Hiermit lässt sich auch vereinbaren, dass speziell für den proximalen Tubulus eine schnelle Proliferationsfähigkeit nachgewiesen wurde, da sich viele Zellen nicht in der G0, sondern in der G1-Phase des Zellzyklus befinden [45, 46]. Nach Ausschöpfung dieser lokalen Möglichkeiten scheint es denkbar, dass auch mesenchymale Zellen vermehrt direkt rekrutiert werden [47] und diese in diesem Fall dann auch nicht nur rein parakrin wirken könnten.

1.4 Erythropoietin als renoprotektiver Mediator

Als ein renoprotektiver parakriner Faktor wird Erythropoietin (EPO) diskutiert [48]. EPO ist ein Glycopeptidhormon, welches in verschiedenen Organen wie Niere, Leber, Uterus, Ovar, Eileiter oder im ZNS synthetisiert wird [49-58]. Hierbei ist die Niere jedoch der Ort, welcher für den EPO-Serumspiegel verantwortlich ist [50] und damit die Hauptaufgabe des EPO, die Aufrechterhaltung der Sauerstoffversorgung der einzelnen Zellen durch Regelung der Erythropoese, sichert. In der Niere wird EPO vor allem im Kortex und im äußeren Mark produziert. Die meisten Publikationen beschreiben eine ausschließliche Produktion durch peritubuläre, fibroblastoide Zellen, die meist zusätzlich Ecto-5'-Nucleotidase synthetisieren [59-67]. In anderen Veröffentlichungen wurde jedoch eine Synthese alleine in tubulären Zellen nachgewiesen [68-72]. Angeregt wird die *epo*-Expression durch Hypoxie [73, 74]. Zusätzlich wirkt Adenosin, das Endprodukt der Ecto-5'-Nucleotidase, stimulierend [75, 76]. Auf die vielfältigen Aufgaben neben der Stimulation der Erythropoese weist das Vorhandensein von EPO-Rezeptoren (EPOR) in diversen Organen hin. So wurden ubiquitär in der Niere [77], auf Endothelzellen [78, 79], auf

Magenmukosazellen [80], in der Plazenta [81], auf Leydig-Zellen [82] oder auf neuronalen Zellen [83, 84] diese Rezeptoren nachgewiesen. In verschiedenen Versuchen konnte für EPO eine VEGF-induzierende und angiogenetische [85, 86], mitogene [87, 88], antiinflammatorische, antioxidative, antiapoptotische [89] und immunmodulierende [90, 91] Wirkung gezeigt werden. So ist auch eine protektive Wirkung auf die Niere bei einem ANV zu erklären [48, 92, 93], welches unter EPO-Behandlung im Tiermodell einen signifikant milderen Verlauf zeigte. Diese pleiotrope Bedeutung wird gestützt von Experimenten, die zwar bei einem Nierenschaden insgesamt eine Abnahme der Anzahl EPO-produzierender Zellen im Vergleich zur gesunden Niere zeigten, jedoch auch nachwiesen, dass bei stärkerem Defekt prozentual mehr Zellen EPO produzierten als bei einem leichteren Gewebeschaden [94]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass EPO fibrotische Umwandlungen von Epithel zu Mesenchym verringert [95].

Die Isolation und Charakterisierung renaler EPO-produzierender Zellen in vitro konnte bisher noch nicht in zufriedenstellendem Maß durchgeführt werden. Vor kurzem ist es gelungen, solche Zellen durch simple Plastikadhärenz zu isolieren [32]. In dieser Studie wurde jedoch nicht die gesamte isolierte heterogene Zellpopulation, sondern nur ein spezieller Zellklon ("4E") untersucht. Aus den Ergebnissen der Experimente schlossen die Verfasser, diese Zellen seien Vorläuferzellen mit multipotentem Differenzierungspotential. Die Zellen besaßen eine gewisse Fähigkeit zur Differenzierung in Perizyten, Adipozyten, Myofibroblasten, Osteoblasten und Endothelzellen und konnten aktiv an der Angiogenese teilnehmen. Des Weiteren zeigten sie supportive Eigenschaften auf die Tubuluszelldifferenzierung. Zudem konnte unter Anoxie/Hypoxie eine Bildung von EPO durch diese Zellen nachgewiesen werden. Überraschenderweise entwickelte sich aus diesen Zellen eine heterogene Zellpopulation mit verschiedenen differenzierten Zellen trotz gleicher Kulturbedingungen. Die Reproduzierbarkeit dieser Ergebnisse im Zuge einer de novo Isolation ist allerdings fraglich, da, laut Verfassern, keine Möglichkeit gesehen wird, diese "4E" Zellen direkt aus dem gesamten, heterogenen Nierenzellisolat zu identifizieren. Trotzdem ist es mit dieser Publikation gelungen, eine Verbindung zwischen isolierten multipotenten MSC und EPO-produzierenden Zellen in vitro herzustellen.

1.5 Die Nephrogenese während embryonaler Entwicklungsvorgänge

Zum Verständnis der reparativen Vorgänge nach einem ANV ist ein Verständnis der Nephrogenese hilfreich, deren Analyse Gegenstand von zahlreichen *in vitro* und *in vivo* Experimenten ist. Die renale Entwicklung ist außerordentlich komplex und besteht aus drei Hauptschritten [96, 97]. Der erste Schritt beginnt bei der Maus an Tag 8 *post conceptionem* (*p.c.*) mit der Entwicklung der Vorniere aus dem intermediären Mesoderm. Diese verfügt noch über keine exkretorische Funktion und degeneriert fast vollständig während der weiteren Entwicklung. Nur der untere Teil des Vornierenganges, welcher durch epitheliale Zellen gebildet wurde, persistiert als Wolff-Gang. Dieser ist für die Entwicklung der späteren Nieren essentiell. Im zweiten Schritt beginnt dieser Gang eine Tubulogenese im benachbarten Mesenchym zu induzieren. Es entwickelt sich die Urniere, welche das Endstadium der Nierenentwicklung bei im Wasser lebenden Vertebraten darstellt. Bei höher entwickelten Vertebraten degeneriert auch diese Nierenentwicklungsstufe, während die Entstehung der endgültigen Niere, Metanephros genannt, beginnt. Hierbei wird der epitheliale Harnpol durch den Wolff-Gang an Tag 10,5 *p.c.* gebildet, welcher als Ureterknospe in das intermediäre Mesoderm hineinwächst und die Bildung des metanephrischen Mesoderms induziert. Folgend beginnt die Nephronformation und Tubulogenese durch eine Mesenchym-zu-Epithel-Umwandlung (MET) [97, 98].

eine wichtige zellulärer Wachstumsfaktoren spielen Rolle bei der Rolle Differenzierungsvorgänge während der Nephrogenese. Beispielsweise wurde eine starke Stimulation der metanephrischen Organogenese durch Retinsäure nachgewiesen [99]. Transforming Growth Factor β1 (TGFβ1) leitet die für die MET essentielle Genexpression ein [100] und hat regulative Aufgaben während der Nephrogenese [101]. Publiziert wurde auch ein Einfluss von Epidermal Growth Factor (EGF) auf Proliferation und Differenzierung von Nierenzellen [102]. Dieser bezieht sich besonders auf glomeruläre und tubuläre Zellen [103]. Zudem dient EGF auch als protektiver Faktor vor Apoptose [104]. Fibroblast Growth Factor (FGF) 2 ist erforderlich, um die Aggregation metanephrogener mesenchymaler Zellen von Ratten in vitro zu induzieren und kann zudem eine MET herbeiführen [105]. Leukaemia inhibitory factor (LIF) kann diese mesenchymalen Aggregate in Nierentubulusepithel umwandeln, jedoch nur, wenn eine Exposition mit FGF2 vorausgegangen ist [106]. Unter Aldosteron konnte in einer Perfusionskultur mit renalen Vorläuferzellen eine Induktion der Tubulogenese in vitro nachgewiesen werden [107].

1.6 Embryonale Stammzellen als *in vitro* Modell von Differenzierungsvorgängen

Das etablierte Modellsystem der Differenzierung muriner embryonaler Stamm (ES)-Zelllinien kann zwar keine *in vivo* Experimente an Embryonen ersetzen, ist aber auf Grund der Reproduzierbarkeit und der Reduktion vieler unbekannter *in vivo*-Variablen ein bisher unverzichtbarer Bestandteil der Forschung zum Verständnisgewinn von zellulären Entwicklungsvorgängen geworden [108-113].

ES-Zellen werden als Aggregate kultiviert, die als Embryoid Bodies (EBs) bezeichnet werden. Unter Verwendung des EB-Kultursystems kann die Entwicklung der undifferenzierten und pluripotenten ES-Zellen via Vorläuferzellen in terminal differenzierte Zellen aller drei Keimblätter untersucht werden [114, 115]. So differenzieren ES-Zellen spontan z.B. in Kardiomyozyten, welche wiederum in ventrikuläre, atriale oder sinusnodale Typen unterteilt werden können [116, 117]. Im Gegensatz hierzu dedifferenzieren Herzzellen, die aus Primärkulturen gewonnen werden, schnell und sind in Hinblick auf die Differenzierungsstabilität dem ES-Zellmodell unterlegen [118, 119]. Auch ist das ES-Zell-Modellsystem ideal, um die Bedeutung einzelner Faktoren auf Differenzierungsvorgänge zu untersuchen. So kann z.B. durch den Zusatz von Retinsäure oder Wachstumsfaktoren der TGF und FGF Familie eine in vitro-Differenzierung von ES-Zellen in Herz-, Skelettmuskel- [120, 121], Knorpel- [122-125] oder Fettzellen [126] induziert werden. Auch konnte von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass in EBs spontane primitive renale Strukturen entstehen [127]. Zusätzlich wurde in anderen Arbeiten gezeigt, dass die renale Differenzierung von ES-Zellen durch Applikation von Activin A, auch in Kombination mit Retinsäure und BMP4, gefördert wird [110, 112, 128]. Die alleinige initiale Applikation hoher Konzentrationen von BMP2, BMP4 oder BMP 7 inhibierte jedoch die renale Differenzierung [111]. Des Weiteren konnte auch in in vivo-Experimenten durch Injektion von ES-Zellen in murine embryonale Nieren [128, 129] oder ins Retroperitoneum [113] ein Potential zur Bildung renaler Strukturen nachgewiesen werden.

Ein Nachteil der konventionellen *in vitro*-Kultur ist das statische Zellkulturmedium, welches bei jedem Wechsel eine relativ drastische Änderung von Temperatur, Gasanteilen und Faktorenkonzentrationen bedingt. Dies kann sich wiederum negativ auf das Differenzierungsverhalten der ES-Zellen auswirken. Zur Verminderung dieser variablen Bedingungen gibt es die Möglichkeit, ein geschlossenes Kultivierungssystem zu verwenden, welches Zellen während des gesamten Versuches mit frischem Zellkulturmedium versorgt und stabile, reproduzierbare Versuchsbedingungen ermöglicht [130-132]. Dieses sogenannte Perfusionskultursystem ist allerdings bisher nicht für das ES-Zell-Modellsystem etabliert.

1.7 Fragestellung

In dieser Promotionsarbeit wurden verschiedene Fragestellungen bearbeitet.

 Können renale mesenchymale Progenitor/Stromazellen aus Nierengewebe nach einer Standardprozedur isoliert, charakterisiert und von vergleichbaren Zellen anderer Organe abgegrenzt werden?

In dieser Arbeit erfolgt die Isolation mesenchymaler Zellen aus murinen Nieren, Lungen, Dickdarm, Knochenmark und Bauchhaut durch Plastikadhärenz und nachfolgend organabhängig die Charakterisierung durch Analyse der:

- Bildung von Colony-Forming-Units
- Zellulären Proliferation unter Normoxie und Hypoxie (2% O₂)
- Telomeraseaktivität
- Expression von Oberflächenmarkern durch Durchflusszytometrie
- adipogenen, chondrogenen und osteogenen Differenzierungsfähigkeit durch Applikation verschiedener etablierter Induktionsmedien.
- 2) Exprimieren isolierte renale mesenchymale Stromazellen *epo* als ein mögliches Signalmolekül zur parakrinen Interaktion im akuten Nierenversagen?

Diese Analyse der Expression von *epo* erfolgt hier auf Genebene mittels quantitativer RT-PCR und EPO-*in-situ*-Hybridisierung.

3) Kann die renale Differenzierung von ES-Zellen *in vitro* durch Applikation von Wachstumsfaktoren bzw. Anwendung einer Perfusionskultur moduliert werden?

Nach definierter Applikation verschiedener Wachstumsfaktoren, wie TGFβ1, FGF2+LIF, LiCl, Retinsäure, EGF und Aldosteron, werden die kultivierten EBs mit Hilfe sekundärer Immunfärbungen auf die Entwicklung renaler Cytokeratin- und Nephrin-positiver, primitiver renaler Strukturen hin untersucht und die Genexpression renaler Markergene mittels semiquantitativer RT-PCR analysiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wird erstmalig die Kultivierung von ES-Zellen in einer Perfusionskultur beschrieben, um zu untersuchen, ob die Differenzierung in renale Strukturen von konsequent gleichbleibenden Kulturbedingungen positiv beeinflusst wird.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere und Zellen

Die verwendeten Versuchstiere und die verwendete murine ES-Zell-Linie sind in Tab. 1 und Tab. 2 erwähnt.

Tab. 1: Versuchstiere zur Isolation mesenchymaler Stromazellen (MSC) Versuchsnummer: 12/A16/05 vom 22.02.2005 Versuchsnummer Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume: V312-72241.122-4 NMRI (Wildtyp) Maus (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) → Zur Isolation von Wildtyp-MSC C57BL/6-Tg(UBC- GFP)30Scha/J Maus (JAX[®] Mice and Services, Bar Harbor, Maine, USA)

 \rightarrow zur Isolation von Green-Fluorescent-Protein (GFP)- positiven MSC

Tab. 2: Verwendete murine ES-Zell-Linie

D3 [133]

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

 \rightarrow Siehe Anhang (Tab. I)

2.1.3 Antikörper

- \rightarrow Siehe Anhang (Tab. II):
 - Antikörper zur Markierung intranukleärer DNA
 - Antikörper zur Charakterisierung der MSC mittels Immunfärbung
 - Antikörper zur Analyse der chondrogenen Differenzierungsfähigkeit
 - Antikörper für in-situ-Hybridisierung
 - Antikörper zur Analyse renaler Vorläuferstrukturen
 - Sekundärantikörper
 - FACS-Antikörper und zugehörige Isotypkontrollen

2.1.4 Primer und Sonden

- \rightarrow Siehe Anhang (Tab. III):
 - Primer der Housekeeping-Gene
 - Primer zur Analyse der osteogenen Differenzierungsfähigkeit
 - Primer zur Analyse der adipogenen Differenzierungsfähigkeit
 - Primer zur Analyse der chondrogenen Differenzierungsfähigkeit
 - Primer zur qRT-PCR-Analyse der EPO-Produktion
 - Primer für Versuche mit embryonalen Stammzellen

2.1.5 Geräte

 \rightarrow Siehe Anhang (Tab. IV): Verwendete Geräte

2.1.6 Verbrauchsmaterialien

 \rightarrow Siehe Anhang (Tab. V): Verwendete Verbrauchsmaterialien

2.1.7 Zellkulturmedien

Alle Medien wurden vor Verwendung mit einem Filtersystem (Steritop und Stericup $0,22 \mu m$, siehe Tab. V) steril filtriert und vor Gebrauch im Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

2.1.7.1 Medien (MSC-Versuche)

 \rightarrow Siehe Anhang (Tab. VI):

- MSC-Kultivierungsmedium
- MSC-Einfriermedium
- MSC-Differenzierungsmedien
- Adipogenes MSC-Induktionsmedium
- Adipogenes MSC-Maintancemedium
- Chondrogenes MSC-Differenzierungsmedium
- Osteogenes MSC-Differenzierungsmedium

2.1.7.2 Medien (ES-Zell-Versuche)

Inaktivierung von fetalem Kälberserum (FKS). Eingefrorenes FKS wurde bei Raumtemperatur aufgetaut und bei 54 °C im Wasserbad für 30 min inkubiert, aliquotiert und bei –20 °C gelagert. Nur inaktiviertes FKS wurde zur Herstellung der ES-Zell-Medien verwendet.

- \rightarrow Siehe Anhang (Tab. VII):
 - ESC-Kultivierungsmedium
 - Mitomycin C Medium
 - LIF-Medium
 - ESC-Einfriermedium
 - ESC-Differenzierungsmedium (20%)
 - ESC-Differenzierungsmedium (0,2%)

2.1.8 Puffer und Lösungen

Alle Puffer oder Lösungen, welche für die Zellkultur verwendet wurden, wurden vor Verwendung entweder autoklaviert oder mit einem 0,22 µm Filter steril filtriert.

- → Siehe Anhang (Tab. VIII): Allgemeine Puffer und Lösungen
 - PBS
 - Lösungen zur RNA-Isolation
 - Lösungen für PCR
 - Lösungen für Elektrophorese
 - Lösungen für qRT-PCR

2.1.8.1 Puffer und Lösungen (MSC-Versuche)

- → Siehe Anhang Tab. (IX): Puffer und Lösungen für MSC-Versuche
 - Lösung zur Zellisolation
 - BrdU-Lösungen
 - FACS-Puffer und Lösungen
 - Differenzierungslösungen
 - Lösungen zum Nachweis alkalischer Phosphatase
 - Lösungen für die Sudan II Färbung
 - Lösungen für die EPO-in-situ-Hybridisierung

2.1.8.2 Puffer und Lösungen (ES-Zell-Versuche)

- \rightarrow Siehe Anhang (Tab. X): Puffer und Lösungen für ESC-Versuche
 - Gelatinelösung
 - Mitomycin C-Lösung

2.2 Mesenchymale Zellen

Tabellen (Tab.) mit römischer Bezifferung, auf die im Folgenden verwiesen wird, sind im Anhang zu finden.

2.2.1 Isolation muriner, mesenchymaler Zellen aus verschiedenen Organen

2.2.1.1 Präparation der Maus zur Gewinnung mesenchymaler Zellen

Benötigte Reagenzien: Ethanol 70% (Tab. I)

Nach Tötung der Maus (Versuchstiere siehe 2.1.1) durch Genickbruch wurde die Maus zur Desinfektion für ca. 5 min in 70% Ethanol gelegt und danach unter der sterilen Werkbank auf einem mit extra starker Aluminiumfolie ummanteltem Holzbrett mit Pins fixiert.



Abbildung 2: Praparation der mesenchymalen Stromazellen. Die Organe wurden der Maus entnommen und vom umliegenden Gewebe befreit. Das Anlegen einer Zellkultur erfolgte bei Niere, Lunge und Dickdarm (A-C) durch erst manuelles und anschließend enzymatisches Herauslösen der Zellen aus dem Zellverbund. Knochenmark (D) wurde nach Eröffnung des Markraumes mit einer Spritze, gefüllt mit NaCl, mit Druck herausgespült. Aus der Bauchhaut isolierte Fibroblasten (E) wuchsen aus Gewebepräparaten heraus. Es wurde MSC-Kultivierungsmedium verwendet. Zur späteren Isolation von Fibroblasten erfolgte die Rasur des Abdomens mit einem Einmalrasierer. Danach wurde zunächst die Haut, dann Abdomen und Mediastinum eröffnet (Abb. 2).

2.2.1.2 Isolation muriner mesenchymaler Zellen aus Nieren, Lungen und DickdarmBenötigte Reagenzien: PBS (Tab. VIII), Ethanol 70% (Tab. I), Kollagenase/Dispase IILösung (Tab. IX), MSC-Kultivierungsmedium (Tab. VI)

Durchführung: Die Isolation erfolgte in Anlehnung an ein für die Niere bereits publiziertes Protokoll [32], welches im Rahmen dieser Promotionsarbeit optimiert und auch für andere Organe angewendet wurde.

Das jeweilige Organ wurde vom umliegenden Binde- und Fettgewebe befreit und in ein steriles mit *PBS* befülltes und abgewogenes 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und das Organgewicht bestimmt.

Durch die physiologisch mit Bakterien kontaminierte Füllung des Dickdarms bedurfte dieser vor dem Abwiegen einer ausgiebigen Reinigung. Hierfür wurde der Darm am Übergang zum Dünndarm abgesetzt und der Kot retrograd durch zwei anatomische Pinzetten herausgedrückt. Danach erfolgte das Absetzen des Darms am After. In einer mit *PBS* gefüllten bakteriologischen Petrischale wurde das Organ mit einem Skalpell longitudinal geteilt, um das Lumen mit *PBS* spülen zu können. Anschließend wurde der Darm für 5 sec in 70% *Ethanol* geschwenkt und in das mit *PBS* befüllte Zentrifugenröhrchen zur Wägung überführt.

Nach der Gewichtsbestimmung wurde das Organ in einem Becherglas mit 5 ml *Kollagenase/Dispase-Lösung* 5 min mit einer spitzen Schere zerkleinert und anschließend 40 min bei 37 °C und 75 rpm in einem Wärmeschüttler inkubiert, um die Zellen aus ihrem Zellmatrixverband herauszulösen. Es folgte das Filtrieren der Dispersion durch ein steriles Teesieb, wonach das Filtrat in ein mit *MSC-Kultivierungsmedium* gefülltes 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt wurde, um die Enzymlösung zum Erlangen eines relevanten Wirkungsverlustes zu verdünnen. Nach Zentrifugation der Suspension und Absaugung des Überstandes wurde das Pellet in 10 ml *MSC-Kultivierungsmedium* 4x resuspendiert und entweder auf eine 75 cm² (Nieren) oder auf zwei 25 cm² (Lunge und Dickdarm) Zellkulturflaschen ausplattiert. Nach 2 Tagen erfolgte der erste Mediumwechsel, um nicht-adhärente Zellen und Gewebereste zu entfernen.

2.2.1.3 Isolation muriner mesenchymaler Zellen aus Knochenmark

Benötigte Reagenzien: PBS (Tab. VIII), MSC-Kultivierungsmedium (Tab. VI)

Durchführung: Die Hinterbeine der Maus wurden mit einer Schere vom Becken abgesetzt und die Knochen mit Hilfe von zwei chirurgischen Pinzetten von Muskulatur und Fell befreit. Die Epiphyse der vier nun blanken Röhrenknochen wurde mit einer Schere entfernt und das Knochenmark in ein mit *PBS* gefülltes Zentrifugenröhrchen ausgespritzt. Verwendet wurde hierfür eine mit einer 25 G Kanüle versehenen mit *PBS* gefüllten 10 ml Spritze. Auf Grund des sehr niedrigen Organgewichtes und des isolationsbedingt hinzugegebenen *PBS* war eine zuverlässige Wägung des Organgewichtes nicht möglich. Das Knochenmark wurde durch wiederholtes Resuspendieren mit einer Pipette zerkleinert. Es folgte die Zentrifugation für 5 min bei 1000 rpm. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet mit 10 ml *MSC-Kultivierungsmedium* 4x resuspendiert und die Suspension auf zwei 25 cm² Zellkulturflaschen ausplattiert. Nach 2 Tagen erfolgte der erste Mediumwechsel.

2.2.1.4 Isolation muriner Fibroblasten aus Bauchhaut

Benötigte Reagenzien: PBS (Tab. VIII), MSC-Kultivierungsmedium (Tab. VI)

Durchführung: In senkrecht gestellte 25 cm² Zellkulturflaschen wurden vorsichtig, ohne die Wände mit Medium anzufeuchten, 5 ml *MSC-Kultivierungsmedium* überführt. Die rasierte Bauchhaut der Maus wurde mit einer Schere geschnitten und in einer mit *PBS* befüllten bakteriologischen Petrischale mit einem Skalpell in etwa 5x5 mm große Stücke zerteilt. Jeweils 5 Hautstücke wurden vorsichtig auf den trockenen Boden der Zellkulturflasche mit einer Pinzette mit der Hautinnenseite überführt. Nach vierstündiger aufrechter Inkubation im Brutschrank wurden die Flaschen vorsichtig hingelegt, so dass das vorgelegte Medium die Hautstücke umspülen konnte. Eine Entfernung dieser Stücke wurde vorgenommen, sobald mikroskopisch aus der Haut auf dem Plastik herauswachsende Fibroblasten erkennbar wurden. Dieses konnte etwa zwei bis drei Wochen nach Versuchsbeginn beobachtet werden.

2.2.2 Kultivierung der mesenchymalen Zellen

2.2.2.1 Passagieren

Benötigte Reagenzien: PBS (Tab. VIII), Trypsin/EDTA 10x (Tab. I), jeweiliges Medium (Tab. VI)

Durchführung: Das Wachstum der Zellen wurde mikroskopisch kontrolliert. Bei entsprechender Zelldichte (mindestens 70% Konfluenz) wurden diese passagiert. Hierzu wurden die Zellen 2x mit *PBS* gewaschen und danach mit *Trypsin/EDTA 10x* bei 37 °C 2 min inkubiert. Die jeweilige verwendete Menge von *PBS* und *Trypsin EDTA 10x* richtete sich nach der Zellkulturflaschengröße (Tab. 3).

Tab. 3: Verwendete Mengen abhängig von der Zellkulturflaschengröße				
Flaschengröße [cm ²]	PBS [ml]	Trypsin/EDTA 10x [ml]	Medium [ml]	
25	5	2	5	
75	15	3	15	
150	30	5	25	

Zellen, die sich nicht alleine durch die Inkubation mit *Trypsin/EDTA 10x* lösten, wurden manuell mit einem Zellschaber vom Zellkulturplastik abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden mittels einer Pipette in ein Röhrchen zur Zentrifugation überführt. Nach der Zentrifugation (5 min bei 1000 rpm) wurden die Zellen durch 40x Resuspendieren im frisch hinzugegebenen Medium homogen verteilt und entweder auf einer 3x größeren Oberfläche (z.B. 25 cm² => 75 cm²) ausplattiert, kryokonserviert (\rightarrow 2.2.2.3) oder für Versuche verwendet. Zur Kultivierung der Zellen in den Zellkulturflaschen wurde stets eine definierte Mediummenge verwendet (Tab. 3).

2.2.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Um eine definierte Anzahl von Zellen für die Versuche zu verwenden, wurde die Zellzahl bestimmt. Hierfür wurden 10 μ l der nach dem Zentrifugieren erhaltenen Zellsuspension (2.2.2.1) mit einer Pipette in eine *Thoma-Zählkammer* gegeben und die Zellen in den vorgegebenen Bereichen gezählt. Hierbei wurden nur morphologisch unauffällige Zellen berücksichtigt. Anschließend wurde die Zellzahl in der Suspension/ml mit folgender Formel errechnet: Zellzahl/ml = (gezählte Zellen/64) x 10⁶.

2.2.2.3 Kryokonservierung

Benötigte Reagenzien: PBS (Tab. VIII), Einfriermedium (Tab. VI/VII), Kultivierungsmedium (Tab. XVI/VII)

Durchführung: Die Zellen wurden passagiert (2.2.2.1), nach dem Zentrifugieren in 1 ml *Einfriermedium* durch 40x Resuspendieren aufgenommen, in ein Einfrierröhrchen pipettiert und mit –1 °C/h in einem *Kryo-Container* auf –80 °C heruntergekühlt. Zur Langzeitkryokonservierung wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff (-196 °C) überführt. Zur Rekultivierung wurden die Zellen so schnell wie möglich aufgetaut und umgehend in ein mit warmem *Kultivierungsmedium* gefülltes Zentrifugenröhrchen überführt, 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert und auf Zellkulturplastik, dessen Oberflächengröße identisch zu dem vor dem Einfrieren war, ausplattiert. Ausgenommen hiervon waren murine Fibroblasten der Haut, deren Wachstumsverhalten sich als so gut herausstellte, dass die Oberfläche nach dem Auftauen verdoppelt werden konnte.

2.2.3 Analyse der Colony-Forming-Unit-Fibroblasts

Mit der quantitativen Analyse der Colony-Forming-Unit-Fibroblasts (CFU-F) lässt sich eine Aussage über die Effektivität der Isolation der Zellen [14, 16] treffen.

Durchführung: Vor Erreichen der Konfluenz, spätestens aber an Tag 7 nach Isolation, erfolgte lichtmikroskopisch, unter Verwendung des 5er Objektivs, die Zählung von CFU-F.

Auswertung: Die CFU-F der isolierten Lungen-, Nieren- und Dickdarmzellen wurden auf CFU-F/cm² und CFU-F/cm²/g Organ, die CFU-F der isolierten Knochenmarkzellen nur auf CFU-F/cm², umgerechnet.

2.2.4 Analyse der Proliferation unter Normoxie und Hypoxie (2% O₂)

5'-Bromo-2'deoxy-Uridin (BrdU) ist ein Thymidinanalogon und wird während der DNA-Replikation in der S-Phase des Zellzyklus in die Zelle eingebaut. Das inkorporierte BrdU kann durch einen spezifischen Antikörper mit Hilfe von Immunfloureszenz sichtbar gemacht werden, so dass über den Anteil replizierender Zellen eine Aussage über die Proliferation der Zellpopulation gemacht werden kann. Es erfolgte eine Messung der Proliferation unter Normoxie (NOX) und Hypoxie mit 2% O₂ (HOX) zu den Zeitpunkten 24 h, 48 h und 72 h.

Benötigte Reagenzien: PBS (Tab. VIII), BrdU-labeling-medium, BrdU-Fixierungs-, Primär/Sekundärantikörperlösung (Tab. X)

Durchführung: 7000 Zellen/cm² wurden auf "CultureSlides", bestehend jeweils aus zwei Kammern, ausgesät und in NOX oder HOX kultiviert. Nach 24 h, 48 h und 72 h wurde jeweils eine Färbung durchgeführt. Hierzu wurde eine Stunde vor Färbezeitpunkt das Medium zu normoxischem bzw. hypoxischem frisch hergestellten *BrdU-labeling-medium* gewechselt. Nach einer Stunde Inkubation wurden die "CultureSlides" mit normoxischem bzw. hypoxischem *PBS* 3x gewaschen und für 20 min bei –20 °C mit Hilfe der Fixierungslösung fixiert. Es folgte nach 3x Waschen mit *PBS* die Inkubation mit der *Primärantikörperlösung* für 1 h bei 37 °C mit 75 rpm auf einem Rüttler, um die Lösung homogenen zu verteilen. Nach erneutem 3x Waschen mit *PBS* wurden die Proben für 1 h bei 37 °C und 75 rpm mit der *Sekundärantikörperlösung* inkubiert. Neben dem Sekundärantikörper enthielt diese *DAPI*, einen DNA-markierenden Floureszenzfarbstoff, der sich in allen Zellkernen anreichert. Wieder wurden die "CultureSlides" 3x mit *PBS* gewaschen und konserviert (2.4.6).

Auswertung: Es wurde das Verhältnis BrdU⁺/DAPI⁺-Zellen zu BrdU⁻/DAPI⁺-Zellen unter Verwendung des 20er Objektivs bestimmt. Je Chamber wurden 10 Gesichtsfelder ausgezählt und das Ergebnis graphisch aufbereitet.

2.2.5 Analyse der Telomeraseaktivität

Telomere sind spezifische TTAGGG-Repeatsequenzen an den Enden eukaryontischer Chromosomen, die als Bindungsstelle für die DNA-Polymerase bei der Replikation des Genoms während des Zellzyklus fungieren. Hierbei repliziert die DNA-Polymerase jedoch nicht ihre Bindungsstelle, was zu einem progredienten Verlust der TTAGGG-Repeats in steigender Passage und letztendlich zur Unfähigkeit der Zellteilung führt. Um dies zu vermeiden, besitzen einige Zellen das Enzym Telomerase, welches u.a. aus einem RNA-Anteil. der die telomerspezifische Basenfolge besitzt. und einem Telomerase-Reverse-Transkriptase-Teil besteht und somit die Telomere wieder verlängern kann [134, 135].

Telomeraseaktivität wurde mittels des *TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA Kits* nachgewiesen, welches alle benötigten Lösungen, Sonden und ELISA-Platten enthielt. Das

Prinzip dieses Assays beruht auf dem 1994 veröffentlichten TRAP-Protokoll [136], welches aus vier grundlegenden Schritten besteht:

- 1) Lysierung der Zellen und Isolation der Telomerase.
- 2) Ein telomerähnliches Substrat, hier biotinmarkierter P1-TS Primer, wird hinzugegegeben und durch die Telomerase mit TTAGGG-Repeats verlängert.
- 3) Amplifikation der geschaffenen TTAGGG-Repeats via PCR.
- 4) Nachweis des Amplifikates via ELISA.

Benötigte Reagenzien: PBS (Tab. VIII), TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA Kit-Reagenzien (Tab. I), aqua dest.

Durchführung: Zur Vorbereitung wurden die Zellen passagiert (2.2.2.1) und gezählt (2.2.2.2). Jeweils 200.000 Zellen wurden in ein Reaktionsgefäß überführt, der Überstand entfernt und das Pellet mit *PBS* gewaschen, erneut zentrifugiert und das Pellet trocken bei –80 °C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert.

Zu den vorbereiteten Proben wurden 200 μ l *Lysispuffer* hinzugegeben, resuspendiert, 30 min auf Eis inkubiert und der Überstand nach 20 min Zentrifugieren bei 13.200 rpm und 4 °C in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es erfolgte die Bestimmung des Proteingehaltes anhand des Bradford Protein Tests (\rightarrow 2.2.6).

Elongation/Amplifikation: Für Schritt 2 des TRAP-Protokolls wurden die Proben 30 min bei 25 °C inkubiert. Die Amplifikation wurde mit 30 Zyklen und einer Bindungstemperatur von 50 °C in dem in 2.5.3 beschriebenem PCR-Protokoll durchgeführt. Verwendet wurden 50 μ l *PCR-Mix*, bestehend aus 25 μ l *Reaktionsmix* und 50 μ g Probenprotein, maximal aber 25 μ l Probe, ad 50 μ l *aqua dest.* Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle, bestehend aus *aqua dest.* und *Reaktionsmix*, und eine Positivkontrolle, bestehend aus 216 Basenpaaren, mitgeführt.

ELISA: 5 μ l PCR-Amplifikat wurden mit je 20 μ l Reagenz denaturiert und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden 100 μ l *Hybridisierungspuffer*, welcher Telomerase-spezifische DIG-markierte Sonden enthielt, hinzugegeben und insgesamt 100 μ l auf eine vorbeschichtete Streptavidinmikroplatte gegeben und 2 h bei 37 °C und 300 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Proben dreimal mit je 250 μ l *Waschpuffer* gereinigt und 100 μ l eines *Meerrettichperoxidase konjugierten Anti-DIG-Antikörpers* hinzugegeben mit nachfolgender 30 min Inkubation bei Raumtemperatur und 300 rpm. Nach fünfmaligem Waschen mit 250 µl *Waschpuffer* wurde die Bindung des Antikörpers nach Zugabe von 100 µl *TMB* und 10-20 min Inkubation bei Raumtemperatur bei 300 rpm nach Zugabe eines *Stopreagenzes* als gelbe Färbung sichtbar gemacht,

Auswertung: Die Proben wurden bei 450 nm photometrisch ausgemessen und die Extinktion in Relation zu jener der Positivkontrolle statistisch ausgewertet.

2.2.6 Bestimmung von Proteinmengen mit dem Bradford Protein Test

Um für das Telomeraseassay 50 µg Protein verwenden zu können, musste im Vorfeld die Proteinmenge der Proben bestimmt werden. Der Bradford Protein Test, basierend auf einer Publikation von Bradford [137], besteht aus zwei Schritten:

- 1) Bildung von Komplexen des Triphenylmethanfarbstoffes CBBG mit den kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen in saurer Lösung.
- Verschiebung des photometrischen messbaren Absorptionsmaximum von 470 nm auf 595 nm durch Stabilisierung der unprotonierten anionischen Sulfatform von CBBG. Die Extinktionsbestimmung bei 595 nm wird zur Konzentrationsberechnung genutzt.

Benötigte Reagenzien: PBS (Tab. VIII), BSA (Tab. I), TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA Kit (Tab. I) Lysis Puffer, Bradford Reagenz (Tab. I)

Durchführung: Zu Beginn erfolgte die Kalibrierung des Photometers mit einer Proteinstandardreihe bestehend aus Proben, welche 0,25/0,50/0,75/1,00/1,25/1,50 mg *BSA* pro ml *PBS* enthielten. Eine Negativkontrolle mit *PBS* ohne *BSA* wurde ebenfalls in die Standardreihe integriert.

25 μl des an Beginn der Telomerase-Analyse generierten Überstandes wurden mit weiteren 25 μl Lysepuffer aus dem *TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA Kit* und 1,5 ml *Bradford Reagenz* versetzt, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend im kalibrierten Photometer bei 595 nm ausgemessen.

Auswertung: Mit Hilfe der ausgemessenen Standardreihe wurden die jeweiligen Proteinkonzentrationen bestimmt.

2.2.7 Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenmarkermoleküle

Die Durchführung dieser Analyse erfolgte mit technischer Unterstützung von Dr. Ulrich Lindner, interdisziplinäre AG Stammzellbiologie, Med. Klinik I, Universität zu Lübeck (PD Dr. med. Jan Kramer).

Die durchflusszytometrische Analyse basiert auf dem Prinzip, dass eine einzelne Zelle einen sie treffenden Laserstrahl in charakteristischer Weise streut. Durch eine Messung dieser Streuung können Rückschlüsse auf Zellgröße (Vorwärtsstreulicht) und Granularität (Seitwärtsstreulicht) erfolgen.

Des Weiteren ist es möglich, Oberflächenantigene mit Hilfe von Flourochrom-tragenden spezifischen Antikörpern zu detektieren. Hierbei trägt entweder direkt der Oberflächenantigen-bindende Antikörper ein Flourochrom (direkte Färbung) oder einen Zweitantikörper, der spezifisch den Erstantikörper bindet (indirekte Färbung). Trifft nun der Laserstrahl auf die Zelle mit dem entsprechenden, markierten Oberflächenantigen, wird zunächst das Flourochrom durch Absorption angeregt und dessen Elektronen auf ein höheres Energieniveau angehoben. Bei folgendem Rückfall auf das vorherige Energieniveau wird die aufgenommene Energie als Photonen längerer Wellenlänge wieder abgegeben. Diese Emission entspricht Licht einer bestimmten Wellenlänge und ist für jedes Flourochrom spezifisch. So emittiert z.B. FITC grünes Licht mit einer Wellenlänge von 525 nm und PE orangefarbenes Licht mit einer Wellenlänge von 575 nm.

Da auch unspezifische Fc-Bindungsstellen zusätzlich zu den spezifischen Fa/b-Regionen durch die entsprechenden Antikörper gebunden werden, wurden zusätzlich Zellen mit dem isotypischen Immunglobulin der gleichen Tierspezies inkubiert, um diese unspezifische Emission in der Auswertung subtrahieren zu können.

Die Analyse wurde mit einem Argon-Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm durchgeführt.

Benötigte Reagenzien: PBS (Tab. VIII), FACS-Vorbereitungspuffer (Tab. X), FACS-Puffer (Tab. X), Primär/Sekundärantikörper (Tab. II), Zugehörige Isotypkontrollen (Tab. II)

Vorbereitung der Zellen: Die Zellen wurden von der Zellkulturplastik abgelöst (2.2.2.1), 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert, gezählt und in *FACS-Vorbereitungspuffer* mit einer Konzentration von 10^6 Zellen/ml aufgenommen. Anschließend wurden jeweils 10 µl Antikörper und 100 µl Zellsuspension in ein Reaktionsgefäß pipettiert und 15 min bei 4 °C inkubiert. Sofern ein Sekundärantikörper (z.B. bei CD292) erforderlich war, wurde die Probe mit 1 ml *FACS-Puffer* gewaschen, 1 min bei 4000 rpm zentrifugiert, der Überstand entfernt und 10 µl *Sekundärantikörper* hinzugegeben und wieder 15 min bei 4 °C inkubiert.

Nach vollständiger Inkubation wurde 1 ml *FACS-Puffer* hinzugefügt, 1 min bei 4000 rpm zentrifugiert, der Überstand entfernt, 400 µl *FACS-Puffer* hinzupipettiert und die Suspension in beschriftete FACS-Röhrchen überführt.

Durchführung und Darstellung der Ergebnisse als Powerpoint-Präsentation: Dieser Teil der Analyse wurde freundlicherweise von Dr. Ulrich Lindner durchgeführt.

Das verwendete Protokoll umfasste ein forward (y-Achse) und side scatter (x-Achse) Zweiparameter-Diagramm und zusätzlich, zur Messung der Fluoreszenzintensität, ein Einzelparameter-Histogramm. Die Messung, die mindestens 10.000 gemessene Zellen pro Probe umfasste, erfolgte bei mittlerem Probendruck (Durchflussgeschwindigkeit). Durch Gating im Scatter-Zweiparameterdiagramm wurden Zell-Subpopulationen ausgewählt und so Zelltrümmer von der Auswertung ausgeschlossen. Die Akquirierung und Auswertung wurde mit der Software *Cytomics CXP* oder *System II Version 2.1* durchgeführt.

Auswertung. Der Anteil positiver Zellen der unterschiedlichen mesenchymalen Zellen wurde quantitativ verglichen, um Unterschiede in der Expression unterschiedlicher Oberflächenmarkermoleküle herauszuarbeiten.

2.2.8 Differenzierung von mesenchymalen Zellen aus Niere und Knochenmark

Es wurde die Fähigkeit von isolierten mesenchymalen Zellen aus Niere und Knochenmark in verschiedenen Passagen (p4 bis p11) untersucht, durch Einsatz verschiedener Induktionsmedien, in Knochen-, Fett- und Knorpelzellen zu differenzieren.

2.2.8.1 Differenzierung in Knochenzellen

Benötigte Reagenzien: MSC-Kultivierungsmedium (Tab. VI), Osteogenes MSC-Differenzierungsmedium (Tab. VI)

Durchführung Die Zellen wurden von der Zellkulturplastik abgelöst (2.2.2.1) und mit einer Dichte von 7000 Zellen/cm² mit *MSC-Kultivierungsmedium* auf insgesamt vier 6 cm² Zellkulturschalen für spätere RNA-Isolation und 8 "CultureSlides" für spätere Färbungen ausplattiert. Am Tag 1 erfolgte die Induktion mit *osteogenen MSC-Differenzierungs-* *medium*, welches 2x/Woche gewechselt wurde. Die Auswertung wurde an Tag 1 (uninduziert), 7, 14 und 28 durchgeführt und umfasste die RNA-Isolation zur Analyse der osteogenen Genexpression (Osteopontin, RunX; Tab. II) und die Durchführung histochemischer Färbungen (Alkalische Phosphatase; 2.4.1).

2.2.8.2 Differenzierung in Fettzellen

Benötigte Reagenzien: MSC-Kultivierungs- (Tab. VI), Adipogenes MSC-Induktions-/MSC-Maintenancemedium (Tab. VI)

Durchführung: Die Zellen wurden von der Zellkulturplastik abgelöst (2.2.2.1) und mit einer Dichte von 7000 Zellen/cm² mit *MSC-Kultivierungsmedium* auf insgesamt vier 6 cm² Zellkulturschalen für spätere RNA-Isolation und 4 Chamber Slides für spätere Färbungen ausplattiert. An Tag 1 wurden die Zellen mit *adipogenem MSC-Induktionsmedium* induziert, welches erneut an Tag 7, 14 und 21 auf die Zellen gegeben wurde. An Tag 4, 11, 18 und 24 erfolgte jeweils ein Mediumwechsel mit *adipogenem MSC-Maintenancemedium*. Die Auswertung wurde an Tag 1 (uninduziert), 7, 14 und 28 durchgeführt und umfasste RNA-Isolation zur Analyse der adipogenen Genexpression (Adipsin, aP2, PPAR_Y; Tab. II) und histochemische Färbungen (Sudan III + HE; 2.4.2).

2.2.8.3 Differenzierung in Knorpelzellen

Benötigte Reagenzien: MSC-Kultivierungsmedium (Tab. VI), Chondrogenes MSC-Differenzierungsmedium (Tab. VI)

Durchführung: Die Differenzierung zu Knorpelzellen wurde im MicroMassBody (MMB) System durchgeführt. Pro Differenzierungsversuch mit jeweils vier Auswertungszeitpunkten waren 20 MMB erforderlich. Hierzu wurden die mesenchymalen Zellen passagiert (2.2.2.1), in MSC-Kultivierungsmedium aufgenommen und gezählt (2.2.2.2).

Pro MMB waren 200.000 Zellen erforderlich. Somit wurden für die uninduzierte Kontrolle 10^6 Zellen benötigt, die bis zur MMB-Bildung und der folgenden Auswertung in *MSC-Kultivierungsmedium* kultiviert wurden. Für die mit *chondrogenem MSC-Differenzierungsmedium* induzierten MMB waren insgesamt $3x10^6$ Zellen erforderlich.

Zur Generierung der MMB entsprach die Konzentration an Zellen 400.000/ml des jeweiligen Mediums. Jeweils 500 µl der homogenen Zellsuspension wurden in ein 15 ml

Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei 500 rpm zentrifugiert, so dass sich am Boden ein kleines Zellpellet bildete, welches sich dann in den nächsten Tagen zum MMB formte. Um einen effektiven Gasaustausch zu ermöglichen, wurde das Zentrifugenröhrchen während der Inkubation nicht vollständig verschlossen.

Die Auswertung der nicht induzierten MMB wurde direkt nach Bildung der MMBs, meist an Tag 3, und Auswertungen der induzierten MMB an Tag 7, 14 und 28 durchgeführt.

2.2.9 Optimierung von Fixierungstechniken für GFP⁺ Zellen

Da im Rahmen dieser Promotionsarbeit auch GFP⁺ mesenchymale Zellen isoliert wurden, stellte sich die Frage nach einer Fixierung für immunhistochemische Färbungen, welche das GFP-Signal erhält. Für die Optimierung der Fixierungstechnik wurden GFP⁺ Zellen aus murinen Lungen verwendet.

Die Zellen wurden im Rahmen der Methodenoptimierung nach verschiedenen Protokollen fixiert (Tab. 5) und anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop umgehend nach der Fixierung und auch 7 Monate später (Langzeitkonservierung), im Hinblick auf die Erhaltung des GFP-Signals untersucht. Die Resultate der Methodenauswahl sind unter 3.3 dargestellt.

Tab. 5: Für GFP ⁺ Zellen verwendete Fixierungsprotokolle				
a	Eiskaltes Methanol + Aceton (7:3; 5 min, Raumtemperatur)			
b	1) 2% PAA (20 min, 4 °C),			
	2) Methanol + Aceton (7:3; 5 min, Raumtemperatur)			
c	1) 2% PAA (20 min, 4 °C),			
	2) 0,5% N-Octylglycosid (5-7 min, 4 °C)			
d	1) Eiskaltes Ethanol (10 min, 4 °C)			
	2) 1 mM NaN ₃ in <i>aqua dest.</i> + 2% BSA + 0,05% Tween (30 min, Raumtemperatur)			
	3) Waschen mit $PBS + 0.05\%$ Tween			

2.3 Embryonale Stamm (ES)-Zellen (ESC)

2.3.1 ES-Zell-Kultur

2.3.1.1 Beschichtung des ES-Zellkulturmaterials mit Gelatine

Das gesamte für die Kultivierung von ESC verwendete Zellkulturplastik wurde mit Gelatine beschichtet. Hierfür wurde 0,1% sterile Gelatinelösung auf das Plastik gegeben und 30 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Lösung abgesaugt und dann vor Verwendung das jeweilige Medium auf die Gelatine-beschichteten Zellkulturmaterialien pipettiert. Nicht gelatinebeschichtet wurden Zellkulturmaterialien, die für die Kultivierung als hängende Tropfen verwendet wurden.

2.3.1.2 Wachstumsgrundlage für ESC

Um ESC mit benötigten Faktoren versorgen zu können, wurden wachstumsinaktivierte embryonale murine Fibroblasten (ME-Zellen) in Cokultur verwendet. ME-Zellen sezernieren Faktoren in das Medium, die eine Proliferation der ESC im undifferenzierten Zustand ermöglichen.

Hierzu wurden diese aus gesamten murinen Embryos isolierten Zellen aufgetaut (2.3.1.5), auf 6 cm Zellkulturschalen ausplattiert und bei Konfluenz durch Zusatz von Mitomycin C (MMC) im Wachstum inhibiert.

Benötigte Lösungen: ESC-Kultivierungsmedium/Mitomycin C Medium/LIF-Medium (Tab. VII), PBS (Tab. VIII)

Wachstumsinhibiton der ME-Zellen: Pro 6 cm Schale wurden 6 ml *Mitomycin C-Medium* auf die ME-Zellen gegeben und diese 2,5 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen 3x mit *PBS* gewaschen, passagiert (2.3.1.3) und erneut mit *ESC-Kultivierungsmedium* ausplattiert.

Kultivierung der ESC: Um ESC in undifferenziertem Zustand zu kultivieren wurde LIF-Medium verwendet. Die ESC wurden aufgetaut (2.3.1.5) und auf die ME-Zellen ausplattiert. Das Wachstum wurde mikroskopisch kontrolliert. Die ESC wurden ab einer Koloniegröße von ca. 2 mm passagiert oder für Differenzierungsversuche verwendet.

2.3.1.3 Passagieren von ESC

Durchführung: Das Prinzip des Passagierens von Zellen ist in 2.2.2.1 erläutert. Das Wachstum der Zellen wurde mikroskopisch kontrolliert. Ab einer Größe von 2 mm der ESC-Kolonien wurden die Zellen entweder auf eine größere, mit ME-Zellen bedeckte, Oberfläche zur weiteren Proliferation umgesetzt oder für Differenzierungsversuche verwendet. Hierzu wurden die Zellen 2x mit 5 ml *PBS* gewaschen und danach mit 2 ml *Trypsin EDTA 10x* 2 min bei 37 °C inkubiert. Die jeweilige verwendete Menge von *PBS* und *Trypsin EDTA 10x* richtete sich nach der Zellkulturflaschengröße (Tab. 3).

Das Ablösen der Zellen wurde mikroskopisch kontrolliert. Sofern dieses beobachtet wurde, wurde das Ablösen durch Resuspendieren mit einer Pipette und leichtes Klopfen an die Seite der Schale unterstützt. Die Zellsuspension wurde, um das Trypsin zu inaktivieren, in ein mit *ESC-Kultivierungsmedium* gefülltes Zentrifugenröhrchen überführt und anschließend 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Nachfolgend wurde der Überstand entfernt. Das Zellpellet wurde mit neuem Medium aufgenommen und die Zellen durch gründliches Resuspendieren homogen verteilt.

2.3.1.4 Bestimmung der ESC-Zellzahl \rightarrow 2.2.2.2

2.3.1.5 Kryokonservierung der ESC

Durchführung: Die ESC wurden passagiert (2.3.1.3) und kryokonserviert (2.2.2.3).

Zur Rekultivierung wurden die ESC so schnell wie möglich aufgetaut und umgehend in ein mit warmem ESC-Kultivierungsmedium gefülltes Zentrifugenröhrchen überführt, 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert und auf mit MMC inaktivierte ME-Zellen ausplattiert.

2.3.1.6 Differenzierung von ESC via Embryoid Bodies (EBs)

Benötigte Reagenzien: PBS (Tab. VIII), Trypsin/EDTA 10x (Tab. I), ESC-Differenzierungsmedium (20%) (Tab. VII)

Durchführung: ESC wurden passagiert (2.3.1.3) und 2 Tage als sogenannte hängende Tropfen mit je 600 ESC/20 μ l *ESC-Differenzierungsmedium* (20%) sowie anschließend für weitere 3 Tage als Suspension kultiviert [124, 125, 127, 133, 138]. Am Tag 5 wurden die gebildeten EBs auf Gelatine-beschichteten Zellkulturmaterialien ausplattiert und bis zu 29 Tage (5+29) kultiviert. Um die normale Differenzierung der ESC zu bestätigen, wurden in jedes Well einer 24-well Platte je ein EB gegeben und die Herzzelldifferenzierung mikroskopisch quantitativ ausgewertet.

2.3.1.7 Kultivierung von EBs mit verschiedenen Wachstumsfaktoren
In verschiedenen Publikationen wurde bereits ein Einfluss der verwendeten Faktoren in der gewählten Konzentration auf die Entwicklung renaler Zellen in Primärkultur gezeigt.
Verschiedene Wachstumsfaktoren im *ESC-Differenzierungsmedium* wurden verwendet, um den Einfluss auf die renale Differenzierung der ES-Zellen zu untersuchen (Tab. 6)

Tab. 6: Verwendete Wachstumsfaktoren zur Untersuchung der ES-Zell-Differenzierung				
Faktor	Konzentration	Applikationszeitraum	Publikation	
Retinsäure	10 nM	5+0 - 5+7 d	[99]	
TGFβ1	10 ng/m	5+0 - 5+7 d	[100]	
EGF	50 ng/ml	5+0 - 5+7 d	[102]	
LiCl	15 mM	5+0 - 5+7 d	[139]	
FGF2,	100 ng/ml	5+0 - 5+7 d	[105, 106]	
\rightarrow FGF2 + LIF	$\rightarrow 100 \text{ ng/ml} + 50 \text{ ng/ml}$	\rightarrow 5+7 - 5+14 d	[105, 100]	
Aldosteron	10 ⁻⁶ M	5+0 - 5+29 d	[107]	

Als Kontrolle wurde *ESC-Differenzierungsmedium* ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren verwendet. An den Untersuchungstagen 5+1, 5+8, 5+15, 5+22, 5+29 d wurde RNA zur Analyse der Genexpression isoliert und Immuncofärbungen zur Analyse von renalen Vorläuferstrukturen gegen Cytokeratin (FITC) und Nephrin (CY3) angefertigt.

Durchführung: Je 10 EBs wurden auf einer 6 cm Zellkulturschale für spätere RNA-Isolation und je 5 EBs auf ein Chamber eines "CultureSlides" für spätere Immunfluoreszenzen ausplattiert. Von 5+1 d bis 5+3 d wurde als Basismedium *ESC-Differenzierungsmedium* (20%), ab Tag 5+3 d wurde *ESC-Differenzierungsmedium* (0,2%) verwendet.

Auswertung: Um den Einfluss der applizierten Wachstumsfaktoren auf die renale Differenzierung von ESC zu analysieren, wurde die Genexpression renaler Markermoleküle untersucht. Des Weiteren wurden in den Immuncofärbungen Cytokeratin und Nephrin positive renale Ringstrukturen gezählt, deren Entstehung bereits früher durch unsere Arbeitsgruppe beschrieben wurde [127].

2.3.2 Differenzierung von EBs in einer Perfusionskultur



Versuchsaufbau: Eine schematische Darstellung der Perfusionkultur gibt Abbildung 3.

Durchführung: Je ein EB wurde an 5+1 d auf eine gelatinebeschichtete 13 mm Glasscheibe mittig mit einer 100 μ l-Pipette unter Verwendung steriler gestopfter Spitzen platziert. Diese war in einem *Minusheet*-Halter mit einem äußeren Durchmesser von 14 mm befestigt. Jeder Halter wurde in ein mit *ESC-Differenzierungsmedium (20%)* befülltes Well einer 24 well Zellkulturplatte überführt und bis zu 29 Tage (5+29 d) kultiviert. An 5+2 d wurde auf *ESC-Differenzierungsmedium (0,2%)* gewechselt und 6 Halter mit EBs in einen *Gradientenkulturkontainer* überführt. Die anderen Halter wurden als Kontrolle weiter in der 24 well-Platte kultiviert.

Der Gradientenkulturkontainer wurde in einen Brutschrank überführt, um eine Kultivierung bei 37 °C und 5% CO₂ zu garantieren. Über einen Perfusor VII auf dem Brutschrank wurden die EBs mit einer kontinuierlichen Rate von 1 ml/h mit frischem ESC-Differenzierungsmedium (0,2%) perfundiert. Um möglichst stabile Bedingungen zu gewährleisten, wurde die Perfusorspritze alle 50 h ohne eine Sterilbench gewechselt. Daher wurde zwischen Spritze und Perfusionskultur ein Minisart 0,20 μm Filter zwischengeschaltet, der unter sterilen Bedingungen 1x/Woche gewechselt wurde. Das Medium wurde außerhalb des Brutschrankes in einer Abfallflasche gesammelt, die mit einem speziellen Verschluss (screw cap innovative mit 0,2 μm Sterifilter) versehen war, um aseptische Bedingungen innerhalb der Perfusionskultur zu gewährleisten.

Auswertung: Die Auswertung erfolgte an 5+29 d im Vergleich zu der Auswertung der ESC-Wachstumsfaktorversuche und unbehandelten Kontrollen. Jeweils 2 EBs wurden für Immunfärbungen und 2x2 EBs zur RNA-Isolation verwendet.

2.4 Färbungen

2.4.1 Alkalische Phosphatase-Färbung

Ein Bestandteil der Auswertung der osteogenen Induktion mesenchymaler Zellen war die Analyse vorhandener alkalischer Phosphatase (AP), deren Expression Merkmal osteogener Differenzierung ist. Zum Nachweis wurde das *Alkalische Phosphatase Kit* verwendet, welches die benötigten Reagenzien enthielt.

Benötigte Reagenzien: PBS (Tab. VIII), AP-Fixierungslösung/-Färbelösung (Tab. X), HE (Tab. I), Leitungswasser, aqua dest.

Durchführung: Zunächst wurden die Zellen 2x mit *PBS* gewaschen, bevor sie 30 sec mit *AP-Fixierungslösung* fixiert wurden. Die Präparate wurden 45 sec mit *aqua dest.* gewaschen, bevor sie mit *AP-Färbelösung* 15 min im Dunkeln gefärbt wurden. Nachfolgend wurde die Färbelösung durch 2 min Waschen mit *aqua dest.* entfernt und die Zellen 10 sec mit *HE* gefärbt. Das überschüssige *HE* wurde mit Leitungswasser und in einem finalen Waschschritt mit *aqua dest.* entfernt, bevor die Präparate konserviert wurden (2.4.6).

Auswertung: Die Auswertung erfolgte am Lichtmikroskop unter Verwendung des 20er Objektivs. Hier wurden in jedem Präparat in zehn zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern die AP-gefärbten und die gesamten Zellen gezählt und diese prozentual ins Verhältnis gesetzt. Auf Grund des expansiven Wachstums einiger Zelllinien war eine Bestimmung des exakten Verhältnisses teilweise schon ab Tag 14 nicht mehr vollständig möglich.

2.4.2 Sudan III + HE Färbung

Sudan III ist ein roter lipophiler Stoff, der sich in den Fettvakuolen von Adipozyten anreichert. Daher wurde diese Färbung verwendet, um die adipogene Differenzierung von mesenchymalen Zellen zu untersuchen.

Benötigte Reagenzien: PBS (Tab. VIII), Sudan III-Färbelösung (Tab. X), HE (Tab. I), Leitungswasser, aqua dest.

Duchführung: Zunächst wurde das Differenzierungsmedium von den Zellen entfernt und Rückstände durch Waschen mit *PBS* entfernt. Es folgte die Applikation von *Sudan III-Färbelösung* auf die Zellen und eine Inkubation über 30 min. Hiernach wurden

die Zellen mit *PBS* gespült, 10 sec mit *HE* angefärbt, nachfolgend mit Leitungswasser und *aqua dest.* ausreichend gespült und die Färbung konserviert (2.4.6).

Auswertung: Die Auswertung erfolgte am Lichtmikroskop. Es wurden in jedem Präparat 10 Gesichtsfelder unter Verwendung des 20er Objektivs analysiert und das prozentuale Verhältnis der Fettvakuolen-enthaltenden Zellzahl zur Gesamtzellzahl bestimmt.

2.4.3 Immunfluoreszenzfärbungen

Benötigte Reagenzien: PBS (Tab. VIII), Methanol-Aceton-Lösung (7:3; -20 °C, Tab. I), 7,5% BSA (Tab. I) oder 10% FKS (Tab. I) in PBS, Primär/Sekundärantikörperlösung (Tab. II)

Durchführung: Das Medium wurde von den zu färbenden Proben abgesaugt und Mediumreste durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt. Die Zellen wurden nachfolgend durch 5 min Inkubation bei Raumtemperatur mit einer Methanol-Aceton-Lösung fixiert und permeabilisiert. Es wurde das Präparat 3x mit PBS gewaschen und unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation mit 7,5% BSA oder 10% FKS in PBS 30 min bei Raumtemperatur abgesättigt. Nach erfolgter Blockung wurde der in PBS verdünnte Erstantikörper (Tab. II) auf die Zellen gegeben und 1 h bei 37 °C und 75 rpm inkubiert. Das Präparat wurde 3x mit PBS gewaschen und der mit PBS verdünnte Zweitantikörper (Tab. II) mit DAPI auf die Zellen für eine weitere Stunde bei 37 °C und 75 rpm gegeben. Auch nach diesem Schritt wurden die Proben wieder mit PBS gewaschen und für die spätere Auswertung konserviert (2.4.6). Als Kontrolle wurden nur mit Sekundärantikörper behandelte Proben verwendet.

2.4.4 Anfertigung von Gefrierschnitten der MMB

Benötigte Reagenzien: PBS (Tab. VIII), Tissue Tek OCT Compount (Tab. I)

Am entsprechenden Untersuchungstag wurde zunächst das Medium aus dem Zentrifugenröhrchen entfernt und 2 ml *PBS* zur Reinigung der MMBs von Mediumrückständen hinzugegeben. Der MMB wurde mit einer 1000 µl Pipette in einen *Cryomold Biopsy* Halter für Kryoschnitte überführt und das übertragene *PBS* mit einer 10 µl Pipette entfernt. Es wurde auf eine möglichst mittige Position des MMB geachtet. Nachfolgend wurde der Halter mit dem MMB mit *Tissue Tek OCT Compount* befüllt, dann zunächst auf -20 °C und anschließend weiter auf -80 °C heruntergekühlt.
Die Gefrierschnitte wurden mit einem *Cryostat Reichert & Jung 2800 Frigocut* angefertigt. Hierzu wurde das angefertigte Präparat aus dem *Cryomold Biopsy* Halter gelöst und mit *Tissue Tek OCT Compount* am Halter des Schneidetisches festgefroren. Die Schnitte wurden bei -20 °C angefertigt. Schnitte für Collagen II + DAPI-Immunfloureszenzen wurden 10 μ m dick geschnitten. Je 3 Schnitte wurden mit einem *Superfrost plus* Objektträger aufgenommen und über Nacht luftgetrocknet.

Anfertigen von Färbungen: Collagen II + DAPI-Immunfluoreszenzen wurden nach dem beschriebenen Protokoll angefertigt (2.4.3)

2.4.5 Immunfluoreszenzfärbungen zur weiteren Charakterisierung undifferenzierter isolierter Zellen aus Nieren und Bauchhaut

Zur Charakterisierung der isolierten mesenchymalen Zellen aus murinen Nieren wurden, vergleichend mit den isolierten Fibroblasten aus Bauchhaut Immunfluoreszenzfärbungen angefertigt (Tab. 4, 2.4.3). Hierfür wurden die heterogenen Zellen in einer Dichte von 10.000 Zellen/cm² auf "CultureSlides" ausplattiert und auf das Vorhandensein von Podocyten (Marker: Podocalyxin, Podozyten, Nestin), Myofibroblasten (Marker: α -SMA, S100A4), Perizyten (Marker: PECAM I, β_1 -NO-GC-AB), Monocyten (Marker: S100A4), glomeruläre Epithelzellen (Marker: Cytokeratin, Nephrin), Tubuluszellen (Marker: THP, RSOR), EPO-produzierende Zellen (Marker: CD73) und Neuronen (Marker: Neurofilament, NCAM) untersucht. Nach der Konservierung der Präparate (2.4.6) erfolgte die Auswertung der Färbungen am Fluoreszenzmikroskop.

Tab. 4: Verwendete Färbungen zur Charakterisierung isolierter Zellen			
	FITC	CY3	
1	Nestin	Podocalyxin	DAPI
2	Nestin	Podocin	DAPI
3	α-SMA	S100A4	DAPI
4	PECAM I	β ₁ -NO-GC-AB	DAPI
5	Cytokeratin	Nephrin	DAPI
6	THP	-	DAPI
7	RSOR	-	DAPI
8	CD73	Nephrin	DAPI
9	Neurofilament	NCAM	DAPI

2.4.6 Konservierung von Präparaten

Benötigte Reagenzien: VECTASHIELD[®] Mounting Medium (Tab. I), Nagellack (Tab. I)

Durchführung: Färbungen und einige native Präparate wurden für eine spätere Analyse mit dem Mikroskop konserviert. Hierfür wurden diese mit *VECTASHIELD[®] Mounting Medium* eingedeckt, mit einem Deckglas bedeckt und mit Nagellack versiegelt.

2.5 Analyse der Genexpression

2.5.1 RNA-Isolation

Benötigte Reagenzien: PBS (Tab. VIII), 2-Mercaptoethanol für RNA-Isolation (Tab. I), Ethanol 70% (Tab. I), Nucleo Spin RNA Kit Reagenzien (Tab. I), DNAse Reaktionsmix (Tab. VIII)

Durchführung: Zur Isolation der RNA wurde das *Nucleo Spin RNA* Kit verwendet, welches alle benötigten Reagenzien und Verbrauchsmaterialien, abgesehen von Zellschabern und 70% Ethanol, und das Isolationsprotokoll enthielt.

Die Zellen wurden zunächst 3x mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 350 µl RA1 Lysispuffer auf die Zellen gegeben und die Zellen durch einen Zellschaber vom Plastik gelöst. Das Lysat wurde in ein Reaktionsgefäß überführt, welchem 3,5 µl 2-Mercaptoethanol für RNA-Isolation hinzugefügt wurde. Nach Vortexen der Probe wurde diese in eine violette Filtersäule mit Auffanggefäß überführt und 1 min bei 11 g zentrifugiert. Zum Filtrat wurden 350 µl Ethanol (70%) zur Bindung der RNA gegeben und die Suspension in eine blaue Filtersäule mit Auffanggefäß gegeben. Es folgte die Zentrifugation für 30 sec bei 11 g, bei der die RNA im Filter gebunden wurde. Das Filtrat wurde verworfen. Nach Hinzufügen von 350 µl MDB-Puffer zum Entsalzen der Membran wurde wieder 1 min bei 11 g zentrifugiert und das Filtrat erneut verworfen. Nun wurden 95 µl vorbereiteter RNAse freier DNAse Reaktionsmix zum Verdau von DNA auf die Membran gegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten drei Waschschritte mit Zentrifugation und Verwerfen des Filtrates: 1.) 200 µl RA2 und 30 sec bei 11 g, 2.) 600 µl RA3 und 30 sec bei 11 g, 3.) 200 µl RA3 und 2 min bei 11 g. Nun wurde das Auffanggefäß entfernt und die Filtersäule in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Es folgte zur Elution der RNA aus der Membran die Gabe von 50 µl RNAse und DNAse freiem H₂O auf die Membran und die Zentrifugation von 1 min bei 11 g. Die erhaltene RNA-Suspension wurde bei -20 °C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert.

Isolation von RNA aus MMB: Jeweils 4 MMB (2.2.8.3) wurden für eine RNA-Isolation verwendet. Hierbei wurde zunächst das Medium aus den Zentrifugenröhrchen entfernt und 2 ml *PBS* hinzugegeben, um restliche Mediumrückstände zu entfernen. Die MMB wurden mit einer 1000 μ l Pipette zusammen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mitüberführtes *PBS* mit einer 10 μ l Pipette entfernt. Es wurden 350 μ l *RA1-Lysispuffer* und 3,5 μ l β -Mercaptoethanol für RNA Isolation hinzugefügt und das nachfolgende Lysieren der Proben durch Vortexen unterstützt. Nun wurde weiter das oben in 2.5.1 beschriebene Protokoll zur RNA-Isolation verwendet.

2.5.2 Reverse Transkription

Um die Genexpression untersuchen zu können ist es erforderlich, die isolierte RNA in komplementäre DNA (cDNA) durch Einsatz einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase umzuschreiben.

Benötigte Reagenzien: DNAse und RNAse freies H_2O (aus Nucleo Spin RNA Kit, Tab. I), isolierte RNA, RevertAidTM H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Tab. I)

Vorbereitung: Da bei der Synthese der cDNA eine definierte Konzentration von RNA (500 ng) verwendet werden soll, musste vor Beginn die Konzentration der isolierten RNA bestimmt werden. Hierfür wurde die RNA mit *DNAse und RNAse freien* H_2O 1:50 verdünnt, die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm, die spezifisch für Nukleinsäuren ist, bestimmt und mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes die Konzentration in RNA [ng]/µl umgerechnet. Des Weiteren wurde die Absorption bei 280 nm und das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm mit einem Zielwert von 1,7 bis 2,0 bestimmt, um eine grobe Verunreinigung mit Proteinen auszuschließen.

Durchführung: Die Durchführung erfolgte stets auf Eis. 500 ng RNA wurden mit DNAse und RNAse freiem H₂O auf ein Volumen von 11 µl aufgefüllt. Es wurde 1 µl *OligoDT-12-18-Primer* hinzugegeben und die Lösung 10 min bei 70 °C inkubiert. Es folgte das Abkühlen der Probe auf Eis und die Zugabe von 4 µl *5x Reaktionspuffer*, 1 µl *RiboLock*TM *RNAse Inhibitor*, 2 µl *dNTP* Mix (10 mM von jedem Trinukleotid) und 1 µl *RevertAid*TM *H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase*. Die Probe wurde nun 60 min für die reverse Transkription bei 42 °C und nachfolgend 10 min bei 70 °C zur Beendigung der Reaktion inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei -20 °C bis zur Weiterverwendung gelagert.

2.5.3 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ermöglicht es, definierte Abschnitte der DNA zu amplifizieren, um sie in einem späteren Schritt nachzuweisen [140]. Die Reaktion besteht aus drei sich wiederholenden Schritten, die eine Amplifikation des gewünschten Abschnittes bedingen:

- 1) Denaturierung der DNA: Aus einer Doppelstrang DNA werden zwei Einzelstränge.
- Bindung (=Annealing) von sequenzspezifischen Primern an definierte Stellen der Einzelstränge.
- 3) Komplementäre Elongation durch eine thermostabile DNA-Polymerase.

Benötigte Reagenzien: PCR-Mastermix (Tab. XIX), dNTP-Mix (10 mM jedes Trinukleotides), cDNA (2.5.2)

Durchführung: Die Durchführung erfolgte stets auf Eis. Je 23,25 μ l Mastermix und 0,75 μ l cDNA wurden in ein Reaktionsgefäß einer *Multiply* μ *StripPro 8er Kette* gefüllt und in einen vorgeheizten PCR-Cycler überführt. Das durchgeführte Programm war bis auf die Anzahl der Primer-spezifischen Zyklen und Primer-spezifischen Annealing-Temperatur bei allen durchgeführten Versuchen identisch:

- 1) 2 min 95 °C
- 2) <u>Anzahl der Zyklen (Primer-spezifisch; Tab. II)</u>
 40 sec 95 °C (Hitzedenaturierung)
 40 sec Annealing Temperatur (Primer-spezifisch; Tab. III)
 40 sec 72 °C
- 3) 8 min 72 °C

Am Ende wurden die Proben zunächst auf 4 °C heruntergekühlt und für maximal 3 Tage zur weiteren Verwendung bei dieser Temperatur gelagert. Zur Langzeitlagerung wurden die Proben bei -20 °C abgefroren. Stets wurde eine Positivkontrolle (muriner Embryo 19 d) und eine Negativkontrolle (Mastermix mit *DNAse und RNAse freiem H₂O* anstelle der cDNA) mitgeführt. Um die Amplifikation genomischer DNA auszuschließen wurden die einzelnen Primer eines Primerpaares aus zwei verschiedenen Exons ausgewählt.

2.5.4 Elektrophoretische Analyse der PCR-Amplifikate

Sofern die untersuchten Zellen das spezifische Gen exprimierten, wurden bei der PCR exponentiell viele DNA-Stränge einer definierten Anzahl von Basenpaaren geschaffen, die in der Elektrophorese nachgewiesen werden konnten.

Hier beruht das Prinzip darauf, dass DNA negative Ladung trägt und im elektrischen Feld wandert. Große DNA-Fragmente laufen langsamer als kleine. Zur Orientierung wurde eine "Messskala" (100 bp DNA Ladder) mit auf das Gel aufgetragen. Unter UV-Licht wurden durch Ethidiumbromid-Inkorporation in die DNA die jeweiligen Banden sichtbar.

Benötigte Reagenzien: Agarose (Tab. I), Ethidiumbromid (Tab. I), 100 bp DNA Ladder (Tab. I), PCR-Proben (2.5.3)

Durchführung: Zunächst wurde das Agarosegel gegossen. Hierzu wurden 2% Agarose in *TBE (1x)* durch Erhitzen in einer Mikrowelle gelöst und dann 0,0025% *Ethidiumbromid* hinzugegeben. Die Lösung wurde in eine spezielle mit Klebestreifen abgedichtete Gelhalterung gegossen. Um Taschen für die Proben zu formen, wurde ein spezieller Plastikkamm an der Halterung befestigt. Nach Erstarren des Gels wurden Kamm und Klebestreifen entfernt und das Gel in eine mit *TBE (1x)* befüllte *Sub-Cell GT Wide mini* Kammer überführt. Es folgte das Auftragen von 15 µl *100 bp DNA Ladder ("Messskala")* und je 12 µl Amplifikat. Nachfolgend wurde für 40 min eine Spannung von 100 V aufgebaut und danach die Gele unter UV-Licht fotografiert.

Auswertung: Die Auswertung der Fotos erfolgte mit der Software *ImageJ*. Hierbei wurden die Banden photodensitometrisch ausgemessen. In der Regel erfolgte eine semiquantitative Auswertung, indem z.B. die Banden des untersuchten Gens zu denen eines Housekeeping Gens (Tab. IX) ins Verhältnis gesetzt wurden.

2.5.5 Analyse der EPO-Expression unter Normoxie und Hypoxie (2% O₂)

Versuchsaufbau: Isolierte renale Zellen wurden in einer Dichte von 10.000 Zellen/cm² plattiert, anschließend bis zu 72 h in Hypoxie (2% O₂) kultiviert und nachfolgend die EPO-Produktion durch mRNA-*in situ*-Hybridisierung und quantitative RT-PCR (qRT-PCR) untersucht. Als Kontrolle wurden zum einen in Normoxie (21% O₂) kultivierte Zellen und bei der mRNA-*in situ*-Hybridisierung zusätzlich murine isolierte Fibroblasten der Haut verwendet.

2.5.5.1 mRNA-in situ-Hybridisierung zum Nachweis von EPO

Die *in situ*-Hybridisierung ist eine Methode, um Nukleinsäuren, wie z.B. RNA oder DNA in einzelnen Zellen *in situ*, d.h. ohne die Zelle zu zerstören, nachzuweisen. Verwendet wurde hier eine an Digoxigenin gebundene Sonde, die komplementär, also anti-sense, zu den nachzuweisenden Basen des entsprechenden exprimierten Exons ist. In einem weiteren Schritt wurde dann die Sonde durch einen FITC-gekoppelten Sekundärantikörper sichtbar gemacht. Als Negativkontrolle wurde neben murinen Fibroblasten sowohl die sense-Sonde, als auch nur der Sekundärantikörper verwendet.

Benötigte Reagenzien: PBS (Tab. VIII), Lösungen für die EPO-*in situ*-Hybridisiertung (Tab. X), RNAse und DNAse freies H_2O (aus Nucleo Spin RNA Kit, Tab. I), 50/70/95/100% Ethanol (Tab. I, jeweils mit *RNAse und DNAse freiem* H_2O angesetzt)

Verwendung der Sonden: In den Versuchsreihen wurden zwei verschiedene Sonden verwendet. Die zunächst verwendete Sonde war ein Geschenk aus der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Kai-Uwe Eckardt der Universität Erlangen und sollte 221 bp des EPO-Exons 1 umfassen. Auf Grund der negativen Ergebnisse mit dieser Sonde wurde eine Sequenzierung der sense- und anti-sense-Sonde veranlasst (2.5.5.2).

Da die Sequenzierung der Sonden ergab, dass eine geringe Spezifität der Sonden für EPO-mRNA bestand (3.2.2) wurde im Rahmen einer Kooperation mit PD Dr. Olaf Jöhren, Institut für Pharmakologie und Toxikologie (Prof. Dr. med. Markus Schwaninger), Universität zu Lübeck, eine neu synthetisierte Sonde hergestellt.

Um 1 μ g der jeweiligen Sonde verwenden zu können, war zunächst die Konzentrationsbestimmung erforderlich. Hierfür wurde 1 μ l Sonde mit 49 μ l *RNAse und DNAse freiem H*₂*O* verdünnt und die Konzentration photometrisch mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes bestimmt.

Durchführung: Die Fixierung der Präparate erfolgte entweder in Normoxie bei Raumtemperatur oder in Hypoxie (2% O₂) bei 37 °C. Hierfür wurde zunächst das Medium durch zweimaliges Waschen mit *PBS* entfernt und mit 1 ml *Fixierungslösung* pro Chamber 20 min inkubiert. Nachfolgend wurden die Präparate wieder 2x mit *PBS* gewaschen, bevor sie 15 min bei 70 °C mit 2x SSC denaturiert wurden. Die Proben wurden erneut mit *PBS* gewaschen und 5 min bei Raumtemperatur mit *Fixierungslösung* inkubiert. Es wurde zunächst mit *PBS*, dann mit 2x SSC gewaschen, bevor in 5 Schritten die Präparate dehydriert (50%, 70%, 95%, 100%, 100% Ethanol) und anschließend luftgetrocknet wurden. Pro Chamber wurden 500 µl *Prähybridisierungslösung* auf die Zellen gegeben und 3 h bei 45 °C inkubiert. Kurz vor Ablauf dieser Zeit wurde die zu verwendende EPO-Sonde 2 min in einem 80 °C Wasserbad denaturiert und das Wiederanlagern der beiden Nukleotidstränge durch schnelles Abkühlen in Eiswasser verhindert. Anschließend wurde 1 μ g der Sonde pro verwendeten "CultureSlide" der *Hybridisierungslösung* hinzugefügt und diese für eine Inkubation bei 45 °C über Nacht auf die Zellen gegeben. Um ein Austrocknen der Präparate zu verhindern, wurden die Proben mit *Parafilm* versiegelt und in einer feuchten Kammer aufbewahrt.

Am nächsten Tag wurden die Proben je 15 min pro Schritt bei 45 °C zweimal mit 2x SSC, einmal mit 0,2x SSC, zweimal mit 0,01x SSC und anschließend kurz mit PBS gewaschen. 300 µl der Anti-DIG-Antikörperlösung wurden pro Chamber verwendet und nach 1,5 h bei 75 rpm und 37 °C Inkubation 3x mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Präparate konserviert (2.4.6).

Auswertung: Die Auswertung der Präparate erfolgte am Fluoreszenzmikroskop. Ziel war es, die Morphologie und den prozentualen Anteil EPO-produzierender Zellen zu analysieren.

2.5.5.2 DNA-Sequenzierung

Bei einer Sequenzierung werden komplette Basenabfolgen von Nukleinsäuren, wie RNA oder DNA, dargestellt. Die Sonden für die mRNA-*in situ*-Hybridisierung wurden mit technischer Unterstützung durch Mitarbeiter des Medizinischen Versorgungszentrums MVZ Dr. Kramer & Kollegen, LADR GmbH, Lauenburger Str. 67, 21502 Geestacht, Abteilung für Molekularbiologie (Dr. rer. nat. Armin Pahl), unter Verwendung einer automatisierten DNA-Sequenzierung nach Sanger [141] analysiert.

Diese Methode basiert auf dem Prinzip, bei einer Synthetisierung komplementärer Stränge durch Zugabe von spezifischen Basen Strangabbrüche zu erzeugen. Die Fragmente werden dadurch generiert, dass den hinzugegebenen Basen jeweils eine freie 3'OH Gruppe zur Polymerisierung fehlt. Die verschiedenen Fragmente haben unterschiedliche Längen und enden immer mit einer der hinzugegebenen Basen. Diese sind mit Floureszenzfarbstoffen markiert und können mit einem spezifischem Laser-Photometer sichtbar gemacht werden. Durch Anwendung der Elektrophorese werden die Fragmente ihrer Länge nach aufgetrennt. Somit können dann immer die letzten Basen eines Fragments abgelesen und zu einer kompletten Nukleinsäuresequenz zusammengefügt werden.

2.5.5.3 Realtime quantitative RT-PCR

Die realtime qRT-PCR wurde mit technischer Unterstützung von MTA Gabriele Huck und Dr. Thomas Hellwig-Bürgel, Institut für Physiologie (Prof. Dr. W. Jelkmann), Universität zu Lübeck, durchgeführt. Die realtime qRT-PCR unterscheidet sich von der semiquantiativen RT-PCR (2.5.3) durch die Möglichkeit, quantitative Aussagen über die amplifizierten Genomabschnitte zu treffen. Die quantitative Messung wird hierbei durch Detektion der Fluoreszenzintensität durchgeführt, da die synthetisierten Stränge hier durch SYBR-Green, einem Cyanin-Farbstoff, markiert sind. RNA-Isolation und cDNA-Synthese für die verwendeten Proben erfolgte nach dem internen Standard des Instituts für Physiologie, Universität zu Lübeck (Prof. Dr. W. Jelkmann). Als Housekeeping-Gen wurde *l28* verwendet (Tab. III).

RNA-Isolation: Die RNA-Isolation erfolgte mit Hilfe der *ABI Prism 6100 Nucleic Acid PrepStation* und dem dazugehörigen Protokoll des Herstellers Applied Biosystems.

Hierfür wurde eine spezielle aus Filtersäulen bestehende 96-Well Platte (RNA Purification Tray) in das Haltegummi des nach hinten geschobenen Halters gesetzt und nicht benötigte Säulen mit Klebeband abgeklebt. Nachfolgend wurde das Programm "RNA Cell" gewählt, die Apparatur nach vorne geschoben und eine 96-well Abfallplatte (Splash Guard) in der unteren, hinteren Halterung fixiert. Am Ende der diversen Waschvorgänge, die mit den zugehörigen Waschlösungen (RNA Purification Wash Solution 1 und 2) durchgeführt wurden, wurde eine 96-Well Platte zur RNA-Elution (Microplate) in die vordere Halterung gesetzt. In dieser befand sich nach Zugabe von Elutionslösung auf die Filtersäulen (Nucleic Acid Purification Solution) dann die isolierte RNA.

Reverse Transkription: Benötigte Reagenzien: RNA, SuperScript III Reverse Transcriptase-Puffer (Tab. I), 2,5 mM dNTP (Tab. I), OligoDT 12-18 Primer (Tab. I), RNAse und DNAse freies H₂O (aus Nucleo Spin RNA Kit, Tab. I), SuperScript III Reverse Transcriptase (Tab. I).

Durchführung: 10 μ l RNA wurden mit 2,5 μ l OligoDT 12-18 Primer und 2 μ l RNAse und DNAse freiem H₂O gemischt, abzentrifugiert und für 15 min bei 68 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die Probe 15 min auf Eis abgekült und 5 μ l SuperScript III Reverse Transcriptase-Puffer, 5 μ l 2,5 mM dNTP und 0,25 μ l SuperScript III Reverse Transcriptase hinzugefügt. Nach Mischung und Zentrifugation wurden die Proben 45 min bei 42 °C, 45 min bei 52 °C und anschließend 10 min bei 100 °C inkubiert.

Benötigte Reagenzien für die realtime qRT-PCR: qPCR SYBR-Mastermix (Tab. VIII), Primerpaar (Tab. III), RNAse und DNAse freies H₂O (aus Nucleo Spin RNA Kit, Tab. I) **Vorbereitung der Proben:** Für die Analyse des Housekeeping-Gens *l28* wurde die cDNA in drei Schritten insgesamt 1:1000 verdünnt. Dieses war erforderlich, da im Rahmen der Auswertung die Ergebnisse der *epo*-qRT-PCR in Verhältnis zu den Ergebnissen der *l28*-qRT-PCR gesetzt wurden und eine *epo*-Expression nur in sehr wenigen Zellen erwartet wurde.

Durchführung: 20 µl des *qPCR SYBR-Mastermix* wurden zusammen mit 5 µl cDNA in eine 96-Well qRT-PCR-Platte (*microAmp Optical 96-well Reaction Plate with Barcode*) pipettiert. Die Platte wurde mit Folie versiegelt und in das qRT-PCR-Gerät *Abiprism 7000* überführt und folgendes Protokoll gestartet:

- 1) 2 min 50 °C
- 2) <u>Zyklen (40x)</u> 15 sec 95 °C (Hitzedenaturierung) 60 sec 60 °C (Annealing Temp.)

Auswertung: Nach Kontrolle der zu den Proben zugehörigen Dissoziationskurven wurde die Berechnung der relativen Expression von *epo* mit der $\Delta\Delta$ cT-Methode (normiert auf *l28*) durchgeführt und die Ergebnisse graphisch ausgewertet. Der Threshold, der definierte Wert ab welchem die Fluoreszenzen ausgewertet wurden, wurde 2-3 ct-Werte nach Ansteigen der gemessenen Fluoreszenzen festgelegt.

2.6 Statistische Auswertung

Die dargestellten Daten sind Resultate unabhängig reproduzierter Versuche, die, soweit nicht anders gekennzeichnet, mindestens mit n=3 durchgeführt wurden. Wenn nicht anders angezeigt, wurden in den Abbildungen Mittelwerte \pm Standardfehler (standard error, SE), dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm *Sigma Plot 2000* (Systat, Erkrath, Deutschland). Die Signifikanzen wurden mit Hilfe des Student's t-Test ermittelt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Isolation und Charakterisierung mesenchymaler Stromazellen der Maus

3.1.1 Die Isolation mesenchymaler Stromazellen aus Niere, Lunge, Darm und Knochenmark ist möglich.

Basierend auf dem beschriebenen publizierten Protokoll (2.1.1) zur Isolation mesenchymaler Stromazellen (MSC) aus der Niere konnten zunächst im Rahmen der vorliegenden Arbeit nur reproduzierbar plastikadhärente Zellen aus Lungengewebe und nicht aus den anderen Geweben isoliert und auf Zellkulturplastik übertragen werden. In den nachfolgenden Isolationen wurden die für die enzymatische Verdauung der extrazellulären Matrix von Niere, Lunge und Darm verwendete Konzentration der Kollagenase A auf 0,6% (Ausgangskonzentration: 250 U/l, Endkonzentration: 1,5 U/l) und die der verwendeten Dispase 2 auf 2,4% (Ausgangskonzentration: 33,3 U/l, Endkonzentration: 0,8 U/l) gesenkt. So ließen sich auch plastikadhärente Zellen aus Nieren zuverlässig isolieren. Die Isolation aus Dickdarm war außerordentlich schwierig. Es gelangen nach Änderung des Protokolls lediglich fünf Isolationen aus Darm, von denen allerdings nur zwei für Versuche ausreichend proliferierten und passagierungsstabil waren. Weitere elf Isolationen aus dem Darm verliefen aus nicht bekannten Gründen frustran ohne Generierung plastikadhärente Zellen.

Die Isolation von plastikadhärenten Zellen aus Knochenmark (KM) sowie die Isolation von Fibroblasten aus der Bauchhaut verlief problemlos.

Für die Auswertung wurden nur Isolationen berücksichtigt, die plastikadhärente Zellen erbrachten.

3.1.2 Plastikadhärente Zellen aus Niere, Lunge, Darm und KM bilden Colony-Forming-Unit-Fibroblasts.

Vor Erreichen der Konfluenz wurde die Anzahl der Colony-Forming-Unit-Fibroblasts (CFU-F) bestimmt (Abb. 4 A). Der Vergleich der verschiedenen Organe zeigte zunächst signifikant weniger CFU-F in Darmisolaten und hochsignifikant weniger CFU-F in KM-Isolaten jeweils im Vergleich zu Nierenisolaten. Die Signifikanz konnte jedoch nicht bestätigt werden, sobald als zusätzlicher Faktor das Organgewicht mitbestimmt wurde, um eine unterschiedliche Anzahl von Kolonien allein durch Massenunterschiede auszuschließen (Abb. 4 B). Auf Grund der geringen Gewebemenge war es allerdings nicht möglich, das Organgewicht von KM zu bestimmen. Die p-Werte nach Gewichtsadaption waren zwar nicht signifikant (Niere:Lunge = 0,239; Niere:Darm = 0,087), jedoch konnte

eine Tendenz von mehr isolierten CFU-F in der Niere im Vergleich zum Darm festgestellt werden.

Beim Vergleich der Morphologie der Kolonien verschiedener Organe fällt auf (Abb. 4 C-F), dass sich die Kolonien von Niere-, Lunge- und Darm-Isolaten in der Regel deutlich lokal organisierter und mehr in einem Verbund darstellten als die der KM-Isolate.



3.1.3 Plastikadhärente Zellen aus Niere, Lunge, Darm und KM sowie Haut-Fibroblasten lassen sich durch Analyse der Morphologie nicht sicher voneinander unterscheiden.

Nach Isolation und vor jeder Passagierung wurden alle Zellen bezüglich Ihrer Morphologie untersucht. Haut-Fibroblasten waren die einzigen Zellkulturen, die über ein homogenes Zellbild aus spindelförmigen Zellen mit zwei oder drei Zellausläufern und einen Zellkern mit schmalen Zytoplasmasaum verfügten (Abb. 5 L, M). In allen anderen Zellkulturen konnten mehrere verschiedene Zellmorphologien nachgewiesen werden. Im Wesentlichen (>90%) konnte man viele spindelzellige, fibroblastoide Zellen mit geringem Zytoplasmasaum, welche an der CFU-Bildung beteiligt waren (Abb. 5 A-E, G, J), von wenigeren (<10%), von CFUs eher entfernt wachsenden, größeren runden oder quaderförmigen Zellen mit prominenten Zellkern und breitem Zytoplasmasaum (Abb. 5 F, H, I, K) unterscheiden. Auf Grund der hohen Variabilität der Zellformen war es nicht ohne weiteres möglich, die Zellen allein durch Durchlichtmikroskopie einzuteilen. In allen Zellkulturen konnten diese verschiedenen Zelltypen auch in höheren Passagen nachgewiesen werden. Lediglich bei einem Wachstum über die Konfluenz hinaus waren die größeren Zellen passagenunabhängig nicht mehr nachweisbar. Des Weiteren bildete sich in diesen Fällen häufig ein weißliches, auch durch wiederholtes Resuspendieren nicht zerstörbares bindegewebeartiges Aggregat, aus welchem auf Zellkulturplastik erneut fibroblastoide Zellen herauswuchsen.

Auf Grund der hohen morphologischen Variabilität ist es schwierig, Unterschiede zwischen den einzelnen Organisolaten herauszuarbeiten. Betrachtet man die CFU-bildenden Zellen, so fällt auf, dass das CFU-Zentrum bei Darm- und Nierenisolaten zu verschmelzen scheint (Abb. 5 A, G) – im Gegensatz zu CFUs aus Knochenmark und Lunge, die eher mit Ausbreitung nach peripher zu wachsen scheinen (Abb. 5 L, J).



Abbildung 5: Vergleich der Morphologie unterschiedlicher mesenchymaler Zellen.

Des Weiteren unterscheiden sich die CFU-bildenden Zellen unterschiedlicher Organe (Abb. 5 A-E, G, J) trotz des insgesamt fibroblastoiden Erscheinens in geringer Weise in ihrer Morphologie voneinander: Lungenzellen sind Fibroblasten sehr ähnlich (Abb. 5 D, E, L, M), Darmzellen haben ein eher runderes Erscheinungsbild (Abb. 5 G) und Zellen des

Knochenmarks sind kleinere fibroblastoide Zellen, welche weniger Kontakt zu anderen Zellen zu haben scheinen (Abb. 5 J). Die Nierenzellen weisen zum Teil weniger prominente Zellkerne auf und sind spindelförmig (Abb. 5 B), zeigen jedoch in anderen Fällen auch eine rundliche, den Darmzellen ähnliche Zellmorphologie (Abb. 5 A).

3.1.4 Zellen aus Niere, Lunge, Darm und KM sowie Haut-Fibroblasten weisen in Normoxie eine höhere Proliferationsrate als in Hypoxie auf.

Mit Hilfe von BrdU-Inkorporation wurde die Teilungsrate und damit die Proliferationrate der isolierten Zellen analysiert (Abb. 6). In 13 der insgesamt 17 untersuchten Proben fand sich eine bessere Proliferation in Normoxie (NOX) als in Hypoxie mit 2% O_2 (HOX). Im Vergleich der Organe zeigte sich unter Hypoxie bei Nierenzellen eine signifikant geringere Proliferation als bei Lungenzellen.

Des Weiteren wurde das Proliferationsverhalten von drei unabhängigen Nierenzellisolaten nach 24, 48 und 72 h bestimmt (Abb. 7). Überraschenderweise zeigte sich hier, trotz identischer Isolation und Behandlung, ein ausgeprägt heterogenes Bild des Wachstumsverhaltens der einzelnen Isolate über den Untersuchungszeitraum. Dieses Ergebnis ist statistisch signifikant: Beim Vergleich stellen sich 15 der 18 Werte hoch-(p < 0,005), bzw. höchstsignifikant (p < 0,0001) unterschiedlich dar, 3 Werte wichen nicht signifikant voneinander ab (NOX: A 72 h zu C 72 h; HOX: A 72 h zu B 72 h; A 72 h zu C 72 h; Signifikanzwerte nicht dargestellt). Signifikant bewiesen werden konnte hier in den drei unabhängigen Versuchen zudem die oben beschriebende Tendenz der höhere Teilungsrate unter NOX in Vergleich zu HOX. Dies konnte auch nach 72 h Versuchszeit in zwei der drei Versuche gezeigt werden.





3.1.5 Plastikadhärente Zellen aus Niere, Lunge, Darm und KM sowie Haut-Fibroblasten verfügen über Telomeraseaktivität.

Für die Bestimmung der Telomeraseaktivität wurde das sog. TRAP-Assay, verwendet. In allen isolierten, plastikadhärenten Zellpopulationen konnte eine Telomeraseaktivität nachgewiesen werden. Statistisch relevante Unterschiede zwischen den verschiedenen Organen ergaben sich nicht (Abb. 8).



3.1.6 Plastikadhärente Zellen aus Niere, Lunge, Darm und KM sowie Haut-Fibroblasten lassen sich durch Analyse der Oberflächenmarker voneinander unterscheiden.

Mit Hilfe der Durchflusszytometie wurde die Expression verschiedener Oberflächenmarkermoleküle analysiert. Die Ergebnisse wurden unter den verschiedenen Organen verglichen. Als positive Expression wurden Ergebnisse mit Nachweis des Antigens über 10% der analysierten Zellen definiert. Alle Zellisolate exprimierten CD29, CD44, CD54, CD73, CD81, CD140b und CD166.

Das auch als hämatopoetischer Marker beschriebene Oberflächenmolekül CD34 wurde sehr eingeschränkt nachgewiesen, jedoch fanden sich in Lunge, Darm und Knochenmark gemittelte Expressionswerte von CD34 bis 29%. In keinem Zellisolat wurde das Panleukozytenmarkermolekül CD45 exprimiert.

Alle unterschiedlichen Zellpopulationen können mit dieser durchgeführten Analyse der Oberflächenmarkermoleküle mit statistischer Signifikanz voneinander abgegrenzt werden. Auch können die mesenchymalen Zellen aus Niere, Lunge, Darm und KM von Fibroblasten der Haut unterschieden werden (Abb. 9).



3.1.7 Mesenchymale renale Zellen lassen sich mit Hilfe von Immunfloureszenzfärbungen und RT-PCR von Haut-Fibroblasten abgrenzen.

Um die renalen Zellen näher zu charakterisieren wurden Immunfloureszenz-Färbungen (in Passage 4 oder Passage 9) und RT-PCR-Analysen (in den Passagen 4, 6, 9, 11) durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen in NOX mit Standardmedium kultiviert. Zur Abgrenzung von Fibroblasten wurden alle Versuche auch mit isolierten Haut-Fibroblasten (Passage 5) als Kontrolle durchgeführt (Abb. 10).

An Tag 5 der Kultivierung konnten in den Kulturen durch Immunfärbungen keine podozytären Marker, wie Podocalyxin, Podocin und Nestin, keine tubulären Marker, wie THP und RSOR, sowie keine perizytären Marker, wie PECAM I und β_1 -NO-GC-AB, nachgewiesen werden. Ebenfalls konnte das häufig mit EPO koexprimierte CD73 nicht mittels Immunfärbung detektiert werden (Daten nicht dargestellt). Wie alle Fibroblasten waren auch alle renalen untersuchten Zellen positiv für α -SMA. Weniger als 1% der renalen Zellen waren zudem zusätzlich mit S100A4 anfärbbar.

Des Weiteren zeigten renale Zellen vereinzelt einige Cytokeratin positive Zellinseln (Abb. 10 A). In einigen wenigen konnte zusätzlich Nephrin nachgewiesen werden (Abb. 10 B). Sämtliche untersuchte Fibroblasten waren für beide Marker negativ (Abb. 10 C).

Zudem wurde orientierend die Expression verschiedener Marker mittels RT-PCR am 2. Tag der Kultivierung analysiert. Sowohl in Fibroblasten-, als auch in allen renalen Zellkulturen, konnte eine Genexpression podozytärer Marker, wie *podocalyxin* und *fat*, eine Expression des von mesenchymalen und epithelialen Zellen produzierten *egfr* und *wnt4* und des frühen nephro- und neurogenen Markers *emx2* sowie des proximalen Tubulusmarkers *h3h* nachgewiesen werden. Der endo- und mesenchymale Marker *lim1* wurde zwar von allen Fibroblastenkulturen, jedoch nur von zwei renalen Zellkulturen exprimiert (Daten nicht dargestellt).

Unterschiede zwischen Fibroblasten und renalen Zellen ergab die RT-PCR-Analyse des nephrogenen Markers *pax8*, des podozytären Markers *podocin*, des tubulären Markers *ksp-cadherin* und von *epo*. Die Expression dieser Gene konnte nur in renalen Zellen nachgewiesen werden (Abb. 10).



3.1.8 Isolierte Zellen der Niere und des KM zeigen eine eingeschränkte adipogene, chondrogene und osteogene Differenzierungsfähigkeit.

Ein wichtiges Merkmal multipotenter mesenchymaler Stromazellen (MSC) ist ihre Differenzierungsfähigkeit in verschiedene differenzierte mesenchymale Zellen. Auf Grund der Fragestellung dieser Doktorarbeit wurden vor allem Nierenzellen mit Hilfe etablierter Induktionsmedien auf ihre adipogene, chondrogene und osteogene Differenzierungsfähigkeit untersucht. Als Positivkontrolle wurden Knochenmark (KM)-Zellen und als Negativkontrolle Fibroblasten verwendet.

Mit beinahe allen Zellen war eine problemlose Versuchsdurchführung möglich. Ausnahme bildeten hier nur die Fibroblasten, die nicht in der Lage waren, MMBs (2.2.8.3) für die chondrogenen Differenzierungsversuche zu bilden. Die Versuche konnten zwar plangemäß angesetzt werden, jedoch lösten sich die MMB aus Haut-Fibroblasten während des Versuchsablaufes auf.

Die Versuche wurden mit Hilfe von RT-PCR-Analysen (Abb. 11) verschiedener Differenzierungsmarker und anhand verschiedener Färbungen (Abb. 12) ausgewertet.

Betrachtet man die Ergebnisse der RT-PCR der verschiedenen Differenzierungsversuche, so fallen im Vergleich der Kulturen deutliche Unterschiede der Expression der verwendeten Gensequenzen auf.

Die Auswertung der adipogenen Differenzierungsversuche ergab nur für Fibroblasten eine Zunahme der *adipsin*-Expression, die *ppar* γ -Expression hingegen nahm nur bei Nierenzellen zu. Die *aP2*-Expression zeigte bei KM-Zellen und Fibroblasten eine Zunahme. Bei Nierenzellen war hingegen die stärkste Expression von *aP2* bereits an Tag 8 nachweisbar (Abb. 11 A).

Bei Betrachtung der Ergebnisse der osteogenen Differenzierungsversuche zeigt nur bei den Nierenzellen die runx-Expression eine Zunahme über den Differenzierungsverlauf. Bei Fibroblasten und KM-Zellen ändert sich das Expressionsniveau von runx2 über den Verlauf der Kultivierung nicht. Ähnlich ist das Ergebnis bezüglich der Osteopontinexpression. Das Expressionsniveau verändert sich bei nur den Fibroblastenkulturen und hat das Maximum bereits an Tag 7, gefolgt von einem Abfall bis Tag 28 (Abb. 11 B).

Die chondrogene Differenzierung war nur bei KM-Zellen nachweisbar, die zunehmend bis zum Ende des Versuches die Expression des knorpelspezifischen Marker *aggrecan* steigerten (Abb. 11 C).



Abbildung 11: Analyse der Differenzierungsfähigkeit verschiedener Zellen mit Hilfe von RT-PCR. Renale mesenchymale Stromazellen wurden durch spezielle Induktionsmedien auf Differenzierungsfähigkeit zu (A) adipogenen, (B) osteogenen und (C) chondrogenen differenzierten Zellen untersucht (n=4). Als Positivkontrolle dieser Versuche dienten mesenchymale Zellen aus dem Knochenmark (n=3), als Negativkontrolle Fibroblasten (n=1). (-) H₂O, (+) 19d Embryo.

Es bildete sich in keinem Versuch eine durch entsprechende Färbungen nachweisbare, homogen differenzierte Zellpopulation. Vielmehr waren die differenzierten adipogenen, chondrogenen oder osteogenen Zellen in der Minderheit (Abb. 12). Eine Zunahme differenzierter adipogener oder osteogener Zellen bis Tag 28 in der Gesamtpopulation konnte in keinem Fall gezeigt werden (Daten nicht dargestellt). Dieses Ergebnis war nicht nur auf die renalen Zellen beschränkt, sondern ergab sich auch bei KM-Zellen und HautFibroblasten. Aussagen über die chondrogene Differenzierungsfähigkeit der Haut-Fibroblasten sind auf Grund der fehlenden Fähigkeit stabile MMBs zu bilden in dieser Arbeit nicht möglich.



3.2 Analyse der *epo*-Expression renaler Zellen

3.2.1 Die Expression von *epo* kann in renalen Zellen mit Hilfe von qRT-PCR nachgewiesen werden.

Fünf unabhängige Isolate renaler Plastik-adhärenter Zellen wurden mit Hilfe von qRT-PCR nach Kultivierung in NOX oder HOX auf die Expression von *epo* hin untersucht. In zwei Isolaten wurde *epo*-mRNA nachgewiesen, sowohl in HOX als auch in NOX. Insgesamt zeigte sich im Vergleich von NOX zu HOX ein vergleichbar großer Anteil des positiven Nachweises der Expression von *epo* in der Gesamtheit aller Proben (Abb. 13 A, B).

Bei näherer Betrachtung der relativen *epo*-mRNA-Konzentrationen der beiden *epo*-positiven Isolate (Abb. 13 C, D) wurde keine Konzentrationserhöhung durch HOX nachgewiesen. Vielmehr fiel auf, dass trotz des positiven Nachweises einer *epo*-Expression in den untersuchten Isolaten (Abb. 13A) im Gesamtdurchschnitt aller Proben 44% der Einzelproben negativ waren (Abb 13 C, D).

Die nachgewiesene *epo*-mRNA-Menge war sehr gering. In positiven Proben konnte im Mittel erst nach 35 PCR Zyklen ein positives Ergebnis verzeichnet werden. Zum Vergleich und zur Standardisierung wurde *l*28 als Housekeeping-Gen mitbestimmt, welches, nach 1000facher Verdünnung, im Mittel nach 19 Zyklen nachweisbar war. Der Cut off wurde bei 40 Zyklen festgesetzt, um den Anteil unspezifisch-positiver Ergebnisse zu reduzieren.



3.2.2 Die Anwendung einer EPO mRNA-*in situ*-Hybridisierung ergibt bei den isolierten renalen Zellen keinen positiven Nachweis von EPO.

Es wurde die von der AG Prof. Dr. Kai-Uwe Eckardt der Universität Erlangen erhaltene EPO-Sonde verwendet (2.5.5.1). Bei der Auswertung der Färbungen zeigten sich bei Verwendung der SP6-Antisense-Sonde ausschließlich negative Zellen. Zudem zeigte auch die Positivkontrolle keine angefärbten Zellen (Daten nicht gezeigt). Erstaunlicherweise zeigte die Verwendung der T7-Sense-Sonde, anders als erwartet, überwiegend positive Zellen. Daraufhin wurde die Basenfolge der Sonde durch Sequenzierung untersucht. Laut Protokoll sollte die Sonde 221 bp des EPO-Exons 1 enthalten. Die Sequenzierung der Sonde ergab jedoch insgesamt nur 54 bp Übereinstimmung mit EPO-Exon 1. Die Untersuchung der T7-Sense-Sequenz ergab zudem eine 81% Homologie zum ACH-Esterase-Gen, so dass nun von einer unspezifischen Bindung in den durchgeführten Versuchen ausgegangen werden konnte.

In der AG von PD Dr. Olaf Jöhren, Institut für Pharmakologie, Universität zu Lübeck (Direktor: Prof. Dr. M. Schwaninger), wurde daraufhin die Herstellung einer neuen EPO-Sonde veranlasst. Diese zeigte bei erfolgreicher Positivkontrolle jedoch in verschiedenen Versuchen keine positiven Zellen in den renalen Zellisolaten

3.3 Optimierung der Zellfixierung zur Signalkonservierung von GFP

In dieser Doktorarbeit wurden neben Wildtyp-NMRI-Mäusen auch C57BL/6-Tg(UBC-GFP)30Scha/J-Mäuse verwendet, die durch eine Koppelung von Green-Flourescent-Protein (GFP) an Ubiquitin, GFP in allen Körperzellen exprimieren. Ziel war nach Charakterisierung der renalen mesenchymalen Stromazellen, diese eventuell in *in vivo*-Versuchen in Folgeprojekten zu verwenden. Daher stellte sich methodisch die Frage nach einer GFP-Signal schonenden Fixierung (2.2.9), deren Ergebnisse in Abb. 14 dargestellt sind.



3.4 Differenzierung von ES-Zellen zu renalen Progenitorzellen *in vitro*

ES-Zellen der im Labor etablierten Stammzelllinie D3 werden häufig verwendet, um zelluläre Differenzierungsprozesse aller drei Keimblätter *in vitro* nachzuvollziehen.

Diese Zelllinie ist Grundlage aller hier beschriebenen ES-Zell-Versuche. Da diese Zellen häufig passagiert werden, werden die ES-Zelllinien regelmäßig auf einen normalen Karyotyp und ES-Zell-Marker, wie Alkalische Phosphatase, Oct-4 und Nanog, überprüft. Zudem wird stets während der laufenden Versuche die Differenzierungsfähigkeit durch Analyse der Kardiomyozytenbildung bestätigt. Somit konnte eine Differenzierung der Stammzellen vor Versuchsbeginn und eine verminderte Differenzierungskapazität während der im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit durchgeführten Versuche weitgehend ausgeschlossen werden (Daten nicht dargestellt)

3.4.1 EBs exprimieren Marker der Nierenzelldifferenzierung

Mittels RT-PCR-Analysen konnte die Expression verschiedener Gene, die bei der Nierenentwicklung eine entscheidende Rolle spielen, in EBs, die im Standardmedium ohne induzierende Zusätze kultiviert wurden, nachgewiesen werden (Abb. 15 A, 16 A).

Gene, die in der frühen Nierenentwicklung wichtig sind, wie *pax8*, *emx2* und *wt1*, werden in Kontroll-EBs an 5+1 d gering und zunehmend an 5+8 d exprimiert. Im Verlauf bleibt die Expression von *pax8* und *emx2* auf gleichem Level, wohingegen das Niveau der *wt1*-Expression zunimmt. Im Gegensatz dazu ist die Expression von *bmp7* und *wnt4*, die ebenfalls in der Nephrogenese von Bedeutung sind, bereits in den frühen Differenzierungsstadien der EBs nachweisbar und zeigt während des zeitlichen Verlaufs der Differenzierung keine wesentliche Veränderung.

Die Genexpression von *podocalyxin*, dessen Produkt ein essentieller Bestandteil der Podozytenmembran ist, konnte zu jedem Zeitpunkt in relativ gleicher Stärke in den Kontroll-EBs nachgewiesen werden.

Nephrin, ein Marker der späten Nephrogenese und ebenfalls essentieller Bestandteil von Podozyten, wurde von 5+1 d bis 5+22 d in ansteigender Intensität in Kontroll-EBs exprimiert, gefolgt von einer leichten Reduktion an 5+29 d.

Die Expression von *egfr*, einem Mitglied der Rezeptorfamilie endothelialer Wachstumsfaktoren und ebenfalls ein Marker der späten Nephrogenese, ist bereits an 5+1 d mit hoher Intensität in Kontroll-EBs nachweisbar, die bis zum Ende der EB-Differenzierung noch weiter ansteigt.

Lim 1 und *nestin*, die eine Bedeutung während des Kondensierungsprozesses des Metanephros haben, werden zu jeder Zeit der EB-Kultivierung in den Kontrollen stark exprimiert.

In sekundären Immunfärbungen konnten die bereits im Vorfeld der Arbeit publizierten primitiven renalen Ringstrukturen [127], die positiv für Cytokeratin und Nephrin sind, nachgewiesen werden (Abb. 17; Kontrolle).

Das Standardmedium enthielt 20% FKS bis 5+3 d und während der folgenden EB-Differenzierung 0,2% FKS. ES-Zellen, welche in Vorversuchen dieser Arbeit die gesamte Kultivierungszeit mit 20% FKS behandelt wurden, zeigten insgesamt zwar eine Zunahme der Expression von *wnt4*, jedoch eine hochsignifikant verringerte Expression von *nephrin*. Des Weiteren wurden bis 5+22 d signifikant weniger renale Ringstrukturen unter durchgehender Verwendung von 20% FKS gebildet. (Daten nicht dargestellt, n=4).

Daher wurde die höhere FKS-Konzentration als nicht optimal angesehen, die nephrogene Differenzierung von ES-Zellen zu unterstützen. Somit wurde in den Versuchen immer nach 5+3 d von 20% FKS auf 0,2% FKS gewechselt.

Zusammenfassend konnte nachgewiesen werden, dass EBs bei Kultivierung mit dem Basiskultivierungsmedium spontan zu renalen Vorläuferzellen differenzieren.

3.4.2 Der Zusatz von Wachstumsfaktoren zum Standardmedium kann die renale Differenzierung von EBs verstärken.

Durch verschiedene dem Standardmedium zugesetzte Wachstumsfaktoren (2.3.1.7) sollte untersucht werden, ob hierdurch die nephrogene Differenzierung von EBs optimiert werden kann. Als Mediumzusätze wurden Retinsäure, TGF β 1, EGF, LiCl, FGF2 in der Folge mit FGF2 + LIF oder Aldosteron verwendet. Die Versuche wurden mittels RT-PCR (Abb. 15, 16) und Immunfluoreszenzfärbungen zur Darstellung renaler Ringstrukturen (Abb. 17) ausgewertet und mit den Ergebnissen aus Versuchen mit unbehandelten EBs (3.4.1), die als Kontrolle durchgeführt wurden, verglichen.

Die Applikation von Retinsäure führte zu einer signifikanten Inhibition der *pax8*-Expression und Induktion der *wnt4*-Expression an 5+29 d (Abb. 15 B), jedoch wurden keine signifikanten Veränderungen in der Menge der gebildeten Ringstrukturen in den Immunfärbungen festgestellt (Abb. 17 E).

Unter TGF β 1-Zusatz wurde, im Gegensatz zur Kontrolle, eine geringere Expression von *emx2* detektiert (Abb 15 C). Dieser Mediumzusatz zeigte ebenfalls keine signifikante quantitative Veränderung der Bildung renaler Ringstrukturen (Abb. 17 E).

Bei Zusatz von EGF konnte eine niedrigere *pax8*-Expression festgestellt werden (Abb. 16 E). Diese Inhibition war signifikant an 5+15 d. Statistisch signifikant konnte durch diesen Mediumzusatz die Bildung renaler Ringstrukturen an 5+29 d gesteigert werden.

Die Applikation von LiCl führte zu einer verringerten Expression von *emx2*, signifikant an 5+15 d (Abb. 15 E), und einem ebenfalls reduziertem Nachweis der Expression von *nestin* (Abb. 16 E). Diese Inhibition war signifikant an 5+1 d, gefolgt von einem geringen Anstieg der Expression während des weiteren Differenzierungsverlaufs. Deutlich verzögert stellte sich die Nachweisbarkeit von Ringstrukturen dar. Erst an 5+29 d zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle mehr (Abb. 17 E).

Zellen, die mit FGF2, gefolgt von FGF2 + LiCl, inkubiert wurden, zeigten eine an 5+15 d signifikant stärkere Expression von *podocalyxin* (Abb. 16 F). Ähnlich wie bei der

alleinigen Applikation von LiCl beschrieben stellte sich die Entwicklung von Ringstrukturen verzögert dar (Abb. 17 E).

Die Aldosteron-Applikation führte zu einem signifikant höheren Nachweis der Expression von *pax8* an 5+1 d (Abb. 15 G), welche bei den nachfolgenden Zeitpunkten auf etwa dem gleichen Expressionslevel der Kontrolle blieb. Eine statistisch signifikante quantitative Veränderung der Ringstrukturen wurde nicht unter Wirkung von Aldosteron nachgewiesen (Abb. 17 E). Jedoch konnte an 5+15 d in den Präparaten keine Bildung dieser Strukturen gezeigt werden.



Abbildung 15: Relative Expression verschiedener Gene in EBs nach Kultivierung mit verschiedener Wachstumsfaktoren im Vergleich zur Kontrollkultivierung ohne Faktoren. (*=p<0,05;±SE)







3.4.3 Die Kultivierung der ESC in einer Perfusionskultur führt nicht zu einer verstärkten renalen Differenzierung von EBs.

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurde eine bisher noch nicht für ES-Zellen verwendete Perfusionskultur etabliert (2.3.2). Diese sollte für die Gesamtzeit des Zellkulturversuches konstante Bedingungen sichern. So befanden sich die Zellen die ganze Zeit in einem geschlossenen System und wurden konsequent mit frischem Kulturmedium versorgt. In diesem Versuchsteil wurde Standardmedium ohne Zusatz von weiteren Wachstumsfaktoren verwendet. Zur Auswertung wurden die Ergebnisse mit der herkömmlichen ES-Zell-Kultivierung verglichen. Auch hier wurde wieder densitometrisch die Expression verschiedener Gene (Abb. 18) sowie morphologisch die Bildung von Ringstrukturen mittels Immunfärbungen untersucht.

Die Analyse der Genexpression an 5+29 d zeigte keine signifikanten Unterschiede zur Standardmethode (Abb 18). Statistisch signifikant weniger Ringstrukturen wurden an 5+29 d bei den in der Perfusionskultur kultivierten EBs detektiert (Abb. 19).





4. DISKUSSION

4.1 Isolation und Charakterisierung mesenchymaler Stromazellen (MSC)

4.1.1 Eine Isolation multipotenter MSC ist möglich.

Betrachtet man die Ergebnisse der Isolation und Charakterisierung, so kann man zu dem Schluss kommen, dass multipotente MSC in dem scheinbar heterogenen, isolierten Zellgemisch aus murinen Nieren zu einem Teil vorkommen und erfolgreich isoliert wurden. Somit wurden die Ergebnisse der AG um Plotkin bestätigt [32].

Die MSC-Kriterien der Internationalen Gesellschaft der für Zelltherapie [14] wurden von einigen Zellen erfüllt:

- Alle untersuchten Zellen waren plastikadhärent.
- Das Zellgemisch verfügte über ein Expressionsmuster von Oberflächenmarkern, welches das Vorhandensein von MSC in den Isolaten möglich erscheinen lässt.
- Einige wenige renale Zellen verfügten über ein adipogenes, chondrogenes und osteogenes Differenzierungspotential.

Diese Ergebnisse waren reproduzierbar, obwohl in den Experimenten zur Zellproliferation (Abb. 7) eine Heterogenität im zellulären Verhalten nachgewiesen werden konnte.

Die Differenzierungsfähigkeit zu Adipozyten, Chondrozyten oder Osteoblasten ist der wichtigste Teil der Definition von MSC. Die Notwendigkeit dieser Fähigkeit wird in vielen Publikationen betont [9, 14, 29, 31, 32, 36, 39, 142]. Dieser Teil der Definition von MSC konnte hier nur für wenige renale Zellen demonstriert werden.

Da die Differenzierungsversuche nicht mit Zellen aus Lunge und Darm durchgeführt wurden, lassen sich in dieser Arbeit keine Rückschlüsse auf das Vorhandensein von MSC in diesen Organen ziehen.

Insgesamt kann gefolgert werden, dass aus den Nieren von adulten Mäusen nur wenige multipotente MSC isoliert werden konnten. Jedoch stellt sich die Frage, ob tatsächlich nur so wenige multipotente MSC isoliert wurden. Es wäre möglich, dass anfangs in dem heterogenen Zellgemisch deutlich mehr MSC enthalten waren, die aber unter den gegebenen Zellkulturbedingungen vor der Analyse bereits differenzierten. Diese Annahme wird gestützt durch die Publikation von Plotkin und Mitarbeitern [32], in der ein einziger Zellklon, der als "4E" bezeichnet wurde, untersucht wurde. Auch dort wurde eine ausgesprochen heterogene Zellpopulation beschrieben, die sich aber – im Gegensatz zu dem untersuchten Zellgemisch in dieser Promotionsarbeit – aus nur einem einzigen Zellklon entwickelt hatte.

Bei weiterer Betrachtung der Ergebnisse der Differenzierungsversuche fällt zudem auf, dass die untersuchten mesenchymalen Zellkulturen und die als Positivkontrolle verwendeten Knochenmarkzellen über keine homogene Differenzierung verfügten. Auch in den Versuchen des Knochenmarks konnten nur vereinzelt erfolgreich differenzierte Zellen nachgewiesen werden. Somit konnte auch hier nicht von einer homogenen MSC-Population gesprochen werden.

Zum anderen jedoch scheint auch die als Negativkontrolle verwendete Fibroblastenkultur über ein gewisses Differenzierungspotential zu verfügen. Dieses Ergebnis wird durch Publikationen anderer Arbeitsgruppen bestätigt [143, 144]. Hinzu kommt, dass in verschiedenen Studien nachgewiesen wurde, dass auch Fibroblasten, ebenso wie multipotente MSC, immunmodulatorische oder apoptoseinhibierende Fähigkeiten besitzen [143, 145].

Somit ist die Aussage möglich, dass die Zellen, die als multipotente MSC bezeichnet werden, nur ein Anteil der Gesamtpopulation mesenchymaler Zellen sind, der je nach Situation variieren kann. Es scheint somit möglich, dass sich die Phänotypen der einzelnen differenzierten und nicht differenzierten mesenchymalen Zellen je nach Anforderungsprofil und Kultivierungsbedingungen verändern können. Diese Hypothese kann durch die in zahlreichen Studien aufgezeigte Plastizität mesenchymaler Zellen gestützt werden [18, 146-154]. Auch *in vivo* könnte bei Bedarf, z.B. bei einem ANV, der Anteil multipotenter MSC somit deutlich erhöht werden.

4.1.2 Zellen verschiedenen Ursprunges zeigen unterschiedliche Phänotypen *in vitro*.

Durch Bestimmung der Anzahl der CFU-F nach Isolation (Abb. 4) und Messung der Proliferation durch BrdU-Inkorporation, sowie den Nachweis der Telomeraseaktivität (Abb. 8) konnten keine wesentlichen Unterschiede zwischen Zellen unterschiedlicher Organherkunft nachgewiesen werden. Gezeigt wurde organunabhängig, dass unter HOX insgesamt eine schlechtere Wachstumstendenz der isolierten Zellen besteht (Abb. 6).

Interessant war, dass trotz des identischen Isolationsverfahrens und der identischen Kultivierung unterschiedliche Populationen plastikadhärenter Zellen aus einem Organtyp erhalten werden können. So zeigte der Vergleich unabhängiger Nierenzellkulturen in der Proliferationsmessung ein deutlich unterschiedliches Wachstumsverhalten (Abb. 7).

Durch Anwendung der Durchflusszytometrie ist es reproduzierbar gelungen, Zellen verschiedener Organe untereinander durch ihr Expressionsmuster zu unterscheiden. Sogar eine Abgrenzung zu reinen Fibroblastenkulturen war möglich (Abb. 9). Verwendet wurden

Oberflächenmarker, die bereits in anderen Publikationen zur Charakterisierung von MSC etabliert wurden [29, 32, 36, 155]. Des Weiteren wurden Antikörper für CD49a, einem Integrinrezeptor, der vor allem in mesenchymalen Geweben vorkommt [156], und für CD292, einem Rezeptor, der eine Rolle in der Osteo- und Chondrogenese und damit im mesenchymalen System spielt [157, 158], verwendet.

Zusätzlich konnte auch durch Anwendung von Immunfluoreszenzfärbungen und RT-PCR-Analysen eine Abgrenzung von renalen Zellen zu Fibroblasten erfolgen (Abb. 10).

Unter Berücksichtigung der in 4.1.1 beschriebenen Hypothese der potentiellen Variabilität des Phänotyps mesenchymaler Zellen könnten die Unterschiede in der Expression von Oberflächenmarkern allerdings auch unter der Spezialisierung residenter mesenchymaler Zellen in deren direkten Organumfeld und ihrer spezifischen Funktion zu sehen sein. Somit können renale Zellen zwar von Zellen anderer Organe abgegrenzt werden, was jedoch, unter Berücksichtigung der beschriebenen Variabilität, nicht die Schlussfolgerung ermöglicht, dass renale Zellen nicht auch ein anderes Expressionsprofil unter anderen Kultivierungsbedingungen aufweisen könnten. Dies wurde bereits für den mesenchymalen Zellklon "4E" gezeigt [32].

Auch kann nicht geschlussfolgert werden, dass die untersuchten Zellen von Fibroblasten insgesamt abgegrenzt werden können. Bei Betrachtung der Literatur wird deutlich, dass Fibroblasten spezialisierte mesenchymale Zellen sind, die an unterschiedlichen Orten *in vivo* auch einen unterschiedlichen Phänotyp haben, der ebenfalls durch Änderung der Kulturbedingungen *in vitro* variabel ist [159, 160]. So wäre interessant, in Folgeprojekten eine Cokultivierung von Fibroblasten mit renalen Zellen durchzuführen, um zu untersuchen, ob unter diesen Bedingungen in den Fibroblasten eine Expression von Cytokeratin und Nephrin im Sinne einer Mesenchym-in-Epithel-Transition induzierbar ist. Fazit ist allerdings, dass eine klonale Analyse mesenchymaler Zellen gegenüber der Verwendung heterogener Zellisolate zu bevorzugen sein sollte.

4.1.3 *In vitro* lässt sich nur eine geringe *epo*-Expression durch renale Zellen nachweisen.

In einer Publikation von Plotkin et al. [32] wurden erstmals EPO-produzierende renale Zellen *in vitro* beschrieben. Die Charakterisierung dieser Zellen konnte jedoch noch nicht hinreichend durchgeführt werden.

Auch in der vorliegenden Promotionsarbeit war die Isolation von *epo*-exprimierenden Zellen erfolgreich, wenn auch mit einer sehr geringen Ausbeute hinsichtlich des Ausmaßes

der *epo*-Expression. Die Ergebnisse waren sogar in verschiedenen Proben eines Isolates nicht einheitlich (Abb. 13). Somit war auch nach ausgiebigen Resuspendieren der Zellsuspension, welches ein homogenes Zellgemisch bei Versuchsbeginn garantieren sollte, in fast der Hälfte aller Proben eines einzelnen Isolats keine Expression von *epo* nachweisbar. Zusätzlich hatte auch die nachgewiesene *epo*-mRNA insgesamt eine sehr geringe Konzentration. Ein Nachweis gelang im Mittel erst nach 35 Zyklen mittels realtime quantitativer RT-PCR (qRT-PCR). Das Housekeepinggene *l28* hingegen konnte auch noch nach tausendfacher Verdünnung im Mittel nach dem 19. Zyklus nachgewiesen werden.

Zur Erklärung dieser Inhomogenität der Nachweisbarkeit der Expression von *epo* kommen verschiedene Hypothesen in Betracht:

1) Es wurde keine Expression von *epo* nachgewiesen – die positiven qRT-PCR-Ergebnisse entstanden durch unspezifische Produkte bei hoher Zyklenzahl.

Gegen diese Hypothese spricht die hohe Anzahl an negativen Proben. Bei einer unspezifischen Bindung wäre ein homogenerer falsch-positiver Nachweis zu erwarten. Auch spricht dagegen, dass es nur in einer von vier Proben im gleichen Versuchslauf in der RT-PCR gelungen ist, eine *epo*-Expression nachzuweisen. Auch weisen deutliche Unterschiede in der nachgewiesenen *epo*-mRNA-Menge eher auf eine spezifische, als auf eine unspezifische Bindung hin.

 EPO-produzierende Zellen sind äußerst selten, so dass sie selbst in einem gleichmäßig resuspendierten Zellgemisch nicht regelmäßig vorkommen bzw. unter die Nachweisgrenze einer qRT-PCR fallen.

Gegen diese Hypothese spricht, dass in mehreren Isolaten kein Nachweis einer EPO-mRNA-Produktion erfolgen konnte. Sämtliche Organe wurden von gleich gehaltenen, gesunden Mäuseweibchen entnommen, so dass auch von einer Gleichartigkeit der Organe und dem Vorhandensein von EPO-produzierenden Zellen ausgegangen werden kann.

Für diese Hypothese spricht jedoch die scheinbar fehlende Stimulierbarkeit der renalen Expression von *epo* durch Hypoxie, welche den wichtigsten Faktor zur Induktion der EPO-Produktion darstellt [161]. Zudem stellten sich trotz des einheitlichen Isolationsprotokolls die gewonnenen Zellpopulationen wie oben bereits dargestellt als sehr uneinheitlich dar.

3) EPO-produzierende Zellen sind MSC, die in Kultur phänotypisch instabil sind, rasch dedifferenzieren und dann nicht mehr EPO synthetisieren.

Für den ersten Teil der Hypothese, dass EPO-produzierende Zellen MSC sind, sprechen mehrere Argumente. Zum einen haben viele Publikationen EPO-produzierenden Zellen *in vivo* eine peritubuläre und damit interstitielle Lage sowie eine fibroblastoide Morphologie zugeschrieben [59-67], über welche auch multipotente MSC verfügen [8, 33, 34]. Des Weiteren wurde für EPO eine VEGF-induzierende und angiogenetische [85, 86], mitogene [87, 88], antiinflammatorische, antioxidative, antiapoptotische [89] und immunmodulative [90, 91] Wirkung nachgewiesen, die ebenfalls für multipotente MSC gezeigt wurde. [8, 27, 36, 37].

Auch die dieser Promotionsarbeit zu Grunde liegende Publikation [32] spricht für diese Hypothese. Untersucht wurde ein einziger Zellklon ("4E"), der nach Proliferation eine scheinbar heterogene Zellpopulation mit multipotenten mesenchymalen Zellen und EPOproduzierenden Zellen ergab. Somit liegt insgesamt, wie bereits in 4.1.1 erläutert, die Vermutung nahe, dass multipotente MSC und EPO-produzierende Zellen spezialisierte mesenchymale Zellen sind, die hinsichtlich ihres Phänotyps ineinander übergehen können.

Der zweite Teil dieser Hypothese, dass EPO-produzierende Zellen in Kultur phänotypisch instabil sind, rasch dedifferenzieren und dadurch kein EPO mehr produzieren, kann ebenfalls aufgrund von Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen unterstützt werden. Alle *epo*-exprimierenden renalen Zellen weisen laut Literatur eine Koexpression der *ecto-5'-Nucleotidase* (CD73) auf [59, 62, 67]. Dies ist ein Enzym, das die Reaktion von AMP zu Adenosin katalysiert [162], welches wiederum eine Steigerung der EPO-Produktion bewirkt [75, 76, 163]. α -sma hingegen, dessen Expression ein Merkmal der Myofibroblasten ist und bei chronischen Entzündungen vermehrt exprimiert wird sowie in gesunden Nieren erwachsener Tiere nicht vorkommt [37], wird weder mit *ecto-5'-Nucleotidase* [37], noch mit *epo* [32, 67] koexprimiert. Mit zunehmender α -sma-Expression wurde sogar eine Abnahme der *epo*-Expression beschrieben [94].

In dieser Promotionsarbeit zeigten 100% der untersuchten renalen Zellen in der Immunfluoreszenzfärbung eine Nachweisbarkeit von α -SMA, wohingegen Ecto-5'-Nucleotidase mittels Immunfärbungen nicht nachgewiesen werden konnte (Abb. 10). Hingegen konnte dieses Markermolekül in der Durchflusszytometrie bei etwa 60% der renalen Zellen detektiert werden.

Somit kann angenommen werden, dass nach Isolation aus einer gesunden Niere die Zellen *in vitro* zum großen Teil dedifferenzierten und nicht mehr EPO produzierten. Anscheinend waren jedoch nicht alle Kulturen von der vollständigen Dedifferenzierung betroffen. Nur die Zellen, die aus den C57BL/6-Tg(UBC-GFP)30Scha/J-Mäusen isoliert wurden, zeigten vollständig eine fehlende Nachweisbarkeit der Expression von EPO. Daher könnten die Zellen dieser transgenen Mäuse ein höheres Dedifferenzierungspotential im Vergleich zu den Zellen der NMRI-Mäusen aufweisen. Abgesehen von diesem Unterschied waren die weiteren Ergebnisse der isolierten Zellen aus den beiden Mäusearten aber vergleichbar.

Im Umkehrschluss müsste es möglich sein z.B. durch die Modulation bestimmter Faktoren eine homogene EPO-produzierende Zellpopulation zu erhalten, da auch *in vivo* eine deutliche Zunahme der EPO-produzierenden Zellen nach einem ANV beobachtet wurde [93].

Die scheinbar fehlende Induktion der Expression von *epo* durch Hypoxie könnte sich nach diesen Ausführungen folgendermaßen erklären lassen: Auch die Zellpopulation der NMRI-Mäuse ist von der Dedifferenzierung betroffen. Dies wurde in den Immunfloureszenzfärbungen, die 100% der kultivierten Zellen positiv für α-Sma darstellten, nachgewiesen. Insgesamt wurde in Isolaten, in welchen eine Expression von epo nachgewiesen wurde, eine deutliche Schwankungsbreite der EPO-mRNA-Konzentrationen festgestellt. In 44% der Proben dieser Isolate konnte sogar keine Expression nachgeweisen werden. Somit ist auch der Vergleich zwischen NOX und HOX auf die EPO-mRNA-Produktion bei einem während identischer Kultivierungszeitpunkte möglicherweise deutlich unterschiedlichen Verhältnis von dedifferenzierten zu nichtdedifferenzierten Zellen nicht überzeugend möglich. Damit kann in dieser Promotionsarbeit eine Induktion der EPO-Produktion durch isolierte renale Zellen in heterogenen Kulturen unter hypoxischen Bedingungen weder bestätigt noch widerlegt werden.

4.2 Differenzierung von ESC zu renalen Vorläuferzellen *in vitro*

4.2.1 ESC der Linie D3 differenzieren spontan zu renalen Progenitorzellen *in vitro*.

Zur Untersuchung von embryonalen Entwicklungsvorgängen *in vitro* eignet sich die Verwendung von ES-Zellen, die auf Grund ihres Ursprunges aus der inneren Zellmasse der Blastozyste pluripotent sind und in Zellen aller drei Keimblätter differenzieren können [108, 109, 115]. In allen Versuchen wurde die im Labor etablierte embryonale Zelllinie D3 verwendet [133].

Über die PCR-Analyse der Expression renaler Markergene ist es gelungen, eine spontane Differenzierung von ES-Zellen zu renalen Progenitorzellen nachzuweisen (Abb. 15 A, 16 A).
Die hohe Expression von *lim1* [164] gibt Hinweise auf eine Entwicklung der heterogenen EBs auch in die mesodermale Richtung. Die Expression von Markern der frühen Nephrogenese, *pax8*, *emx2* und *wt1* [97], wurde an 5+8 d hochreguliert. Das Expressionsniveau von *wt1* stieg weiter an, was auf seine bedeutende Rolle bei Erhaltung der Podozytendifferenzierung zurückgeführt werden könnte [165]. Einschränkend muss allerdings hinzugefügt werden, dass diese Gene nicht allein nierenspezifisch exprimiert werden [166, 167]. Die Expression von *podocalyxin*, welches für ein essentielles Membranprotein von Podozyten kodiert, wird zeitgleich in den EBs mit *wt1* hochreguliert [168]. Die bereits initial hohe Expression an 5+1 d, vor Hochregulation von *wt1*, kann durch die Bedeutung *podocalyxin* in anderen, nicht renalen Zellsystemen erklärt werden [169].

Ein relativ spezifischer Podozytenmarker der späteren renalen Differenzierung ist *nephrin*, dessen Transkription ebenfalls *in vivo* durch *wt1* aktiviert wird [170]. Dieser Expressionsverlauf konnte durch die PCR-Ergebnisse auch in den EBs bestätigt werden. Hierbei konnte ein Anstieg der Expression von *nephrin* erst nach Anstieg der *wt1*-Expression gezeigt werden.

Die Expression von *nestin* konnte während sämtlicher Auswertungszeitpunkte auf hohem Level nachgewiesen werden. Dies kann dadurch erklärt werden, dass *nestin*, neben einer bedeutenden Rolle bei der Nephrogenese im kondensierenden Mesenchym, in entwickelnden Glomeruli und auf fertig differenzierte Podozyten [171], auch noch zusätzlich eine Bedeutung als allgemeiner Differenzierungsmarker hat. Zudem wird es generell in Vorläuferzellen exprimiert [172].

Egfr wird in vielen Teilen der Niere exprimiert [173-176]. Bei Untersuchungen an EGFR knock out-Mäusen zeigten sich nur leichte Veränderungen in der Konfiguration der Sammelrohrzellen. Eine Reduktion der Nierenfunktion oder bedeutende Veränderung des Nephrons wurde nicht nachgewiesen [177]. Eine Bedeutung wird EGFR eher für die späte Nierenentwicklung zugeschrieben [178]. In dieser Promotionsarbeit wurde bereits zu Beginn der *in vitro*-Differenzierung eine hohe *egfr*-Expression gemessen. Diese könnte in Zusammenhang mit einer extrarenalen Expression stehen [179]. Am Ende der EB-Kultivierung nimmt die Expression weiter zu, wodurch die Theorie der Bedeutung für die späte renale Entwicklung gestützt werden könnte.

Insgesamt konnte durch die Auswertung der semiquantitativen RT-PCR-Ergebnisse eine spontane renale Differenzierung von EBs nachgewiesen werden. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass neben der renalen Differenzierung des EBs im gleichen EB parallel Differenzierungsvorgänge von ES-Zellen in viele andere differenzierte Zellen stattfinden [114, 115].

Zusätzlich konnte mit Hilfe von sekundären Immunfärbungen gegen Nephrin und Cytokeratin die Bildung primitiver renaler Ringstrukturen in den EBs gezeigt werden. Die Detektion dieser Strukturen wurde im Vorfeld dieser Arbeit bereits durch unsere Arbeitsgruppe publiziert und deren potentielle renale Progenitorfunktion gezeigt [127]. Somit wurde in dieser Promotionsarbeit die spontane Differenzierung von ES-Zellen in renale Progenitorzellen bestätigt.

4.2.2 Die Applikation von Wachstumsfaktoren beeinflusst die renale Differenzierung von ES-Zellen *in vitro*.

Zur Optimierung der renalen Differenzierung in den EBs wurden verschiedene Wachstumsfaktoren (Retinsäure, TGFβ1, EGF, LiCl, FGF2 gefolgt von FGF2 in Kombination mit LIF, Aldosteron) dem Basismedium hinzugefügt. Für alle Faktoren war eine Modulation der nephrogenen Entwicklung in anderen Zellsystemen bereits nachgewiesen worden [99, 100, 102, 105-107, 139, 180]. Durch semiquantitative RT-PCR-Analyse konnte keine eindeutige Modulation der Expression renaler Markergene nachgewiesen werden (Abb 15, 16). Durch Immunfärbungen jedoch konnte eine signifikante Verstärkung der Bildung renaler Ringstrukturen in EBs durch Applikation von EGF zum Zeitpunkt 5+29 d nachgewiesen werden (Abb. 16). Der Zusatz von LiCL oder FGF2 gefolgt von FGF2 in Kombination mit LIF führte hingegen zu einer signifikanten Verzögerung der Bildung dieser renalen Strukturen.

Der fehlende Nachweis einer eindeutigen Modulation der renalen Differenzierung durch semiquantitative RT-PCR-Analyse kann folgendermaßen erklärt werden:

- Wie oben beschrieben ist die Expression vieler Markermoleküle für die Nierenentwicklung essentiell. Diese werden jedoch auch in anderen Organsystemen exprimiert, so dass von einer deutlichen Überlagerung der PCR-Ergebnisse durch nicht-renale Expression ausgegangen werden muss.
- 2) Es wurden RT-PCR-Analysen zu den Zeitpunkten 5+1 d, 5+8 d, 5+15 d, 5+22 d und 5+29 d durchgeführt. Unter Berücksichtigung der raschen embryonalen Differenzierung ist es möglich, dass das empfindliche Variieren der m-RNA-Expression während des Kultivierungsverlaufs durch allein fünf Untersuchungszeitpunkte nicht ausreichend erfasst werden konnte.
- 3) Die RT-PCR ist in der Sensitivität der qRT-PCR unterlegen und eignet sich nur eingeschränkt zur Beurteilung einer Modulation der Expression. Insofern kann für

die Beantwortung der Fragestellung geringer Änderungen der Genexpression die Verwendung der qRT-PCR sinnvoller sein. Hierbei sind dann allerdings auch höhere Kosten des Verfahrens zu beachten, so dass in einem ersten orientierenden Untersuchungsschritt der Einsatz des etablierten semiquantitativen Verfahrens durchaus eine Berechtigung hat.

Die Applikation von EGF während früher Differenzierungsschritte scheint die Nephrogenese zu unterstützen. Insgesamt jedoch ist der Versuch, durch Zusatz einzelner Mediumzusätze eine renale Entwicklung zu fördern, zu grob, um die komplexen Vorgänge in der Natur mit dem Zusammenspiel verschiedenster Faktoren im Detail nachzuvollziehen. So ist es nicht ausgeschlossen, dass z.B. LiCl oder FGF2 gefolgt von FGF2 in Kombination mit LIF zu anderen Zeitpunkten, in anderen Konzentrationen oder in Kombination mit anderen Faktoren pronephrogen im EB-System wirken würde. Gezeigt wurde diese Komplexität für BMP7, welches allein in hoher Konzentration appliziert die Nierenentwicklung hemmt, jedoch in Kombination mit Retinsäure und Activin A die renale Differenzierung von ES-Zellen *in vitro* fördert [111, 112].

4.2.3 Ein kontinuierlicher Mediumfluss hemmt die renale Differenzierung in EBs.

Zur Analyse der Entwicklung von renalen Progenitorzellen aus ES-Zellen wurde in dieser Arbeit nicht nur die Medium-Supplementation moduliert, sondern auch eine Perfusionskultur etabliert. Diese gewährleistet relativ gleichbleibende Versuchsbedingungen für die gesamte Versuchsdauer (2.3.2).

Zwar zeigten die densitometrisch ausgewerteten **RT-PCR-Daten** unter Perfusionsbedingungen keinen signifikanten Unterschied der Expression renaler Marker im Vergleich zur Standardkultivierung (Abb. 18). jedoch wurden in den Immunfluoreszenzfärbungen hochsignifikant weniger Ringstrukturen detektiert (Abb. 19). Somit scheint die Perfusionskultur nicht zur Induktion der renalen Differenzierung geeignet zu sein.

Hauptunterschied der Perfusionskultur zur Standardmethode ist der kontinuierliche Fluss von frischem Medium, der neben der Lieferung von frischen, im Medium enthaltenden, Faktoren aber auch das alte Medium mit den von den EBs selbst produzierten Faktoren entfernt. Somit lässt sich schlussfolgern, dass gerade diese selbst produzierten Faktoren essentiell für eine renale Differenzierung von EBs sein könnten. Interessant wäre es, zu untersuchen, ob auch die Entwicklung anderer Organsysteme durch die Perfusionskultur gehemmt wird, was die Hypothese der Bedeutung der intrinsisch produzierten Faktoren unterstützen würde.

Mit diesem Ergebnis eröffnet sich auch durch das Perfusionssystem die Möglichkeit, die Wirkung von intrinsischen Faktoren, die durch die EBs produziert wurden zu reduzieren und eingehender die Wirkung bestimmter Wachstumsfaktoren durch exogene Applikation zu prüfen. Langfristiges Ziel bleibt es, die intrinsischen Faktoren vollständig exogen ersetzen zu können und auf diese Weise Schritt für Schritt ein Bild vom komplexen Zusammenspiel verschiedenster Faktoren zu bekommen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Nach einem akuten Nierenversagen ist die Niere fähig, sich zu regenerieren. Eine bedeutsame Rolle könnten hierbei multipotente mesenchymale Stromazellen (MSC) spielen, welche die Reparatur am ehesten durch parakrine Effekte unterstützen.

MSC zeigen *per definitionem* drei Haupteigenschaften: 1) Sie sind plastikadhärent und bilden fibroblastoide Kolonien, 2) sie verfügen über ein definiertes Expressionsmuster von Oberflächenmolekülen und 3) sie können adipogen, chondrogen und osteogen differenzieren.

In dieser Arbeit wurden plastikadhärente Zellen aus Nieren, Lungen, Dickdarm, Knochenmark und Bauchhaut der Maus isoliert und charakterisiert. Nur für einen geringen Teil der im Fokus dieser Arbeit stehenden renalen Zellen konnten MSC-Eigenschaften nachgewiesen werden. Des Weiteren wurden die renalen Zellen im Hinblick auf ihre Fähigkeit zur *epo*-Expression untersucht. Auch unter Anwendung quantitativer Genexpressionsanalysen wurde gezeigt, dass *epo*-mRNA außerordentlich schwierig nachweisbar ist und unterschiedliche Proben des gleichen Isolates deutliche Schwankungen an *epo*-mRNA Konzentrationen aufweisen.

Im Kontext der aktuellen Literatur wird in dieser Arbeit die Hypothese aufgestellt, dass MSC und *epo*-exprimierende Zellen als mesenchymale Zellen spontan oder durch bestimmte Faktoren zur Differenzierung bzw. Dedifferenzierung neigen. Hierbei könnten die Zellen die Fähigkeit zur *epo*-Expression einbüßen. *Epo*-exprimierende Zellen könnten somit keine eigenständige Zellpopulation, sondern differenzierte mesenchymale Zellen darstellen, deren Anteil an der Gesamtpopulation mesenchymaler Zellen je nach Stimulus varriiert.

Zum Verständnis reparativer Vorgänge in der Niere ist die Kenntnis der Differenzierungsvorgänge während der Nephrogenese außerordentlich wichtig. Daher wurden neben den Versuchen mit adulten MSC auch Versuche mit embryonalen Stammzellen (ESC) der Maus durchgeführt. In dieser Arbeit wurde eine spontane Differenzierung von ESC zu renalen Vorläuferzellen nachgewiesen. Zudem konnte gezeigt werden, dass die exogene Applikation von EGF die Bildung von renalen Vorläuferstrukturen induziert.

Neben der Modulation des Mediums durch verschiedene exogene Wachstumsfaktoren wurde auch eine im Rahmen dieser Arbeit für das ESC-Modellsystem etablierte Perfusionskultur untersucht. Diese gewährleistet während der Kultivierung gleichbleibende Versuchsbedingungen durch ständigen Fluss von frischem und Abtransport von altem Medium. Allerdings war die Bildung renaler Strukturen in der ESC-Perfusionskultur vermindert. Somit könnten für die Differenzierung von ESC, die durch die Zellen selbst gebildeten Faktoren essentiell für die Differenzierung sein. Die Perfusionskultur wäre also eine Methode, mit der genauer die Wirkung von exogen zugesetzten Faktoren untersucht werden könnte und der Einfluss intrinsisch gebildeter Faktoren durch die ständige Entfernung mittels Perfusion reduziert wird.

6. **LITERATURVERZEICHNIS**

- 1. Herold, G., *Innere Medizin eine vorlesungsorientierte Darstellung 2007.* 2007, Köln: G. Herold. 867 S.
- 2. Chronopoulos, A., et al., *Acute kidney injury in elderly intensive care patients: a review.* Intensive Care Med, 2010. **36**(9): p. 1454-64.
- 3. Lieberthal, W. and S.K. Nigam, *Acute renal failure. I. Relative importance of proximal vs. distal tubular injury.* Am J Physiol, 1998. **275**(5 Pt 2): p. F623-31.
- 4. Schiffl, H., *Renal recovery from acute tubular necrosis requiring renal replacement therapy: a prospective study in critically ill patients.* Nephrol Dial Transplant, 2006. **21**(5): p. 1248-52.
- 5. Ympa, Y.P., et al., *Has mortality from acute renal failure decreased? A systematic review of the literature.* Am J Med, 2005. **118**(8): p. 827-32.
- 6. Ali, T., et al., *Incidence and outcomes in acute kidney injury: a comprehensive population-based study.* J Am Soc Nephrol, 2007. **18**(4): p. 1292-8.
- 7. Young, H.E., et al., *Mesenchymal stem cells reside within the connective tissues of many organs*. Dev Dyn, 1995. **202**(2): p. 137-44.
- 8. da Silva Meirelles, L., A.I. Caplan, and N.B. Nardi, *In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells*. Stem Cells, 2008. **26**(9): p. 2287-99.
- 9. da Silva Meirelles, L., P.C. Chagastelles, and N.B. Nardi, *Mesenchymal stem* cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 11): p. 2204-13.
- 10. Friedenstein, A.J., et al., *Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo.* Transplantation, 1974. **17**(4): p. 331-40.
- 11. Friedenstein, A.J., et al., *Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues.* Transplantation, 1968. **6**(2): p. 230-47.
- 12. Wagner, W., et al., *The heterogeneity of human mesenchymal stem cell preparations--evidence from simultaneous analysis of proteomes and transcriptomes.* Exp Hematol, 2006. **34**(4): p. 536-48.
- 13. Wagner, W. and A.D. Ho, *Mesenchymal stem cell preparations--comparing apples and oranges*. Stem Cell Rev, 2007. **3**(4): p. 239-48.
- 14. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement.* Cytotherapy, 2006. **8**(4): p. 315-7.
- 15. Horwitz, E.M., et al., *Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement.* Cytotherapy, 2005. **7**(5): p. 393-5.
- 16. Castro-Malaspina, H., et al., *Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny.* Blood, 1980. **56**(2): p. 289-301.
- 17. Wagner, W., et al., *Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood.* Exp Hematol, 2005. **33**(11): p. 1402-16.
- 18. Kale, S., et al., *Bone marrow stem cells contribute to repair of the ischemically injured renal tubule.* J Clin Invest, 2003. **112**(1): p. 42-9.
- 19. Poulsom, R., et al., *Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration.* J Pathol, 2001. **195**(2): p. 229-35.
- 20. Herrera, M.B., et al., *Mesenchymal stem cells contribute to the renal repair of acute tubular epithelial injury.* Int J Mol Med, 2004. **14**(6): p. 1035-41.

- 21. Kunter, U., et al., *Mesenchymal stem cells prevent progressive experimental renal failure but maldifferentiate into glomerular adipocytes.* J Am Soc Nephrol, 2007. **18**(6): p. 1754-64.
- Lange, C., et al., Administered mesenchymal stem cells enhance recovery from ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in rats. Kidney Int, 2005. 68(4): p. 1613-7.
- 23. Morigi, M., et al., *Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure.* J Am Soc Nephrol, 2004. **15**(7): p. 1794-804.
- 24. Togel, F., et al., Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. Am J Physiol Renal Physiol, 2005. **289**(1): p. F31-42.
- 25. Lin, F., A. Moran, and P. Igarashi, *Intrarenal cells, not bone marrow-derived cells, are the major source for regeneration in postischemic kidney.* J Clin Invest, 2005. **115**(7): p. 1756-64.
- 26. Lin, F., et al., *Hematopoietic stem cells contribute to the regeneration of renal tubules after renal ischemia-reperfusion injury in mice.* J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(5): p. 1188-99.
- 27. Humphreys, B.D. and J.V. Bonventre, *Mesenchymal stem cells in acute kidney injury*. Annu Rev Med, 2008. **59**: p. 311-25.
- 28. Bussolati, B., et al., *Isolation of renal progenitor cells from adult human kidney*. Am J Pathol, 2005. **166**(2): p. 545-55.
- 29. Gupta, S., et al., *Isolation and characterization of kidney-derived stem cells*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(11): p. 3028-40.
- 30. Qi, W., et al., *The renal cortical fibroblast in renal tubulointerstitial fibrosis*. Int J Biochem Cell Biol, 2006. **38**(1): p. 1-5.
- 31. Sagrinati, C., et al., *Isolation and characterization of multipotent progenitor cells from the Bowman's capsule of adult human kidneys.* J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(9): p. 2443-56.
- 32. Plotkin, M.D. and M.S. Goligorsky, Mesenchymal cells from adult kidney support angiogenesis and differentiate into multiple interstitial cell types including erythropoietin-producing fibroblasts. Am J Physiol Renal Physiol, 2006. **291**(4): p. F902-12.
- 33. Caplan, A.I., *All MSCs are pericytes?* Cell Stem Cell, 2008. **3**(3): p. 229-30.
- 34. Crisan, M., et al., *A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs*. Cell Stem Cell, 2008. **3**(3): p. 301-13.
- 35. Oliver, J.A., et al., *The renal papilla is a niche for adult kidney stem cells*. J Clin Invest, 2004. **114**(6): p. 795-804.
- 36. Dekel, B., et al., Isolation and characterization of nontubular sca-1+linmultipotent stem/progenitor cells from adult mouse kidney. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(12): p. 3300-14.
- 37. Kaissling, B. and M. Le Hir, *The renal cortical interstitium: morphological and functional aspects*. Histochem Cell Biol, 2008. **130**(2): p. 247-62.
- 38. Duffield, J.S., et al., *Restoration of tubular epithelial cells during repair of the postischemic kidney occurs independently of bone marrow-derived stem cells.* J Clin Invest, 2005. **115**(7): p. 1743-55.
- 39. Challen, G.A., et al., *Kidney side population reveals multilineage potential and renal functional capacity but also cellular heterogeneity*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(7): p. 1896-912.
- 40. Maeshima, A., S. Yamashita, and Y. Nojima, *Identification of renal progenitor-like tubular cells that participate in the regeneration processes of the kidney*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(12): p. 3138-46.

- 41. Bonventre, J.V., *Dedifferentiation and proliferation of surviving epithelial cells in acute renal failure.* J Am Soc Nephrol, 2003. **14 Suppl 1**: p. S55-61.
- 42. Humphreys, B.D., et al., *Intrinsic epithelial cells repair the kidney after injury*. Cell Stem Cell, 2008. **2**(3): p. 284-91.
- 43. Liu, K.D. and P.R. Brakeman, *Renal repair and recovery*. Crit Care Med, 2008. **36**(4 Suppl): p. S187-92.
- 44. Witzgall, R., et al., Localization of proliferating cell nuclear antigen, vimentin, c-Fos, and clusterin in the postischemic kidney. Evidence for a heterogenous genetic response among nephron segments, and a large pool of mitotically active and dedifferentiated cells. J Clin Invest, 1994. **93**(5): p. 2175-88.
- 45. Vogetseder, A., et al., *Proximal tubular epithelial cells are generated by division of differentiated cells in the healthy kidney.* Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **292**(2): p. C807-13.
- 46. Vogetseder, A., et al., *Proliferation capacity of the renal proximal tubule involves the bulk of differentiated epithelial cells.* Am J Physiol Cell Physiol, 2008. **294**(1): p. C22-8.
- 47. Romagnani, P., *Toward the identification of a "renopoietic system"?* Stem Cells, 2009. **27**(9): p. 2247-53.
- 48. Sharples, E.J. and M.M. Yaqoob, *Erythropoietin in experimental acute renal failure*. Nephron Exp Nephrol, 2006. **104**(3): p. e83-8.
- 49. Chikuma, M., et al., *Tissue-specific regulation of erythropoietin production in the murine kidney, brain, and uterus.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2000. **279**(6): p. E1242-8.
- 50. Krantz, S.B., *Erythropoietin*. Blood, 1991. **77**(3): p. 419-34.
- 51. Masuda, S., M. Chikuma, and R. Sasaki, *Insulin-like growth factors and insulin stimulate erythropoietin production in primary cultured astrocytes.* Brain Res, 1997. **746**(1-2): p. 63-70.
- 52. Masuda, S., et al., *The oviduct produces erythropoietin in an estrogen- and oxygen-dependent manner*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2000. **278**(6): p. E1038-44.
- Sasaki, R., S. Masuda, and M. Nagao, *Erythropoietin: multiple physiological functions and regulation of biosynthesis*. Biosci Biotechnol Biochem, 2000. 64(9): p. 1775-93.
- 54. Yasuda, Y., et al., *Estrogen-dependent production of erythropoietin in uterus* and its implication in uterine angiogenesis. J Biol Chem, 1998. **273**(39): p. 25381-7.
- 55. Fried, W., *The liver as a source of extrarenal erythropoietin production*. Blood, 1972. **40**(5): p. 671-7.
- 56. Koury, S.T., et al., *Localization of cells producing erythropoietin in murine liver by in situ hybridization.* Blood, 1991. **77**(11): p. 2497-503.
- 57. Maxwell, P.H., et al., *Expression of a homologously recombined erythopoietin-SV40 T antigen fusion gene in mouse liver: evidence for erythropoietin production by Ito cells.* Blood, 1994. **84**(6): p. 1823-30.
- 58. Schuster, S.J., et al., *Cellular sites of extrarenal and renal erythropoietin production in anaemic rats.* Br J Haematol, 1992. **81**(2): p. 153-9.
- 59. Bachmann, S., M. Le Hir, and K.U. Eckardt, *Co-localization of erythropoietin mRNA and ecto-5'-nucleotidase immunoreactivity in peritubular cells of rat renal cortex indicates that fibroblasts produce erythropoietin.* J Histochem Cytochem, 1993. **41**(3): p. 335-41.
- 60. Darby, I.A., et al., *Erythropoietin gene expression in fetal and adult sheep kidney*. Br J Haematol, 1995. **89**(2): p. 266-70.

- 61. Eckardt, K.U., et al., *Distribution of erythropoietin producing cells in rat kidneys during hypoxic hypoxia.* Kidney Int, 1993. **43**(4): p. 815-23.
- 62. Fisher, J.W., et al., *Erythropoietin production by interstitial cells of hypoxic monkey kidneys*. Br J Haematol, 1996. **95**(1): p. 27-32.
- 63. Koury, S.T., M.C. Bondurant, and M.J. Koury, *Localization of erythropoietin synthesizing cells in murine kidneys by in situ hybridization*. Blood, 1988. **71**(2): p. 524-7.
- 64. Lacombe, C., et al., *Erythropoietin: sites of synthesis and regulation of secretion*. Am J Kidney Dis, 1991. **18**(4 Suppl 1): p. 14-9.
- 65. Liapis, H., et al., *In situ hybridization of human erythropoietin in pre- and postnatal kidneys*. Pediatr Pathol Lab Med, 1995. **15**(6): p. 875-83.
- 66. Maxwell, P.H., et al., *Sites of erythropoietin production*. Kidney Int, 1997. **51**(2): p. 393-401.
- 67. Maxwell, P.H., et al., *Identification of the renal erythropoietin-producing cells using transgenic mice*. Kidney Int, 1993. **44**(5): p. 1149-62.
- 68. Loya, F., et al., *Transgenic mice carrying the erythropoietin gene promoter linked to lacZ express the reporter in proximal convoluted tubule cells after hypoxia.* Blood, 1994. **84**(6): p. 1831-6.
- 69. Maxwell, A.P., et al., *Erythropoietin production in kidney tubular cells*. Br J Haematol, 1990. **74**(4): p. 535-9.
- 70. Mujais, S.K., et al., *Erythropoietin is produced by tubular cells of the rat kidney*. Cell Biochem Biophys, 1999. **30**(1): p. 153-66.
- 71. Nakhoul, N. and V. Batuman, *Role of proximal tubules in the pathogenesis of kidney disease*. Contrib Nephrol, 2011. **169**: p. 37-50.
- 72. Shanks, J.H., et al., *Localization of erythropoietin gene expression in proximal renal tubular cells detected by digoxigenin-labelled oligonucleotide probes.* J Pathol, 1996. **179**(3): p. 283-7.
- 73. Maxwell, P.H., C.W. Pugh, and P.J. Ratcliffe, *Inducible operation of the* erythropoietin 3' enhancer in multiple cell lines: evidence for a widespread oxygen-sensing mechanism. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(6): p. 2423-7.
- 74. Wenger, R.H., *Mammalian oxygen sensing, signalling and gene regulation*. J Exp Biol, 2000. **203**(Pt 8): p. 1253-63.
- 75. Ueno, M., et al., *A1 and A2 adenosine receptor regulation of erythropoietin production.* Life Sci, 1988. **43**(3): p. 229-37.
- 76. Paul, P., S.A. Rothmann, and R.C. Meagher, *Modulation of erythropoietin production by adenosine*. J Lab Clin Med, 1988. **112**(2): p. 168-73.
- 77. Westenfelder, C., D.L. Biddle, and R.L. Baranowski, *Human, rat, and mouse kidney cells express functional erythropoietin receptors.* Kidney Int, 1999. **55**(3): p. 808-20.
- 78. Anagnostou, A., et al., *Erythropoietin has a mitogenic and positive chemotactic effect on endothelial cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(15): p. 5978-82.
- 79. Anagnostou, A., et al., *Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(9): p. 3974-8.
- 80. Okada, A., et al., *Erythropoietin stimulates proliferation of rat-cultured gastric mucosal cells*. Digestion, 1996. **57**(5): p. 328-32.
- 81. Sawyer, S.T., S.B. Krantz, and K. Sawada, *Receptors for erythropoietin in mouse and human erythroid cells and placenta*. Blood, 1989. **74**(1): p. 103-9.
- 82. Mioni, R., et al., *Evidence for specific binding and stimulatory effects of recombinant human erythropoietin on isolated adult rat Leydig cells*. Acta Endocrinol (Copenh), 1992. **127**(5): p. 459-65.

- 83. Masuda, S., et al., *Functional erythropoietin receptor of the cells with neural characteristics. Comparison with receptor properties of erythroid cells.* J Biol Chem, 1993. **268**(15): p. 11208-16.
- 84. Morishita, E., et al., *Anti-erythropoietin receptor monoclonal antibody: epitope mapping, quantification of the soluble receptor, and detection of the solubilized transmembrane receptor and the receptor-expressing cells.* Blood, 1996. **88**(2): p. 465-71.
- 85. Carlini, R.G., A.A. Reyes, and M. Rothstein, *Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis in vitro*. Kidney Int, 1995. **47**(3): p. 740-5.
- 86. Galeano, M., et al., *Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis and wound healing in the genetically diabetic mouse*. Diabetes, 2004. **53**(9): p. 2509-17.
- 87. Buemi, M., et al., *Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis and healing of ischemic skin wounds*. Shock, 2004. **22**(2): p. 169-73.
- 88. Westenfelder, C., *Unexpected renal actions of erythropoietin*. Exp Nephrol, 2002. **10**(5-6): p. 294-8.
- 89. Paschos, N., M.G. Lykissas, and A.E. Beris, *The role of erythropoietin as an inhibitor of tissue ischemia.* Int J Biol Sci, 2008. **4**(3): p. 161-8.
- 90. Katz, O., et al., *Erythropoietin enhances immune responses in mice*. Eur J Immunol, 2007. **37**(6): p. 1584-93.
- 91. Prutchi-Sagiv, S., et al., *Erythropoietin treatment in advanced multiple myeloma is associated with improved immunological functions: could it be beneficial in early disease?* Br J Haematol, 2006. **135**(5): p. 660-72.
- 92. Imamura, R., et al., Erythropoietin protects the kidneys against ischemia reperfusion injury by activating hypoxia inducible factor-1alpha. Transplantation, 2007. **83**(10): p. 1371-9.
- 93. Sturiale, A., et al., *Experimental models of acute renal failure and erythropoietin: what evidence of a direct effect?* Ren Fail, 2007. **29**(3): p. 379-86.
- 94. Maxwell, P.H., et al., *The interstitial response to renal injury: fibroblast-like cells show phenotypic changes and have reduced potential for erythropoietin gene expression*. Kidney Int, 1997. **52**(3): p. 715-24.
- 95. Chen, C.L., et al., Erythropoietin suppresses epithelial to mesenchymal transition and intercepts Smad signal transduction through a MEK-dependent mechanism in pig kidney (LLC-PK1) cell lines. Exp Cell Res, 2010. **316**(7): p. 1109-18.
- 96. Reidy, K.J. and N.D. Rosenblum, *Cell and molecular biology of kidney development*. Semin Nephrol, 2009. **29**(4): p. 321-37.
- 97. Horster, M.F., G.S. Braun, and S.M. Huber, *Embryonic renal epithelia: induction, nephrogenesis, and cell differentiation.* Physiol Rev, 1999. **79**(4): p. 1157-91.
- 98. Davies, J., *How to build a kidney*. Semin Cell Biol, 1993. **4**(3): p. 213-9.
- 99. Vilar, J., et al., *Metanephros organogenesis is highly stimulated by vitamin A derivatives in organ culture.* Kidney Int, 1996. **49**(5): p. 1478-87.
- 100. Campanaro, S., et al., *Genes involved in TGF beta1-driven epithelialmesenchymal transition of renal epithelial cells are topologically related in the human interactome map.* BMC Genomics, 2007. **8**: p. 383.
- 101. Rogers, S.A., et al., *Metanephric transforming growth factor-beta 1 regulates nephrogenesis in vitro*. Am J Physiol, 1993. **264**(6 Pt 2): p. F996-1002.
- 102. Briere, N., L. Bertrand, and J. Ferrari, *Mouse fetal kidneys in serum-free organ culture: effects of epidermal growth factor and hydrocortisone.* Comp Biochem Physiol A Comp Physiol, 1991. **98**(3-4): p. 421-30.

- 103. Okada, T., et al., *Perinatal development of the rat kidney: proliferative activity and epidermal growth factor*. Biol Neonate, 2001. **79**(1): p. 46-53.
- 104. Perantoni, A.O., L.F. Dove, and I. Karavanova, Basic fibroblast growth factor can mediate the early inductive events in renal development. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. 92(10): p. 4696-700.
- 105. Karavanova, I.D., et al., *Conditioned medium from a rat ureteric bud cell line in combination with bFGF induces complete differentiation of isolated metanephric mesenchyme.* Development, 1996. **122**(12): p. 4159-67.
- 106. Barasch, J., et al., *Mesenchymal to epithelial conversion in rat metanephros is induced by LIF*. Cell, 1999. **99**(4): p. 377-86.
- 107. Heber, S., et al., *Modulating the development of renal tubules growing in serumfree culture medium at an artificial interstitium.* Tissue Eng, 2007. **13**(2): p. 281-92.
- 108. Evans, M.J. and M.H. Kaufman, *Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos*. Nature, 1981. **292**(5819): p. 154-6.
- 109. Martin, G.R., Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(12): p. 7634-8.
- Kobayashi, T., et al., Wnt4-transformed mouse embryonic stem cells differentiate into renal tubular cells. Biochem Biophys Res Commun, 2005. 336(2): p. 585-95.
- 111. Bruce, S.J., et al., *In vitro differentiation of murine embryonic stem cells toward a renal lineage*. Differentiation, 2007. **75**(5): p. 337-49.
- 112. Kim, D. and G.R. Dressler, Nephrogenic factors promote differentiation of mouse embryonic stem cells into renal epithelia. J Am Soc Nephrol, 2005.
 16(12): p. 3527-34.
- 113. Yamamoto, M., et al., *Branching ducts similar to mesonephric ducts or ureteric buds in teratomas originating from mouse embryonic stem cells.* Am J Physiol Renal Physiol, 2006. **290**(1): p. F52-60.
- 114. Guan, K., J. Rohwedel, and A.M. Wobus, *Embryonic stem cell differentiation models: cardiogenesis, myogenesis, neurogenesis, epithelial and vascular smooth muscle cell differentiation in vitro.* Cytotechnology, 1999. **30**(1-3): p. 211-26.
- Rathjen, P.D., et al., Properties and uses of embryonic stem cells: prospects for application to human biology and gene therapy. Reprod Fertil Dev, 1998. 10(1): p. 31-47.
- 116. Maltsev, V.A., et al., *Embryonic stem cells differentiate in vitro into cardiomyocytes representing sinusnodal, atrial and ventricular cell types.* Mech Dev, 1993. **44**(1): p. 41-50.
- 117. Maltsev, V.A., et al., *Cardiomyocytes differentiated in vitro from embryonic stem cells developmentally express cardiac-specific genes and ionic currents*. Circ Res, 1994. **75**(2): p. 233-44.
- 118. Claycomb, W.C. and M.C. Palazzo, *Culture of the terminally differentiated adult cardiac muscle cell: a light and scanning electron microscope study.* Dev Biol, 1980. **80**(2): p. 466-82.
- Nag, A.C., et al., Long-term cell culture of adult mammalian cardiac myocytes: electron microscopic and immunofluorescent analyses of myofibrillar structure. J Mol Cell Cardiol, 1983. 15(5): p. 301-17.
- 120. Rohwedel, J., K. Guan, and A.M. Wobus, *Induction of cellular differentiation by retinoic acid in vitro*. Cells Tissues Organs, 1999. **165**(3-4): p. 190-202.

- 121. Wobus, A.M., et al., *Retinoic acid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes.* J Mol Cell Cardiol, 1997. **29**(6): p. 1525-39.
- 122. Hegert, C., et al., *Differentiation plasticity of chondrocytes derived from mouse embryonic stem cells.* J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 23): p. 4617-28.
- 123. Kramer, J., et al., *Embryonic stem cell-derived chondrogenic differentiation in vitro: activation by BMP-2 and BMP-4*. Mech Dev, 2000. **92**(2): p. 193-205.
- 124. Kramer, J., et al., *Chondrocytes derived from mouse embryonic stem cells*. Cytotechnology, 2003. **41**(2-3): p. 177-87.
- 125. Kramer, J., C. Hegert, and J. Rohwedel, *In vitro differentiation of mouse ES cells: bone and cartilage*. Methods Enzymol, 2003. **365**: p. 251-68.
- 126. Dani, C., et al., *Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes in vitro*. J Cell Sci, 1997. **110** (**Pt 11**): p. 1279-85.
- 127. Kramer, J., et al., Cells differentiated from mouse embryonic stem cells via embryoid bodies express renal marker molecules. Differentiation, 2006. 74(2-3): p. 91-104.
- 128. Vigneau, C., et al., *Mouse embryonic stem cell-derived embryoid bodies* generate progenitors that integrate long term into renal proximal tubules in vivo. J Am Soc Nephrol, 2007. **18**(6): p. 1709-20.
- 129. Steenhard, B.M., et al., *Integration of embryonic stem cells in metanephric kidney organ culture*. J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(6): p. 1623-31.
- 130. Minuth, W.W. and U. Rudolph, *A compatible support system for cell culture in biomedical research*. Cytotechnology, 1990. **4**(2): p. 181-9.
- 131. Minuth, W.W., et al., *Construction of an apparatus for perfusion cell cultures which enables in vitro experiments under organotypic conditions.* Eur J Cell Biol, 1992. **57**(1): p. 132-7.
- Minuth, W.W., et al., A new method culturing renal cells under permanent superfusion and producing a luminal-basal medium gradient. Kidney Int, 1992.
 41(1): p. 215-9.
- 133. Doetschman, T.C., et al., *The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium.* J Embryol Exp Morphol, 1985. **87**: p. 27-45.
- 134. Blackburn, E.H., *Switching and signaling at the telomere*. Cell, 2001. **106**(6): p. 661-73.
- 135. Blasco, M.A., et al., *Functional characterization and developmental regulation* of mouse telomerase RNA. Science, 1995. **269**(5228): p. 1267-70.
- 136. Kim, N.W., et al., Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. Science, 1994. **266**(5193): p. 2011-5.
- 137. Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
- 138. Harrison, R.G., *The Outgrowth of the Nerve Fiber as a Mode of Protoplasmic Growth*. Journal of Experimental Zoology 1910. **9**: p. 787-846.
- 139. Davies, J.A. and D.R. Garrod, *Induction of early stages of kidney tubule differentiation by lithium ions*. Dev Biol, 1995. **167**(1): p. 50-60.
- Mullis, K., et al., Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1986. 51 Pt 1: p. 263-73.
- 141. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chainterminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(12): p. 5463-7.

- Meirelles Lda, S. and N.B. Nardi, Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. Br J Haematol, 2003. 123(4): p. 702-11.
- 143. Haniffa, M.A., et al., *Mesenchymal stem cells: the fibroblasts' new clothes?* Haematologica, 2009. **94**(2): p. 258-63.
- 144. Lysy, P.A., et al., *Human skin fibroblasts: From mesodermal to hepatocyte-like differentiation.* Hepatology, 2007. **46**(5): p. 1574-85.
- 145. Haniffa, M.A., et al., Adult human fibroblasts are potent immunoregulatory cells and functionally equivalent to mesenchymal stem cells. J Immunol, 2007. **179**(3): p. 1595-604.
- 146. Hermann, A., et al., *Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells.* J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 19): p. 4411-22.
- 147. Jiang, Y., et al., *Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow*. Nature, 2002. **418**(6893): p. 41-9.
- 148. Jiang, Y., et al., *Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain.* Exp Hematol, 2002. **30**(8): p. 896-904.
- 149. Keene, C.D., et al., *Neural differentiation and incorporation of bone marrowderived multipotent adult progenitor cells after single cell transplantation into blastocyst stage mouse embryos.* Cell Transplant, 2003. **12**(3): p. 201-13.
- 150. Levy, Y.S., et al., Induction of neuron-specific enolase promoter and neuronal markers in differentiated mouse bone marrow stromal cells. J Mol Neurosci, 2003. **21**(2): p. 121-32.
- 151. Pochampally, R.R., et al., *Rat adult stem cells (marrow stromal cells) engraft* and differentiate in chick embryos without evidence of cell fusion. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(25): p. 9282-5.
- 152. Schwartz, R.E., et al., *Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells.* J Clin Invest, 2002. **109**(10): p. 1291-302.
- 153. Sternberg, D., et al., Control of stroma-dependent hematopoiesis by basic fibroblast growth factor: stromal phenotypic plasticity and modified myelopoietic functions. Cytokines Mol Ther, 1996. **2**(1): p. 29-38.
- 154. Zipori, D., *The stem state: mesenchymal plasticity as a paradigm*. Curr Stem Cell Res Ther, 2006. **1**(1): p. 95-102.
- 155. Bohrnsen, F., et al., Murine mesenchymal progenitor cells from different tissues differentiated via mesenchymal microspheres into the mesodermal direction. BMC Cell Biol, 2009. **10**: p. 92.
- 156. Gardner, H., et al., *Absence of integrin alpha1beta1 in the mouse causes loss of feedback regulation of collagen synthesis in normal and wounded dermis.* J Cell Sci, 1999. **112 (Pt 3)**: p. 263-72.
- 157. Mishina, Y., et al., Bone morphogenetic protein type IA receptor signaling regulates postnatal osteoblast function and bone remodeling. J Biol Chem, 2004. **279**(26): p. 27560-6.
- 158. Yoon, B.S., et al., *Bmpr1a and Bmpr1b have overlapping functions and are essential for chondrogenesis in vivo.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(14): p. 5062-7.
- 159. Chang, H.Y., et al., *Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(20): p. 12877-82.
- 160. Yamaguchi, Y., et al., *Regulation of keratin 9 in nonpalmoplantar keratinocytes* by palmoplantar fibroblasts through epithelial-mesenchymal interactions. J Invest Dermatol, 1999. **112**(4): p. 483-8.

- 161. Maxwell, P., *HIF-1: an oxygen response system with special relevance to the kidney.* J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(11): p. 2712-22.
- 162. Eltzschig, H.K., et al., *Coordinated adenine nucleotide phosphohydrolysis and nucleoside signaling in posthypoxic endothelium: role of ectonucleotidases and adenosine A2B receptors.* J Exp Med, 2003. **198**(5): p. 783-96.
- 163. Fisher, J.W., *Erythropoietin: physiology and pharmacology update*. Exp Biol Med (Maywood), 2003. **228**(1): p. 1-14.
- 164. Shawlot, W. and R.R. Behringer, *Requirement for Lim1 in head-organizer function*. Nature, 1995. **374**(6521): p. 425-30.
- 165. Guo, J.K., et al., WT1 is a key regulator of podocyte function: reduced expression levels cause crescentic glomerulonephritis and mesangial sclerosis. Hum Mol Genet, 2002. **11**(6): p. 651-9.
- 166. Park, S.M. and V.K. Chatterjee, *Genetics of congenital hypothyroidism*. J Med Genet, 2005. **42**(5): p. 379-89.
- 167. Hamasaki, T., et al., *EMX2 regulates sizes and positioning of the primary* sensory and motor areas in neocortex by direct specification of cortical progenitors. Neuron, 2004. **43**(3): p. 359-72.
- 168. Palmer, R.E., et al., *WT1 regulates the expression of the major glomerular podocyte membrane protein Podocalyxin.* Curr Biol, 2001. **11**(22): p. 1805-9.
- 169. Hara, T., et al., *Identification of podocalyxin-like protein 1 as a novel cell surface marker for hemangioblasts in the murine aorta-gonad-mesonephros region.* Immunity, 1999. **11**(5): p. 567-78.
- 170. Wagner, N., et al., *The major podocyte protein nephrin is transcriptionally activated by the Wilms' tumor suppressor WT1*. J Am Soc Nephrol, 2004. **15**(12): p. 3044-51.
- 171. Wagner, N., et al., Intermediate filament protein nestin is expressed in developing kidney and heart and might be regulated by the Wilms' tumor suppressor Wt1. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2006. 291(3): p. R779-87.
- 172. Wiese, C., et al., *Nestin expression--a property of multi-lineage progenitor cells?* Cell Mol Life Sci, 2004. **61**(19-20): p. 2510-22.
- Breyer, M.D., R. Redha, and J.A. Breyer, Segmental distribution of epidermal growth factor binding sites in rabbit nephron. Am J Physiol, 1990. 259(4 Pt 2): p. F553-8.
- 174. Harris, R.C., *Response of rat inner medullary collecting duct to epidermal growth factor*. Am J Physiol, 1989. **256**(6 Pt 2): p. F1117-24.
- 175. Harris, R.C. and T.O. Daniel, *Epidermal growth factor binding, stimulation of phosphorylation, and inhibition of gluconeogenesis in rat proximal tubule.* J Cell Physiol, 1989. **139**(2): p. 383-91.
- 176. Harris, R.C., et al., *Evidence for glomerular actions of epidermal growth factor in the rat.* J Clin Invest, 1988. **82**(3): p. 1028-39.
- 177. Threadgill, D.W., et al., *Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype*. Science, 1995. **269**(5221): p. 230-4.
- 178. Zeng, F., A.B. Singh, and R.C. Harris, *The role of the EGF family of ligands and receptors in renal development, physiology and pathophysiology.* Exp Cell Res, 2009. **315**(4): p. 602-10.
- 179. Wang, K., et al., *Epidermal growth factor receptor-deficient mice have delayed primary endochondral ossification because of defective osteoclast recruitment.* J Biol Chem, 2004. **279**(51): p. 53848-56.
- 180. Avner, E.D. and W.E. Sweeney, Jr., *Polypeptide growth factors in metanephric growth and segmental nephron differentiation*. Pediatr Nephrol, 1990. **4**(4): p. 372-7.

5 ANHANG

5.1 Tabellen

Tabelle I: Verwendete Chemikalien und Reagenzien			
Reagenz	Hersteller		
100 bp DNA Ladder	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland		
Aceton	Roth, Karlsruhe, Deutschland		
Bovines Serum Albumin	Sigma, München, Deutschland		
Bradford Reagenz	Sigma, München, Deutschland		
Dispase II	Sigma, München, Deutschland		
dNTP 10 mmol each	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland		
EGF	Sigma, München, Deutschland		
Ethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland		
Ethanol vergält	Hausapotheke der Universität zu Lübeck		
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, Deutschland		
Ethylenglykol	Sigma, München, Deutschland		
Fetales Kälberserum für MSC	PAA, Pasching, Österreich		
Fetales Kälberserum für ESC	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA		
FGF2	R&D, Wiesbaden, Deutschland		
Ficoll Type 400	Sigma, München, Deutschland		
Formaldehyd 37%	Merck, Darmstadt, Deutschland		
Formamid deionisiert	Sigma, München, Deutschland		
Gelatine	Merck, Darmstadt, Deutschland		
Glycerol 2-phosphate dissodium salt hydrate	Sigma, München, Deutschland		
Glycin	Merck, Darmstadt, Deutschland		
HE Gill No.3	Sigma, München, Deutschland		
Hefe tRNA	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland		
Heringssperma DNA	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland		
IBMX	Sigma, München, Deutschland		
Indomethacin min 99% TLC	Sigma, München, Deutschland		
Insulin	Sigma, München, Deutschland		
ITS Liquid Medium Supplement Premix	BD, Heidelberg, Deutschland		
Kollagenase A	Roche, Mannheim, Deutschland		
L-Ascorbic Acid Sodium Salt	Sigma, München, Deutschland		
L-Glutamin	PAA, Pasching, Österreich		
LiCl	Sigma, München, Deutschland		
L-Proline BT Performance certified	Sigma, München, Deutschland		
Meliseptol	Braun, Melsungen, Deutschland		
MEM NEAA 100x	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland		

Fortsetzung Tabelle I: Verwendete Chemikalien und Reagenzien			
2-Mercaptoethanol für RNA Isolation	Sigma, München, Deutschland		
2-Mercaptoethanol für Zellkultur	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland		
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland		
MgCl	Merck, Darmstadt, Deutschland		
NaCl	Merck, Darmstadt, Deutschland		
Nagellack	Diverse Hersteller		
Natriumazid	Merck, Darmstadt, Deutschland		
Natrium-Pyruvat	PAA, Pasching, Österreich		
NucleoSpin RNA	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland		
OligoDT 12-18 Primer	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland		
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland		
Penicillin/Streptomycin 100x	PAA, Pasching, Austria		
Phenol liquefied research chemicals	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland		
Polyvinylpyrolidone	Nicht bekannt		
Recombinant murine LIF 5 µg Protein in PBS	Milipore, Billerica, MA, USA		
Retinsäure	Sigma, München, Deutschland		
RevertAid TM H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland		
RNAse und DNAse freies H ₂ O	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland		
Silbernitrat	Sigma, München, Deutschland		
Sodium Pyruvat Lösung	PAA, Pasching, Österreich		
Sudan III	Sigma, München, Deutschland		
SuperScript III Reverse Transcriptase	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland		
SuperScript III Reverse Transcriptase Puffer	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland		
Taq DNA Polymerase 10x Puffer A1	Natutec, Frankfurt, Deutschland		
Taq DNA Polymerase 5 u/µl	Natutec, Frankfurt, Deutschland		
TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA Kit	Roche, Mannheim, Deutschland		
Tissue Tek OCT Compound	Sakura, Tokyo, Japan		
TGFβ1	PeproTech, Hamburg, Deutschland		
TGFβ ₃	Sigma, München, Deutschland		
Tri-natriumcitrat-dihydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland		
Trypsin/EDTA 10x	PAA, Pasching, Austria		
Urea	Roth, Karlsruhe, Deutschland		
VECTASHIELD [®] Mounting Medium	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA		
Vitamin C steril	Sigma, München, Deutschland		
Wasserbadkonservierer	Roth, Karlsruhe, Deutschland		

Tabelle II: V	Tabelle II: Verwendete Antikörper										
Antikörper zu	Antikörper zur Markierung intranukleärer DNA										
Name	Antig	gen					V	erdünnung	Hers	teller	
DAPI	4′,6-I	Diamidino-	-2-pł	nenylindole	dihyo	drochloride	: 1	:1000	Sigm	a, München, I	Deutschland
Antikörper zu	ur Ch	narakteris	sier	ung der M	SC	mittels In	nm	unfärbung	1		
Name	Antig	gen	Spe	ndertier	Ve	rdünnung	He	ersteller			
A5225	α-SM	[A	Mus	s musculus	1:1	00	Sig	gma, Münche	n, De	eutschland	
β ₁ -NO-GC-AB	β1-NG	D-GC	Kan	inchen	1:8	600	Ge An	schenk von H atomie, Univ	Peter versitä	König, Institut it zu Lübeck	für
550738	CD73	3 (5'NT)	Mus	s musculus	1:5	0	BĽ	, Heidelberg	, Deu	ıtschland	
C2562	Cytol	keratin	Mus	s musculus	1:1	00	Sig	gma, Münche	n, De	eutschland	
MA3105	PECA	AM I	Mus	s musculus	1:5	0	Th	ermo Fisher	Scien	tific, Waltham	, MA, USA
PODOx 11-A	Podo	calyxin	Kan	inchen	1:1	00	Alj	pha Diagnost	ic, Sa	an Antonio, Te	xas, USA
PODO 11-A	Podo	cin	Kan	inchen	1:1	00	Alj	pha Diagnost	ic, Sa	an Antonio, Te	xas, USA
BM2260	NCA	М	Ratt	te	1:1	.:100 Acris Antibodies, I		es, He	erford, Deutsch	land	
Sc-19000	Neph	rin	Zieg	ge	1:5	1:50 SC		SCBT, Santa Cruz, California, USA			
N 5139	Neur	ofilament	Mus	s musculus	1:5	1:50 Sigma, München, Deutschland					
Rat-401	Nesti	n	Mus	s musculus	1:50 D		DS	OSHB, Iowa City, Iowa, USA			
RSOR	RSOI	R	Kan	inchen	1:5	1:50 SCBT, Santa Cruz, California, USA		A			
A5114	S100.	A4	Kan	inchen	1:1	1:100 I		AKO, Hambu	rg, D	eutschland	
5011	THP		Kan	inchen	1:5	1:50 H		Harbor Bio Products, Norwood, MA, USA			
40E-C	Vime	entin	Mus	s musculus	1:5	0	DSHB, Iowa City, Iowa, USA				
V4630	Vime	entin	Zieg	ge	1:5	0	Sig	gma, Münche	n, De	eutschland	
Antikörper zu	ur Ar	nalyse de	r ch	ondrogen	en D	Differenzi	eru	ungsfähigko	eit		
Name	Α	ntigen		Spendertie	r	Verdünnı	ıng	Hersteller	•		
II-II6B3	С	ollagen II]	Mus muscul	lus	1:50		DSHB, Io	wa Ci	ity, Iowa, USA	
Antikörper fi	ir in-	situ-Hyb	oridi	sierung		1					
Name					An	tigen	S	pendertier		Verdünnung	Hersteller
Alpha-Digoxige	enin F	lourescein	Fab	fragments	DI	G	S	Sheep		1:100	Roche
Antikörper zu	Antikörper zur Analyse renaler Vorläuferstrukturen										
Name	Ant	tigen	Spe	ndertier	Verd	lünnung	He	ersteller			Literatur
C2562	Cyt	okeratin	Mus	s musculus	1:10	0	Sig	gma, Münche	n, De	eutschland	[127]
Sc-19000	Nep	ohrin	Zieg	ge	1:50		SC	BT, Santa C	ruz, C	California, USA	A

Fo	Fortsetzung Tabelle II: Verwendete Antikörper					
Se	kundäran	tikörper				
Na	me		Färbung	Verd	lünnung	Hersteller
Ra	bbit anti-m	ouse IgG	FITC	1:200)	Dianova, Hamburg, Deutschland
Mo	ouse anti-ra	bbit IgG	FITC	1:200)	Dianova, Hamburg, Deutschland
Go	at anti-rabl	oit IgG	FITC	1:200)	Dianova, Hamburg, Deutschland
Mo	ouse anti-go	oat IgG	FITC	1:200)	Dianova, Hamburg, Deutschland
Go	at anti-mou	ise IgG	CY3	1:60)	Dianova, Hamburg, Deutschland
Mo	ouse anti-go	oat IgG	CY3	1:60)	Dianova, Hamburg, Deutschland
Go	at anti-rabl	oit IgG	CY3	1:600)	Dianova, Hamburg, Deutschland
Do	nkey anti-r	at IgG	CY3	1:60)	Dianova, Hamburg, Deutschland
FA	CS-Anti	körper und zugehör	rige Isotypkontrollen			
Nr	Name				Färbung	g Hersteller
1	CD29	integrin beta 1 (fibrone	ectin receptor beta)		PE	BD, Heidelberg, Deutschland
2	CD34	gp105-120			PE	BD, Heidelberg, Deutschland
3	CD44	hyaluronan receptor			PE	BD, Heidelberg, Deutschland
4	CD45	lymphocyte common a	ntigen		APC	BD, Heidelberg, Deutschland
5	CD49a	integrin alpha 1			PE	Novus, Littleton, CO, USA
6	CD49d	integrin alpha 4			PE	BD, Heidelberg, Deutschland
7	CD54	intercellular adhesion	molecule 1 (ICAM1)		FITC	BD, Heidelberg, Deutschland
8	CD73	Ecto-5'-Nucleotidase			PE	BD, Heidelberg, Deutschland
9	CD81	tapa1; tspan28			PE	BD, Heidelberg, Deutschland
10	CD105	endoglin			PE	R&D Systems, Abingdon, UK
11	CD106	vascular cell adhesion	molecule (VCAM1)		PE	BD, Heidelberg, Deutschland
12	CD117	ckit proto oncogene			FITC	BD, Heidelberg, Deutschland
13	CD133	prominin 1			PE	eBiosciences, San Diego, USA
14	CD140b	platelet derived groth f	factor receptor beta		PE	eBiosciences, San Diego, USA
15	CD166	activated leukocyte cel	ll adhesion molekule (ALC	PE	eBiosciences, San Diego, USA	
16	CD292	bone morphogenic protein receptor type 1a			indirekt	Abgent, San Diego, CA, USA
Sekundär: Goat anti-rabbit IgG					FITC	BD, Heidelberg, Deutschland
17	Oct 3/4	pou domain class 5 tra	nscription factor 1 (Pou5f	1)	PE	R&D Systems, Abingdon, UK
18	Sca-1	Caspase 3 apoptosis realated cysteine peptidase; stem cell antigen 1			FITC	BD, Heidelberg, Deutschland

Fortsetzung Tabelle II: Verwendete Antikörper					
Isotypkontrolle	Färbung	Verwendet für			
rat IgG 2B	PE	CD34/44	R&D Systems, Abingdon, UK		
rat IgG 2A	PE	CD49a/49d/73/105/106/140b/166/Oct3/4	R&D Systems, Abingdon, UK		
rat IgG 1	PE	CD133	BD, Heidelberg, Deutschland		
rat IgG 2B	APC	CD45	R&D Systems, Abingdon, UK		
rat IgG 2B	PE	CD34/44	R&D Systems, Abingdon, UK		
armenian hamster IgM	PE	CD29/54	BD, Heidelberg, Deutschland		
armenian hamster IgG1	FITC	CD81	eBiosciences, San Diego, USA		

Tabelle III:	Verwendete Primer					
Primer der Housekeeping-Gene						
Marker Gen	Primer Sequenz	Annealing Temperatur (°C)	Zyklen- Zahl	Fragment- Länge		
gapdh	-GGAAGGGCTCATGACCACA- -CCGTTCAGCTCTGGGATGAC-	62 °C	40	164 bp		
128	-ATGGTCGTGCGGAACTGCT- -TTGTAGCGGAAGGAATTGCG-	60 °C	40	-		
Primer zur A	nalyse der osteogenen Differenzierungst	fähigkeit				
Marker Gen	Primer Sequenz	Annealing Temperatur (°C)	Zyklen- Zahl	Fragment- Länge		
osteopontin	-TCACTCCAATCGTCCCTACA- -TGCTCAAGTCTGTGTGTTTCC-	58 °C	36	289 bp		
runx	-CCAAGAAGGCACAGACAGAA- -CAGATAGGAGGGGTAAGACTGG-	61 °C	38	243 bp		
Primer zur A	nalyse der adipogenen Differenzierungs	fähigkeit				
Marker Gen	Primer Sequenz	Annealing Temperatur (°C)	Zyklen- Zahl	Fragment- Länge		
adipsin	-CTGACAGAATTGAGGACGA- -AGAGCCCCACGTAACCACA-	58 °C	36	356 bp		
ap2	-ATGCCTTTGTGGGAACCT- -GCTTGTCACCATCTCGTTTT-	58 °C	36	333 bp		
ррагү	-GCCTAAGTTTGAGTTTGCTGTG- -TGTCATCTTCTGGAGCACCTT-	58 °C	36	226 bp		
Primer zur A	nalyse der chondrogenen Differenzierun	ıgsfähigkeit				
Marker Gen	Primer Sequenz	Annealing Temperatur (°C)	Zyklen- Zahl	Fragment- Länge		
aggrecan	-CAGAAACAACCATGTCCCTGA- -TGTGACTGCTGCTCCCGAC-	58,9 °C	40	196 bp		
collagen II	-ACGGTGGCTTCCACTTCA- -TACATCATTGGAGCCCTGGA-	58 °C	35	383 bp		
Primer zur ql	RT-PCR-Analyse der EPO-Produktion					
Marker Gen	Primer Sequenz	Annealing Temperatur (°C)	Zyklen-Z	ahl		
еро	-ACATCAATTCCTTCTGAGCTCCC- -CAGCCACCAGAGAGTCTTCAGC-	60 °C		40		

Fortsetzung Tabelle III: Verwendete Primer				
Primer für V	ersuche mit embryonalen Stammzellen			
Marker Gen	Primer Sequenz	Annealing Temperatur (°C)	Zyklen- Zahl	Fragment- Länge
bmp7	-GGACAGCCACTTCCTCACTGACGCCG- -TGCTCTGCCCATCCAGGGTCTCCACA-	58 °C	38	403 bp
egfr	-GAACCAAGGGAGTTTGTGGA- -CGTGGCATAGGTGGCAGA-	60 °C	40	232 bp
emx2	-TCGAACCGCCTCCTCGCCGTC- -AATTTCGTTCTCCGGTTCTGAAACCA-	58 °C	38	155 bp
lim1	-ACGTAGGGGACCCCGGACCACGATCA- -AGGGGCCGTTGGGGATGAGTTCGCC-	58 °C	38	289 bp
nephrin	-CCTGGAAGGAGACAGTGCTAA- -CATTCACGCTGGAGGAGACA-	58 °C	40	313 bp
nestin	-AGCAACTGGCACACCTCAA- -ATTAGGCAAGGGGGAAGAGA-	59 °C	40	230 bp
pax8	-TGTTTGCTTGGGAGATCCGGGAC- -CCACTGCTGCTGCTGTGAGTCGAT-	58 °C	38	351 bp
podocalyxin	-CACGGGAGTCCCATTAGAGA- -TGACATGGAAGCCCACTACA-	60 °C	40	179 bp
wnt4	-TGCGGTCCCTGCGACTCCTCGTCTTC- -CGGGTCCCTTGTGTCACCACCTTCCC-	58 °C	38	300 bp
wt1	-GCAAGGCACCAGGCAAGAATCGTACA- -GCAGGAAGGCTCCTCTCCGTCCTAAC-	58 °C	38	178 bp

Tabelle IV: Verwendete Geräte				
Geräteart	Bezeichnung	Hersteller		
Autoklav	Autoklav	Bender + Holbein, Bruchsal, Deutschland		
	Varioklav	H+P Labortechnik, Hackermoos, Deutschland		
	VIX95	Systec, Wettenberg, Deutschland		
Bench	hypoxia 3000	Nicht bekannt		
	NuAire Class II	NuAire, Plymouth, MA, USA		
CO ₂ Inkubator	CO ₂ Water Jacketed Incubator	NuAire, Plymouth, MA, USA		
	CO ₂ Water Jacketed Incubator Series 2	Thermo Fisher Scientific Germany, Bonn, Deutschland		
	HeraCell	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland		
Eiswannen	Eisbad, groß	NeoLab, München, Deutschland		
	Isolierter Eiskübel	MagicTouch Icewares, New York, NY, USA		
	Kryo-Container	Nicht bekannt		
Elektorphorese-Kammer	Sub-Cell GT Wide mini	Biorad, Hercules, CA, USA		
Elektorphorese-Spannungsgeber	Power Pac Basic	Biorad, Hercules, CA, USA		
	EV 243	Consort, Turnhout, Belgien		
	Power Pac 300	Biorad, Hercules, CA, USA		
FACS-Gerät	Cytomics FC 500	Beckman-Coulter, Krefeld, Deutschland		
Gasbrenner	Gasprofi 1	ULD-Tech, Ort nicht bekannt		
Gasflaschen	CO ₂ , N ₂ , Druckluft	Nicht bekannt		
	Druckmindererstation 2UK	Dräger medical, Lübeck, Deutschland		
	Gasflaschenzelle	Dräger medical, Lübeck, Deutschland		

Fortsetzung Tabelle I	V: Verwendete Geräte	
Gefriergerät	-85 °C Ultralow Freezer	NuAire, Plymouth, MA, USA
	-86 °C ULT Freezer	Thermo Electron Corporation, Langenselbold, Germany
	Comfort	Liebherr, Biberach/Riss, Deutschland
	Gefrierschrank	Liebherr, Biberach/Riss, Deutschland
	Glassline gefrierkombie	Liebherr, Biberach/Riss, Deutschland
	Kühlgefrierkombi Premium	Liebherr, Biberach/Riss, Deutschland
	Premium Gefriertruhe	Liebherr, Biberach/Riss, Deutschland
Glasfärbeeinrichtung	Glas Objekträgerständer	Glaswerk, Wertheim, Deutschland
Inkubationskammer	Feuchtkammer	Nicht bekannt
Instrumente	Anatomische/Chirurgische Pinzette	H & H Chirurgische Instrumente, Allendorf, Deutschland
	Pinzette anatomisch	Hammacher, Solingen, Deutschland
	Schere, groß	Werner Dorsch GmbH, Münster/Dieburg
	Schere, klein	Braun, Melsungen, Deutschland
Kryotom	Cryostat Reichert & Jung 2800 Frigocut E	Leica, Bensheim, Deutschland
Laborglas	500ml Flasche + Deckel	Biochrom, Berlin, Deutschland
	Duran Flaschen 100,250,500,1000 ml + Schraubverschluss	Schott, Mainz, Deutschland
	Duran Reagenzgläser 25,50,100,150,250, 400,600,800,1000 ml	Schott, Mainz, Deutschland
	Glastrichter mittel/groß	Schott, Mainz, Deutschland
	Messzylinder 1000:10, 500:5, 500:10, 250:2, 250:5, 100:2, 50:1	Schott, Mainz, Deutschland, isolab, Wertheim, Deutschland, Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Mikroskop	Auflichtmikroskop + Lampe	Leica, Bensheim, Deutschland
	Axioplan II + Axiocam MRc5 mit HAL100 + HB050 Fluorescencelampe	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
	Axiovert 40C + Axiocam MRc	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Stickstoffkontainer	Arpege 40	AirLiquide, Düsseldorf, Deutschland
	TR21 n Container	AirLiquide, Düsseldorf, Deutschland
PCR-Cycler	DNAEngine PTC-200 Peltiert Thermalcycler	MJ-Research, Waltham, MA, USA
	Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	MyCycler thermal cycler	Biorad, Hercules, CA, USA
Perfusionskultur	Gradientencontainer	Minucells and Minutissue, Bad Abbach, Deutschland
	Minusheet	Minucells and Minutissue, Bad Abbach, Deutschland
	Screw Cap Innovative	Minucells and Minutissue, Bad Abbach, Deutschland
	Perfusor VII	Braun, Melsungen, Deutschland
Photometer	Biomate 3 Photometer	Thermo Electron Corporation, Langenselbold, Germany

Fortsetzung Tabelle IV	V: Verwendete Geräte	
Pipetten	1x Pasteurpipetten 3,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
	finnpipette 1-10, 5-50, 20-200,	Thermo Electron Corporation,
	10-100, 100-1000 µl	Langenselbold, Deutschland
	Glasspipetten 5, 10, 20 ml	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
	Multipette 100 µl 8x	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	pipetti 5-40 µl	Thermo Electron Corporation, Langenselbold, Deutschland
	Reference 1-10, 10-100, 50-200, 100-1000 µl	, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	Research 1-10, 10-100, 50-200, 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe	Pipet boy acu	IBS Integra Biosystems, Zizers, Schweiz
1	Pipetboy	IBS Integra Biosystems, Zizers, Schweiz
	Pipetus-akku Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
qRT-PCR-Gerät	Abiprism 7000	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
RNA-Isolation	ABI Prism 6100 Nucleic Acid PrepStation	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Software	CorelDRAW 10	Corel, Ottawa, Kanada
	Cytomics CXP	Beckman-Coulter, Krefeld, Deutschland
	Exel 2000	Microsoft, Redmond, WA, USA
	ImageJ	NIH, Bethesda, MD, USA
	SigmaPlot 2000	Systat, Erkrath, Deutschland
	System II Version 2.1 Software	Beckman-Coulter, Krefeld, Deutschland
	Word 2000	Microsoft, Redmond, WA, USA
	Zeiss AxioVision 4.6	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Sonstige Elektogeräte	AF-20 Icemaschine	Scotsman.Vernon Hills, IL, USA
Soundage Liencogerand	Kurzzeitwecker	TFA Dorstmann, Wertheim, Deutschland
	X (*1	/Roth, Karlsruhe, Deutschland
	Mikrowelle	Aldı, Essen, Deutschland
	pH-Meter 766 Calimatic	Knick Elektronische Messgeräte, Berlin, Deutschland
	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	Thermorüttler	Edmund Bühler, Hechingen, Deutschland
Sonstiges	9 V Batterie Ladegerät	Conrad, Hirschau, Deutschland
	Dreifuß für Abfallbeutel	Unbekannter Hersteller
	Entsorgungsbeutel	Roth, Karlsruhe, Deutschland
	F500 UV Schutz	Fibre-metal, Concordville, PA, USA
	Holzbrett	Werkstadt Universität zu Lübeck, Lübeck, Deutschland
	NiCd 9 V Block	Panasonic Deutschland, Hamburg, Deutschland
	Objektträgerkästen	Nicht bekannt
	Reagenzglasständer	TPP, Trasadingen, Schweiz
	Reaktionsgefäßständer Eppis	Brand, Wertheim, Deutschland
	Schutzbrille astroflex	Uvex Arbeitsschutz GmbH, Fürth, Deutschland
	Thoma Zählkammer	Brand, Wertheim, Deutschland
	WYPALL X60 Tücher	Hakle-Kimberly, Mainz, Deutschland
Spülmaschine	Professional G7835CD	Miele, Gütersloh, Deutschland
Trockenschrank	T5050	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland

Fortsetzung Tabelle IV:	Verwendete Geräte	
UV-Bank/Lampe	Flourescence Link	Bioblock Scientific, Frenkendorf,
	254 nm UV Bank	Deutschland
	+ Foculus IEEE 1394 Dig	New Electronic Technology Vertriebs
	Camera	GmbH, Finning, Deutschland
	+ Abdeckkasten	Werkstadt Universität zu Lübeck, Lübeck, Deutschland
	Typ NU-4 KL	Benda Konrad Laborgeräte, Wiesloch, Deutschland
Vakuumpumpe	Pumpe	KNF Neuberger, Freiburg, Deutschland
	XF5423050	Milipore, Billerica, MA, USA
Vortexer	К550-СоЕ	Binder + Holbein, Bruchsal, Deutschland
	TTS2 yellowline	IKA workslinc, Wilmington, NC, USA
	TTS3 digital yellowline	IKA workslinc, Wilmington, NC, USA
Schüttler	IKA-Vibrax-VKR	IKA workslinc, Wilmington, NC, USA
Waage	1602MP8	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
	Micro 750/1500 mg	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
	TE1502S 1500 g, d=0,01 g	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Wärmekammer	Mini10	MWG Biotech, Ebersberg , Deutschland
Wärmerührer	MR2002	Heidolph-Elektro, Kelheim, Deutschland
	VMS-C7	VWR, Darmstadt, Deutschland
Wasserbad	Wasserbadschwimmer	Biolabs, Ulm, Deutschland
	Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland
	Wasserbad	PD Industriegesellschaft mbH Prüfgerätewerk, Dresden, Deutschland
Wasserreinigungsmaschine	Purelab Ultra	ELGA Berkefeld Celle, Deutschland
Wattestopfer	Techoplus	TecNoMara, Wallisellen, Schweitz
Zentrifuge	Biofuge pico	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
	centrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	centrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	Combi Spin FVL 2400 N	Grant, Shepreth, UK
	GPR Centrifuge	Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland
	Mikrozentrifuge	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle V: Verwendete Verbrauchsmaterialien				
Materialart	Bezeichnung	Hersteller		
Abwurf	Sharpsafe	Frontier Medical Group, Blackwood, UK		
Absaugpipette	Glaspasteurpipette	Roth, Karlsruhe, Deutschland		
Einmalküventten	Microküvette	Roth, Karlsruhe, Deutschland		
FACS Röhrchen	Polystyrrolröhrchen	Nicht bekannt		
Gefrierprobenhalter	Tissue Tek Cryomold Biopsy	Sakura, Tokyo, Japan		
Handschuhe	Nitril 25cm SafeGrip	Süd-Laborbedarf, Gauting, Deutschland		
	Peha-Soft L Powderfree	Hartmann, Heidenheim, Deutschland		
	Peha-Soft L Vinyl	Hartmann, Heidenheim, Deutschland		
Kanülen	Microlance Nr. 1, Nr. 20	BD, Heidelberg, Deutschland		
Objektträger	26x76 mm	Heinz Herenz, Hamburg, Deutschland		
	Deckgläser 24x32/24x50 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland		
	Superfrost plus	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland		

Fortsetzung Ta	belle V: Verwendete Verbrauchsn	naterialien
Perfusionskultur	Luer Lock männlich	Novodirekt, Kehl, Deutschland
	Luer, männlich	Novodirekt, Kehl, Deutschland
	Luer, weiblich	Novodirekt, Kehl, Deutschland
	Silikonschlauch, Innendurchmesser 1,02 mm	Novodirekt, Kehl, Deutschland
	Sterifilter 0,2 µm	Nalgene, Rochester; NY, USA
	Stopfen	Novodirekt, Kehl, Deutschland
Pipettenspitzen	10, 200,1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
	10 µl Safe guard FilterTips	PEQLAB, Erlangen, Deutschland
	100 µl Safe guard FilterTips	PEQLAB, Erlangen, Deutschland
	1000 µl Filter Tips	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	Biosphere Quality tips 20,100,200,1000 μ1	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
	Combitips plus 5 ml für Multipette plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	Combitips plus 10 ml für Multipette plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
qRT-PCR-Bedarf	microAmp Optical 96-well Reaction Plate with Barcode	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Reaktionsgefäße	1,5 ml, 2 ml, 0,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
, č	Mikro-Schraubröhre 1,5 ml, PP	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
	Mirotube tough-tags	Roth, Karlsruhe, Deutschland
	Multiply µStripPro 8er Kette	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
	Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
RNA-Isolation	Microplate	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
	Total RNA purification tray	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
	UV-Küvette micro	Brand, Wertheim, Deutschland
Sonstiges	Aluminiumfolie	diverse Hersteller
	Aluminiumfolie extra stark	Nicht bekannt
	Autoklavierklebeband	Nicht bekannt
	parafilm M laboratory Film	American National Can Company, Chicago, IL, USA
Wasserkanister	5 l Kanister mit Zapfhahn	Nalgene, Rochester; NY, USA
	101 Kanister mit Zapfhahn	Kautex Textron, Bonn, Deutschland
Zellkulturmaterial	50 cm ³ Sprühflasche	Bürkle, Bad Bellingen, Deutschland
	Abfallflaschen	Nalgene, Rochester; NY, USA
	bakteriologische Schalen 10 cm	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
	Cryo Tube Einfrierröhrchen 2 ml	TPP, Trasadingen, Schweiz
	Discardit II Spritzen 5, 10, 20 ml	BD, Heidelberg, Deutschland
	Falcon CultureSlides	BD, Heidelberg, Deutschland
	Minisart 0,20 µm Filter	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
	Original Perfusor Spritze OPS 50 ml Luer Lock	Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
	Stericup+Steritop 0,22 µm 250 ml	Milipore, Billerica, MA, USA
	Zellkultur Testplatte 6, 12, 24 well	TPP, Trasadingen, Schweiz
	Zellkulturflaschen mit Filter 25, 75, 150 cm ²	TPP, Trasadingen, Schweiz
	Zellkulturschalen 100x20 mm/60x15 mm	TPP, Trasadingen, Schweiz
	Zellschaber 15 cm, 30 cm	TPP, Trasadingen, Schweiz
	Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	TPP, Trasadingen, Schweiz

Tabelle VI	: Medien (MSC-Versuche)
MSC-Kulti	vierungsmedium
ad DMEM	+ 4,5 g/l D-Glucose + L-Glutamine - sodium pyruvate; Lagerung bei 4 °C
10%	FKS
1%	MEM Non essential aminoacids
1%	L-Glutamin
1%	Penicillin/Streptomycin
1%	Natrium-Pyruvat
300 µM	Vitamin C (steril)
MSC-Einfr	iermedium
ad MSC-Ku	ultivierungsmedium, 4 °C, steril filtriert
8%	DMSO
Adipogenes MSC-Induktionsmedium	
ad MSC-Ku	lltivierungsmedium; Lagerung bei 4 °C
1 μΜ	Dexamethason (Stocksolution: 8,46 mM)
2 μΜ	Insulin (Stocksolution: 10 mM)
500 μΜ	IBMX (Stocksolution: 500 mM)
200 µM	Indomethacin (Stocksolution 200 mM)
Adipogenes	MSC-Maintenancemedium
ad MSC-Ku	ltivierungsmedium; Lagerung bei 4 °C
2 μΜ	Insulin (Stocksolution: 10 mM)
Chondroger	nes MSC-Differenzierungsmedium
ad DMEM	+ 4,5 g/l D-Glucose + L-Glutamine - sodium pyruvate; Lagerung bei 4 °C
1%	MEM Non essential aminoacids
1%	L-Glutamin
1%	Penicillin/Streptomycin
1%	Natrium-Pyruvat
1%	ITS
300 µM	Vitamin C (steril)
0,1 µM	Dexamethasone (Stock: 8,46 mM)
1 mM	L-Prolin
10 ng/ml	TGFβ3 (Stocksolution: 10 ng/µl)

Fortsetzung Tabelle VI: Medien (MSC-Versuche)

Osteogenes MSC-Differenzierungsmedium

ad MSC-Kultivierungsmedium; Lagerung bei 4 °C

0,1 µM Dexamethason (Stock: 8,46 mM)

10 nM β -Glycerophosphat

Tabelle VII: Medien (ESC-Versuche)

ESC-Kultivierungsmedium

ad DMEM + 4,5 g/l D-Glucose + L-Glutamine - sodium pyruvate; Lagerung bei 4 °C

15% Inaktiviertes FKS

- 1% MEM Non essential aminoacids
- 1% L-Glutamin
- 1% Penicillin/Streptomycin
- 0,2% β-Mercaptoethanol

Mitomycin C-Medium

ad ESC-Kultivierungsmedium, 4 °C, steril filtriert

5% Mitomycin C Lösung

LIF-Medium

ad ESC-Kultivierungsmedium, 4 °C, steril filtriert

5 ng/ μ l Recombinant murine LIF (5 μ g Protein in *PBS*)

ESC-Einfriermedium

ad ESC-Kultivierungsmedium, 4 °C, steril filtriert

8% DMSO

ESC-Differenzierungsmedium (20%)

ad DMEM + 4,5 g/l D-Glucose + L-Glutamine - sodium pyruvate; Lagerung bei 4 °C

20% Inaktiviertes FKS

- 1% MEM Non essential aminoacids
- 1% L-Glutamin
- 1% Penicillin/Streptomycin
- 0,2% β-Mercaptoethanol

Fortsetzung Tabelle VII: Medien (ESC-Versuche)	
ESC-Differenzierungsmedium (0,2%)	
ad DMEM + 4,5 g/l D-Glucose + L-Glutamine - sodium pyruvate; Lagerung bei 4 °C	
0,2%	Inaktiviertes FKS
1%	MEM Non essential aminoacids
1%	L-Glutamin
1%	Penicillin/Streptomycin
0,2%	ß-Mercaptoethanol

Tabelle VIII: Allgemeine Puffer und Lösungen

חחח	
PB2	

ad 5 l aqua dest.; pH=7,2; für Zellkultur zu autoklavieren; Lagerung bei Raumtemperatur

50 g	NaCl
------	------

1,25 g KCl

7,2 g $Na_2HPO_4 + 2 H_2O$

1,25 g KH₂PO₄

Lösungen zur RNA-Isolation

DNAse Reaktionsmix

ad 90 µl Reaktionspuffer/Probe [im Kit]; auf Eis, direkteVerwendung

10 µl DNAse

Lösungen für PCR

PCR-Mastermix

pro Probe; sofortige Verwendung; auf Eis

18,00 µl DNAse und RNAse freiem H₂O

- 2,50 μl Taq DNA Polymerase 10x buffer A1
- 1,00 µl dNTP (10 mM)
- 1,25 μ l Primer left(10 μ M)
- 1,25 μ l Primer right(10 μ M)
- 0,25 µl Taq DNA Polymerase 5 u/µl

Fortsetzung Tabelle VIII: Allgemeine Puffer und Lösungen

Lösungen für Elektrophorese

TBE-Puffer 1x

ad 1000 ml aqua dest.; Lagerung bei Raumtemperatur

- 10,8 g TRIS Base
- 5,5 g Borsäure
- 0,7 g EDTA-Na₂

Lösungen für qRT-PCR

qPCR SYBR-Mastermix

auf Eis, sofortige Verwendung

- 12,5 μl qPCR SYBR
- 7,1 μ l RNAse und DNAse freies H₂O
- 0,2 µl Primer left (10 pm)
- 0,2 µl Primer right (10 pm)

Tabelle IX: Puffer und Lösungen für MSC-Versuche

Lösung zur Zellisolation

Kollagenase/Dispase-Lösung pro Organtyp

ad 5 ml MSC-Kultivierungsmedium; sofortige Verwendung; steril filtriert

4,5 mg Collagenase A mit 150 U/mg

8 mg Dispase 2 (Zielkonzentration 0,8 U/ml)

BrdU - Lösungen

BrdU-labeling-medium; ad Kultivierungsmedium; direkte Verwendung

1 µM BrdU labeling Reagenz

BrdU-labeling-medium; ad Kultivierungsmedium; direkte Verwendung

1 µM BrdU labeling Reagenz

Fixierungslösung; pH 2,0; ad C₂H₄OH; Lagerung bei 4 °C

50 mM Glycin Lösung

Primärantikörperlösung; ad Inkubationspuffer [im Kit]; direkte Verwendung

5% Anti BrdU-Lösung (im Kit)

Sekundärantikörperlösung; ad aqua dest.; direkte Verwendung

5% Anti-mouse-Ig-flourescein-Sekundärantikörper (im Kit)

5% Anti BrdU-Lösung (im Kit)

0,1% DAPI

Fortsetzun	g Tabelle IX: Puffer und Lösungen für MSC-Versuche
FACS-Puf	fer und Lösungen
FACS-Vort	pereitungspuffer ad PBS; Lagerung bei 4 °C
2%	teilinaktiviertes FKS (siehe 2.3.1)
FACS-Puff	er ad PBS; Lagerung bei 4 °C
2%	BSA
0,1%	NaN ₃
Differenzie	erungslösungen
Insulin-Sto	cksolution 10 mM ad 1,74ml aqua dest pH=2; Lagerung bei -20 °C
100 g	Insulin
Indomethac	cin-Stocksolution 200 mM ad 2ml DMSO; Lagerung bei +4 °C
143,12 mg	Indomethacin
IBMX-Stoc	eksolution 500 μM ad 900 μl DMSO; Lagerung bei -20 °C
100 mg	IBMX
TGFβ ₃ -Stoo	cksolution ad 1 ml 4 mM HCl-Lösung; Lagerung bei 4 °C
1 mg	BSA
10 µg	TGF-β ₃
Lösungen z	zum Nachweis alkalischer Phosphatase
AP-Fixieru	ngslösung; Lagerung bei 4 °C
6,5 ml	Citrat-Lösung (Bestandteil des Alkalische Phosphatase-Kits)
2,5 ml	Aceton
0,8 ml	Formaldehyd
AP-Färbelö	sung; sofortige Verwendung
251	Alkalische Phosphatase Lösung (Bestandteil des Alkalische Phosphatase-
25 µ1	Kits)
1260 µl	Aqua dest.
25 µl	Naphtol-Lösung (Bestandteil des Alkalische Phosphatase-Kits)
25 µl	Natrium-Nitrit-Lösung (Bestandteil des Alkalische Phosphatase-Kits)
Lösungen für die Sudan III Färbung	
Sudan III-F	ärbelösung
ad 10 ml 70% C ₂ H ₄ OH; Lagerung lichtgeschützt bei Raumtemperatur	
0,03 g	Sudan III
Lösung 15 min im Wasserbad bei 60 °C inkubieren, dann sterilfiltrieren	

Fortsetzung Tabelle IX: Puffer und Lösungen für MSC-Versuche	
Lösungen fü	ir die EPO-in-situ-Hybridisierung
In-situ-Hybri	idisierung-Fixierung ad PBS; Lagerung bei -20 °C
4%	Paraformaldehyd (Zum Lösen auf 60 °C erhitzen)
4%	D(+) Saccharose
SSC-Puffer (20x) ad aqua dest.; pH=7,0; Lagerung bei Raumtemperatur	
3 M	NaCl
300 mM	Tri-natriumcitrat-dihydrat
Zusätzlich si	nd 2x, 0,2x und 0,1xSSC durch Verdünnung mit aqua dest. anzusetzen
Denhardt's R	Reagenz (50x) ad 500 ml aqua dest.; Lagerung bei -20 °C
5 g	Ficoll Type 400
5 g	Polyvinylpyrrolidone
5 g	BSA
EDTA (500)	mM) ad aqua dest.; Lagerung bei Raumtemperatur
500 mM	EDTA
Prähybridisie	erungslösung; pro "CultureSlide"; sofortige Verwendung
250 µl	20x SSC
100 µl	50x Denhardts
500 µl	Formamid (deionisiert)
25 µl	Hefe tRNA
25 µl	Heringssperma DNA
20 µl	200 mM EDTA
80 µl	DNAse und RNAse freies H ₂ O
Hybridisierungslösung	
ad 1000 μ l DNAse und RNAse freies H ₂ O; pro "CultureSlide"; sofortige Verwendung	
250 µl	20x SSC
100 µl	50x Denhardts
500 µl	Formamid (deionisiert)
25 µl	Hefe tRNA
20 µl	200 mM EDTA
1 µg	In-situ-Sonde

Fortsetzung Tabelle IX: Puffer und Lösungen für MSC-Versuche

Anti-DIG-Antikörperlösung ad PBS; sofortige Verwendung

7,5% BSA

1%Alpha-Digoxigenin Flourescein Fab fragments

0,1% DAPI

Tabelle X: Puffer und Lösungen für ESC-Versuche	
Gelatinelös	ung; ad aqua dest.; autoklavieren vor Gebrauch; Lagerung bei 4 °C
0,1%	Gelatine
Mitomycin C-Lösung; ad 10ml PBS; steril filtriert; Lagerung bei -20 °C	
2 mg	Mitomycin C

7.2 Danksagung

Diese Promotionsarbeit wäre nicht ohne die Hilfe vieler Menschen realisierbar gewesen, denen ich von ganzem Herzen danken möchte.

Zum einen möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Hendik Lehnert, Herrn Prof. Dr. Norbert Tautz, Herrn Prof. Dr. Jürgen Rohwedel, Herrn Prof. Dr. Wolfgang Jelkmann, Herrn Dr. Thomas Hellwig-Bürgel, Herrn Privat-Dozent Dr. Jan Rupp und Herrn Privat-Dozent Dr. Jan Kramer für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die interessante Themenstellung und die umfassende Einarbeitung in zell- und molekularbiologische Arbeitstechniken bedanken.

Zudem danke ich der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Kai-Uwe Eckardt, Medizinische Klinik 4, Universität Erlangen und PD Dr. Olaf Jöhren, Institut für Pharmakologie und Toxikologie (Prof. Dr. med. Markus Schwaninger), Universität zu Lübeck, für die Bereitstellung der EPO-*in situ*-Sonden.

Ein sehr großer Dank gilt auch Barbara Andresen, Dr. Ulrich Lindner, Gabriele Huck, Stefanie Schwindt, Heiko Steenbock und Alexandra Tiedtke, die mich mit großem Engagement in unzählbaren Situationen gefördert haben und für deren konstruktive Ratschläge ich sehr dankbar bin.

Auch danke ich den Mitarbeitern des Instituts für Virologie und Zellbiologie und des Instituts für Physiologie der Universität zu Lübeck für das unkomplizierte und freundliche Arbeitsklima und Ihre ständige Hilfsbereitschaft.

Mein ganz persönlicher Dank gilt meinen Eltern, meiner Ehefrau und Privat-Dozent Dr. Jan Kramer, ohne deren ständige Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

7.3 Curriculum vitae

Persönliche Angaben:

Name:	Johannes Wolfgang Osbahr, geb. Waldmann
Geburt:	24.02.1983 in Schwerin
Familienstand:	Verheiratet

Zivildienst:

2009/2010

2002 - 2003 Medizinischer Transportdienst und Hausnotrufdienst des Arbeiter-Samariter-Bundes (Bielefeld)

Hochschulstudium:

2003 – 2010 **Studium der Humanmedizin** an der Universität zu Lübeck Ärztliche Prüfung (August 2005/November 2010), *Note: 2,00*

Praktisches Jahr: Innere Medizin:

- 1) Krankenhauses Großhansdorf: Pneumologie, Intensivmedizin; Prof. Magnussen
- 2) University Hospital of Coventry and Warwickshire, NHS Trust, Coventry/England: Notaufnahme, Aufnahmestation, Intensivstation **Chirurgie:**
- 1) Tribhuvan University Teaching Hospital in Kathmandu/Nepal: Station, Aufnahme, OP
- 2) Klinikum Neustadt: Station, Aufnahme, OP; Prof. Schimmelpenning

Neurologie:

UKSH, Campus Lübeck: Stroke Unit, Ambulanz, Station, Poliklinik; Prof. Münte

Famulaturen: Mund-/Kiefer-/Gesichtschirurgie, Bielefeld, Dres. Waldmann/Zerfowski Chirurgie, Lübeck, Dres. Sagebiel/Busse Unfallchirurgie, UKSH, Campus Lübeck, Prof. Paech Allgemeinmedizin, Lübeck, Dres. Träder/Fallenbacher Innere Medizin, Alice Springs/Australien, Alice Springs Hospital Gynäkologie und Chirurgie, Lübeck, Marienkrankenhaus

Wissenschaftliche Tätigkeit:

- 2007 2009 Durchführung des experimentellen Teils der **Promotionsarbeit** in der interdisziplinären Arbeitsgruppe "Stammzellbiologie" der Medizinischen Klinik I, UKSH Campus Lübeck und dem Institut für Virologie und Zellbiologie, PD Dr. Jan Kramer
- 2008 2009: Promotionsstipendium "Exzellenzmedizin" der medizinischen Fakultät der Universität zu Lübeck

Beruflicher Werdegang:

Seit 01/2011 Tätigkeit als Assistenzarzt, Zentrum für Innere Medizin und Intensivmedizin, Sana Kliniken Ostholstein GmbH, Klinik Eutin, Dr. Gützkow/PD Dr. Hartmann

7.4 Posterpräsentationen

Waldmann J, Kramer J: Wenn etwas an die Nieren geht – Gewinnung und Kultivierung von Nierenstammzellen. 2. Lübecker Doktorandentag (2008)

Waldmann J, Lindner U, Hellwig-Bürgel T, Meier M, Jelkmann W, Steinhoff J, Lehnert H, Rohwedel J, Kramer J: Isolation and characterization of plastic adherent cells from adult mouse kidney. Kidstem conference, Liverpool (2008)

Waldmann J, Lindner U, Hellwig-Bürgel T, Jelkmann W, Lehnert H, Rohwedel J, Kramer J: Isolation and characterisation of mesenchymal stromal cells from adult mouse kidney. Congress of the German society for Stem Cell Research, Lübeck (2010)